



**COMITE SCIENTIFIQUE
DE L'AGENCE FEDERALE POUR LA SECURITE
DE LA CHAINE ALIMENTAIRE**

AVIS 11-2010

Concerne : Procédures alternatives d'analyses de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) et de *Ralstonia solanacearum* (Raso) (dossier Sci Com 2009/31).

Avis approuvé par le Comité scientifique le 19 mars 2010.

Résumé

Dans le présent avis, il est demandé au Comité scientifique de proposer des procédures alternatives d'analyse pour la recherche de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* et de *Ralstonia solanacearum* dans les tubercules de pomme de terre.

La formulation de procédures alternatives d'analyses vise à éviter le manque de spécificité des analyses pour la recherche de *C. m.* subsp. *sepedonicus* et vise à réduire significativement les délais d'analyse dans les cas de présence suspectée de *C. m.* subsp. *sepedonicus* ou de *R. solanacearum*.

Le Comité scientifique propose plusieurs alternatives d'analyse pour la recherche de *C. m.* subsp. *sepedonicus* et de *R. solanacearum* mais considère que cette problématique devrait aussi être examinée au niveau européen, par l'intermédiaire de l'EFSA.

Summary

Advice 11-2010 of the Scientific Committee of the FASFC on alternative procedures for the analysis of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) and *Ralstonia solanacearum* (Raso)

The Scientific Committee is asked to propose alternative analysis procedures for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) and *Ralstonia solanacearum* (Raso) in tubers of potatoes.

By putting forward alternative analysis procedures it is aimed to remediate for the lack of specificity of the analyses for the detection of *C. m.* subsp. *sepedonicus* and to reduce significantly the time of analysis in case of suspected presence of *C. m.* subsp. *sepedonicus* of *R. solanacearum*.

The Scientific Committee proposes several alternative analysis for the detection of *C. m.* subsp. *sepedonicus* and *R. solanacearum* but is of the opinion that this subject should be discussed at European level, through the EFSA.

Mots clés

Pomme de terre – *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) – *Ralstonia solanacearum* (Raso) – analyse – procédure alternative

1. Termes de référence

1.1. Questions

Il est demandé au Comité scientifique de répondre aux trois questions suivantes :

1. Quelles procédures alternatives d'analyses de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) dans les tubercules de pomme de terre faudrait-il développer et soumettre à l'approbation de la Commission européenne afin d'éviter les cas récurrents actuels de faux positifs et de raccourcir les délais actuels de confirmation des contaminations ?
2. Quelles procédures alternatives d'analyses de *Ralstonia solanacearum* (Raso) dans les tubercules de pomme de terre faudrait-il développer et soumettre à l'approbation de la Commission européenne afin de raccourcir les délais actuels de confirmation des contaminations ?
3. Dans le cas où le Comité scientifique ne serait pas en mesure de proposer de telles procédures alternatives, quelles seraient les pistes de recherches les plus pertinentes et quels seraient les termes de références que l'Agence pourrait proposer au panel d'experts européens désigné par la Commission afin de rechercher et développer ces procédures analytiques alternatives ?

1.2. Contexte législatif

Directive 93/85/CEE du Conseil du 4 octobre 1993 relatif à la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre (*Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* subsp. *sepedonicus* (Spieckerman et Kotthoff) Davis *et al.*).

Directive 98/57/CE du Conseil du 20 juillet 1998 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

Directive 2006/56/CE de la Commission du 12 juin 2006 modifiant les annexes de la directive 93/85/CEE du Conseil concernant la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre.

Directive 2006/63/CE de la Commission du 14 juillet 2006 modifiant les annexes II à VII de la directive 98/57/CE du Conseil concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

Arrêté ministériel du 3 novembre 1994 relatif à la lutte contre le flétrissement bactérien de la pomme de terre (*Clavibacter michiganensis* (Smith) Davis *et al.* subsp. *sepedonicus* (Spieckerman et Kotthoff) Davis *et al.*).

