**Argumentaire technique sur Candidatus Liberibacter Solanacearum**

# Introduction : Candidatus Liberibacter Solanacearum (CLso)

1. Candidatus Liberibacter solanacearum (CLso ou Lso) est une bactérie à Gram négatif, appartenant à la classe des Alphaproteobacteria qui est à ce jour non cultivable in vitro. Elle est décrite comme un agent phytopathogène limité au phloème capable de provoquer des symptômes sur Solanacées (maladie du Zebra chip sur pomme de terre) ou Apiacées cultivées comme la pomme de terre, la tomate, le poivron, le tabac, le céleri ou la carotte.
2. La bactérie est décrite comme essentiellement transmise par les psylles, insectes appartenant à la famille des Psyllidae. La gamme d’hôtes de la bactérie est limitée par la gamme d’hôtes de l’insecte vecteur qui est connu pour être restreinte à quelques plantes phylogénétiquement proches (Haapalainen 2014). Les études de Munyaneza et al. (2016) et Antolinez et al. (2017) montrent par ailleurs que les risques de contamination croisée entre la pomme de terre et la carotte sont négligeables.
3. Sur les apiacées, les symptômes se caractérisent par un développement anarchique au collet, un enroulement et/ou la décoloration (jaune, bronze au violet) des feuilles, un rabougrissement de la racine principale et une prolifération des racines secondaires. Ce sont des symptômes qui peuvent être comparables à d’autres maladies : psylle de la carotte, jaunisse de l’aster (Aster Yellows phytoplasma) ou Spiroplasma citri (Munyaneza, 2012).
4. Les bactéries CLso sont réparties en neuf haplotypes - A, B, C, D, E, F, G, H, and U (Haapalainen et al. 2020). L’haplotypage s’appuie sur la présence de mutations sur certains gènes. Les haplotypes diffèrent selon l’hôte, le vecteur et de localisation géographique. Les haplotypes [C], [D], [E] et [U] ont été identifiés sur apiacées et localisés en Europe. Les haplotypes [A], [B] et [F] ont été identifiés sur les solanacées et signalés aux USA et en Nouvelle-Zélande. Les haplotypes identifiés en France sont le D et le E (Hajri et al., 2017).
5. Depuis quelques années, des mesures à l’encontre de CLso sont prises dans certains pays, impactant fortement les importations de semences de carottes depuis la France. Or, depuis 2017, plusieurs études ont pu affirmer que la transmission de la bactérie de la semence à la culture de consommation n’est pas démontrée. Ainsi les autorités des pays d’importation n’ont plus d’arguments scientifiques rationnels pour interdire l’introduction de semences de carottes.

# Historique des études

Depuis 2015, plusieurs études sur la transmission de la bactérie Candidatus Liberibacter Solanacearum par les semences de carottes ont été réalisées :

* En 2015, la publication Bertolini et al. (2015) concluait que Lso pouvait être transmise des semences aux plants de carottes.

Cette publication a eu pour conséquence la mise en place de mesures strictes sur les importations des semences de carottes en provenance d’Europe, dont la France, dans certains pays.

Or, par la suite, plusieurs études ont permis d’apporter de nouvelles preuves scientifiques sur la non-transmission de la bactérie par les semences de carotte **:**

* L’ANSES, Agence Nationale Sécurité Sanitaire Alimentaire Nationale en France, a réalisé des travaux d’ampleur sur le Lso : les résultats des deux études de Loiseau et al. 2017a et b n’ont pas permis de démontrer la transmission Lso de la semence aux plants et montrent que la semence n’est pas un vecteur de la maladie.
* Plusieurs études réalisées par des chercheurs japonais soutiennent également que la transmission de la bactérie par la semence est peu probable.
* L’étude israélienne, Mawassi et al. (2018), l’étude finlandaise, Haapalainen, M. et al. (2018) ainsi que l’étude italienne, Carminati et al. (2019), ont également obtenu des résultats similaires concluant la non-transmission de CLso.

Pour résumer, aujourd’hui **7 études**, réalisées par des organismes différents et indépendants, ont pu démontrer **l’absence de transmission** de la bactérie par les semences de carotte et contredisent l’étude de Bertolini et al. (2015), qui est **la seule étude** qui soutient que CLso est **transmissible** par la semence :

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **Date** | **Etudes** | **Conclusion sur la transmission de CLso sur la semence** |
| 2015 | **Bertolini et al. (2015) :**  E. Bertolini; G. Teresani; M. Loiseau; F. Tanaka; S. Barbe; C. Martinez; P. Gentit; M. López y M. Cambra. 2015. Transmission of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ in carrot seeds. PlantPathology 64 (2): 276-285, April 2015. First published: 21 May 2014.  Disponible sur :  <https://bsppjournals.onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/ppa.12245> | Transmission |
| 2017 | **Loiseau, M. et al. (2017a) :**  M. Loiseau, I. Renaudin, P. Cousseau-Suhard, P.-M. Lucas, A. Forveille, and P