Arrêté ministériel du 30 août 1999 concernant la lutte contre *Ralstonia solanacearum* (Smith) Yabuuchi *et al.*

Vu les discussions durant la réunion de groupe de travail du 21 octobre 2009 et la séance plénière du 19 mars 2010,

le Comité scientifique émet l'avis suivant :

2. Introduction

Clavibacter michiganensis subsp. *sepedonicus* (Cms) désigne la bactérie phytopathogène responsable de la maladie du flétrissement bactérien (ou bactériose annulaire) chez la pomme de terre. La présence de la maladie se manifeste au niveau du tubercule principalement par le pourrissement de l'anneau vasculaire, et au niveau du plant de pomme de terre essentiellement par le flétrissement de la plante entière. La dissémination de la bactérie se fait, soit directement par contact entre un tubercule infecté et un tubercule sain mais présentant des blessures, soit indirectement par contact entre ce dernier et une surface ayant été en contact avec un tubercule infecté. Il s'agit d'un organisme de quarantaine pour l'Union Européenne. Ceci implique que tous les états-membres ont l'obligation de prendre des mesures afin de détecter la bactérie et d'éradiquer la maladie. Les mesures prescrites sont répertoriées dans la Directive 93/85/CEE.

Ralstonia solanacearum (Raso) désigne la bactérie phytopathogène responsable de la maladie de la pourriture brune (ou bactériose vasculaire) chez la pomme de terre. La présence de la maladie se manifeste au niveau du tubercule principalement par le suintement bactérien qui émerge souvent à partir des yeux et des talons des tubercules infectés. Au niveau du plant de pomme de terre, elle se manifeste essentiellement par le flétrissement des feuilles des extrémités des branches pendant les chaleurs diurnes. La dissémination de la bactérie se fait principalement par l'utilisation en irrigation d'eau de surface en présence de *Solanum dulcamara* (morelle douce-amère). Cette plante joue le rôle de plante-réservoir permettant à la bactérie de survivre pendant la période hivernale puis de proliférer en période estivale. Il s'agit également d'un organisme de quarantaine pour l'Union Européenne. Ceci implique à nouveau que tous les états-membres ont l'obligation de prendre des mesures afin de détecter la bactérie et d'éradiquer la maladie. Les mesures prescrites sont répertoriées dans la Directive 98/57/CE.

Le processus d'analyse pour la recherche de *C. m.* subsp. *sepedonicus* et de *R. solanacearum* dans les tubercules de pomme de terre est décrit de manière très précise dans la législation (cf. notamment les Directives 2006/56/CE et 2006/63/CE). Ce processus se déroule de la façon suivante :

- Un échantillon unitaire de 200 tubercules est prélevé ; plusieurs échantillons peuvent être prélevés sur un même lot en fonction de la superficie cultivée ;
- Une première analyse est réalisée sur l'échantillon : via immunofluorescence (IF), via Polymerase Chain Reaction (PCR) ou via Fluorescent In Situ Hybridization (FISH) pour *C. m.* subsp. *sepedonicus* (cf. également EPPO (2006) et van der Wolf *et al.* (2005) pour plus de détails sur ces méthodes) et via IF, via PCR ou via isolement sélectif pour *R. solanacearum* ;
- En cas de résultat positif, une seconde analyse, basée sur un principe biologique différent de la première analyse, est réalisée sur le même échantillon ;
- Dans le seul cas où les résultats des deux analyses sont positifs, la présence de la bactérie est suspectée et est notifiée. Le processus d'analyse doit être poursuivi afin de mettre en culture la bactérie et de confirmer son identité et son pouvoir phytopathogène. L'isolement direct de *C. m.* subsp. *sepedonicus* à partir d'un échantillon contaminé est difficile et se fait dès lors après enrichissement de la bactérie via un bio-essai sur plantules d'aubergine tandis que celui de *R. solanacearum* ne pose pas de difficulté. La phytopathogénicité des deux bactéries est mise en évidence sur plantules d'aubergine (pour *C. m.* subsp. *sepedonicus*) ou de tomates (pour *R. solanacearum*). Entretemps, la production concernée est mise sous saisie conservatoire ainsi que tous les lots qui lui sont liés (lien clonal ou par contacts).

Dans la pratique, deux problèmes se posent lors de la réalisation de ces analyses.

1. Uniquement pour *C. m. subsp. sepedonicus*, les analyses pour la recherche de cette dernière manquent de spécificité et de sensibilité. En effet, il arrive que des résultats positifs aux deux analyses ne soient pas confirmés ultérieurement ni par mise en culture, ni par isolement direct, ni par bio-essai sur aubergine.
2. Le délai d'analyse est très long, aussi bien dans les cas de présence suspectée de *C. m. subsp. sepedonicus* que de *R. solanacearum*. En effet, un délai d'au moins quatre semaines (jusqu'à deux mois en cas d'absence de plantes test ou de difficultés d'isolement) s'écoule entre le début de l'analyse et l'obtention du résultat du bio-essai, et ce tant pour la recherche de l'une que de l'autre.

Il peut en résulter des conséquences économiques importantes pour les opérateurs du secteur confrontés à des lots de pommes de terre suspects, d'autant plus s'il s'agit de plants de pomme de terre et que la détection survient pendant la période de commercialisation de ces plants.

Les questions posées au Comité scientifique ont pour objectif la formulation de procédures alternatives d'analyses visant à éviter ces problèmes pratiques.

3. Avis

Pour rappel, toute méthode d'analyse s'accompagne d'un risque de résultats faussement positifs (risque α) et d'un risque de résultats faussement négatifs (risque β). Dès lors, aucune méthode d'analyse n'est fiable à 100 %. Il convient néanmoins de minimiser ces risques α et β .

Les cas suspects de contamination par *C. m. subsp. sepedonicus* (IF et PCR positives) non confirmés par bio-essai restent rares. Parmi toutes les analyses réalisées depuis 2006, année d'implémentation de la nouvelle méthode de détection de référence (Directive 2006/56/CE), à l'ILVO, laboratoire national de référence pour les analyses relatives aux bactéries de quarantaine en pomme de terre, cela concernerait à peine 2 cas non confirmés sur plus de 5000 analyses, soit moins de 0,04 %. Exprimé par rapport au nombre total de cas suspects de contamination par *C. m. subsp. sepedonicus* (= cas suspects confirmés et non-confirmés par bio-essai), ce pourcentage varierait de 40 à 50 %, soit 2 cas suspects non-confirmés sur un total de 4 à 5 cas suspects.

A noter également que si les analyses sur plants de pommes de terre étaient réalisées après leur récolte mais avant la fin de l'année, et donc bien avant leur plantation, les conséquences économiques seraient nettement moindre vu que l'on ne se situerait pas en période de plantation.

Le problème des résultats faussement positifs (= IF et PCR positives mais absence de confirmation par bio-essai) ne concerne que *C. m. subsp. sepedonicus* pour lequel le nombre de bactéries infectant le tubercule peut être faible, proche du niveau auquel les bactéries sont non détectables par IF, c'est-à-dire moins de 10^5 cellules par ml d'extrait concentré remis en suspension. Ceci, au contraire de *R. solanacearum* pour lequel ce nombre est généralement très élevé facilitant ainsi sa détection. Ainsi, selon un projet de validation du bio-essai selon la norme ISO 17025 actuellement en cours à l'ILVO, si on considère un niveau de contamination de 10^3 cellules/ml d'extrait concentré remis en suspension, seuls 10 % des cas conduiront à un résultat positif au bio-essai, contre 90 % si on considère un niveau de contamination de 10^4 cellules/ml d'extrait concentré remis en suspension.

Dans certains pays, lorsque la présence de ces bactéries de quarantaine est suspectée (= 2 analyses conduisant à un résultat positif), les lots de plants de pomme de terre concernés sont volontairement (= décision du secteur) retirés du circuit des plants sans attendre la

confirmation par bio-essai (ex. : Allemagne). Cette approche précautionneuse témoigne d'une politique phytosanitaire forte.

Il est nécessaire d'insister aussi sur l'importance de l'évaluation des réactifs indispensables aux analyses (ex. : anticorps, amorces PCR, méthodes d'isolement d'ADN, ...) par le laboratoire national de référence, comme cela se réalise en France. En effet, une variation dans la qualité des anticorps disponibles sur le marché a déjà été constatée, et de nombreuses réactions non spécifiques avec des bactéries communes dans les sols ont pu être mises en évidence.

D'un point de vue scientifique et statistique, vu que le taux d'infection dans une production de (plants de) pomme de terre est généralement faible (de l'ordre de 0,1 %), il serait nécessaire d'analyser quelque 4605 tubercules par lot pour atteindre un niveau de confiance de 99 % de chance de détecter ce faible niveau d'infection (van der Wolf *et al.*, 2005). Un échantillon de 200 tubercules, comme cela se fait actuellement dans la pratique, ne donne que 18 % de chance de détecter un niveau d'infection de 0,1 %.

Le Comité scientifique estime enfin que cette problématique devrait être examinée au niveau européen et que, dès lors, l'avis de l'EFSA à ce sujet devrait être sollicité. La question de la nécessité d'un bio-essai pour la charge de la preuve, par rapport à un isolement de la bactérie, pourrait ainsi être posée.

3.1. Quelles procédures alternatives d'analyses de *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Cms) dans les tubercules de pomme de terre faudrait-il développer et soumettre à l'approbation de la Commission européenne afin d'éviter les cas récurrents actuels de faux positifs et de raccourcir les délais actuels de confirmation des contaminations ?

Une procédure alternative d'analyse potentiellement plus spécifique, plus robuste et plus sensible que l'immunofluorescence et que la PCR conventionnelle serait la réalisation d'une analyse PCR en temps réel (EPPO, 2006). Une telle méthode d'analyse a fait l'objet d'un essai qui a été validé au cours d'un test inter-laboratoires EUPHRESKO. Cette méthode sera dès lors proposée à la Commission en 2010 pour approbation comme méthode d'analyse.

Le Comité scientifique propose dès lors, comme processus alternatif d'analyse pour la recherche de *C. m. subsp. sepedonicus* :

1. La réalisation de trois analyses différentes : un test d'immunofluorescence, une analyse PCR conventionnelle et une analyse PCR en temps réel basée sur une autre amorce génétique de la bactérie que celle de l'analyse PCR conventionnelle. Ces trois analyses seraient réalisées sur un échantillon de 200 tubercules.
2. Lorsqu'au moins deux de ces trois analyses sont positives, le lot concerné est à considérer comme contaminé de manière confirmée, et le bio-essai ne doit dès lors plus être effectué.
3. Si l'opérateur conteste le résultat, un nouvel échantillon plus large d'au moins 4 605 tubercules est alors prélevé et analysé selon les trois méthodes ci-dessus, sur demande et aux frais de l'opérateur. Ceci afin de réduire les incertitudes analytiques et de satisfaire ainsi les exigences statistiques. En effet, avec une telle taille pour l'échantillon, il est quasiment exclu de ne pas trouver un tubercule infecté si les résultats précédemment obtenus sont authentiques, c'est-à-dire réellement provoqués par *C. m. subsp. sepedonicus*.
4. Sur base de ce nouvel échantillon, et uniquement dans les cas où un résultat négatif est obtenu pour au moins deux analyses de type différent, dont la PCR en temps réel, la suspicion est levée pour les lots suspects de contamination et ceux suspects d'être probablement contaminés.

5. Si l'opérateur conteste à nouveau les résultats de l'analyse de ces 4 605 tubercules, alors un bio-essai est réalisé, sur demande et aux frais de l'opérateur, mais ce dernier doit alors être conscient que le délai pour obtenir un résultat sera d'au minimum 1 mois.

En ce qui concerne le raccourcissement des délais actuels de confirmation des contaminations, la proposition développée ci-dessous (cf. réponse à la question 3.2.) pourrait également être envisagée pour les analyses de *C. m. subsp. sepedonicus*.

3.2. Quelles procédures alternatives d'analyses de *Ralstonia solanacearum* (Raso) dans les tubercules de pomme de terre faudrait-il développer et soumettre à l'approbation de la Commission européenne afin de raccourcir les délais actuels de confirmation des contaminations ?

Le bio-essai a pour objectif de mettre en évidence la présence de bactéries viables, à savoir des bactéries capables de provoquer une infection. Comme alternative au bio-essai, le Comité scientifique envisagerait le développement d'une méthode d'analyse basée sur la détection d'ARN messager spécifique à ces bactéries de quarantaine (Bach *et al.*, 2003 ; Gudmestad *et al.*, 2009 ; van Beckhoven *et al.*, 2002 ; Van der Wolf *et al.*, 2004 ; Weller *et al.*, 2000), et non d'ADN. En effet, la présence d'ARN messager issu de la transcription de l'ADN témoigne d'une activité cellulaire de la bactérie.

3.3. Dans le cas où le Comité scientifique ne serait pas en mesure de proposer de telles procédures alternatives, quelles seraient les pistes de recherches les plus pertinentes et quels seraient les termes de références que l'Agence pourrait proposer au panel d'experts européens désigné par la Commission afin de rechercher et développer ces procédures analytiques alternatives ?

Non d'application vu les réponses formulées aux questions 3.1 et 3.2.

4. Conclusions

Le Comité scientifique propose plusieurs alternatives d'analyse pour la recherche de *C. m. subsp. sepedonicus* et de *R. solanacearum* mais considère que cette problématique devrait aussi être examinée au niveau européen, par l'intermédiaire de l'EFSA.

Pour le Comité scientifique,
Le Président,

Prof. Dr. Ir. André Huyghebaert

Bruxelles, le 19/03/2010

Références

Bach HJ, Jessen I, Schloter M and Munch JC, 2003. A TaqMan-PCR protocol for quantification and differentiation of the phytopathogenic *Clavibacter michiganensis* subspecies. *J Microbiol Methods*. 52(1):85-91.

EPPO, 2006. *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Diagnostic. PM 7/59. *EPPO Bulletin*. 36, 99-109.

Gudmestad NC, Mallik I, Pasche JS, Anderson NR and Kinzer K., 2009. A real-time PCR assay for the detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* based on the cellulose A gene sequence. *Plant Disease*. 93: 649-659.

van Beckhoven JR, Stead DE and van der Wolf JM, 2002. Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* by AmpliDet RNA, a new technology based on real time monitoring of NASBA amplicons with a molecular beacon. *J Appl Microbiol*. 93(5):840-9.

van der Wolf JM, Van Beckhoven JRCM, De Haan EG, Van den Bovenkamp GW and Leone GOM, 2004. Specific detection of *Ralstonia solanacearum* 16S rRNA sequences by AmpliDet RNA. *European Journal of Plant Pathology*. Volume 110, Number 1 / January, 2004.

van der Wolf JM, Elphinstone JG, Stead DE, Metzler M., Müller P., Hukkanen A. & Karjalainen R., 2005. Epidemiology of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* in relation to control of bacterial ring rot. *Plant Research International*. Wageningen UR. Report 95.

Weller SA, Elphinstone JG, Smith NC, Boonham N and Stead DE, 2000. Detection of *Ralstonia solanacearum* strains with a quantitative, multiplex, real-time, fluorogenic PCR (TaqMan) assay. *Appl Environ Microbiol*. 66(7):2853-8.

Membres du Comité scientifique

Le Comité scientifique est composé des membres suivants :

D. Berkvens, C. Bragard, E. Daeseleire, P. Delahaut, K. Dewettinck, J. Dewulf, L. De Zutter, K. Dierick, L. Herman, A. Huyghebaert, H. Imberechts, P. Lheureux, G. Maghuin-Rogister, L. Pussemier, C. Saegerman, B. Schiffers, E. Thiry, T. van den Berg, M. Uyttendaele, C. Van Peteghem, G. Vansant

Remerciements

Le Comité scientifique remercie le secrétariat scientifique et les membres du groupe de travail pour la préparation du projet d'avis. Le groupe de travail était composé de :

Membres du Comité scientifique
Experts externes

C. Bragard (rapporteur), B. Schiffers
M. Moens (ILVO), J.-L. Rolot (CRA-W), J. Van Vaerenbergh (ILVO)

Cadre juridique de l'avis

Loi du 4 février 2000 relative à la création de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, notamment l'article 8 ;

Arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire ;

Règlement d'ordre intérieur visé à l'article 3 de l'arrêté royal du 19 mai 2000 relatif à la composition et au fonctionnement du Comité scientifique institué auprès de l'Agence fédérale pour la Sécurité de la Chaîne alimentaire, approuvé par le Ministre le 27 mars 2006.

Disclaimer

Le Comité scientifique conserve à tout moment le droit de modifier cet avis si de nouvelles informations et données arrivent à sa disposition après la publication de cette version.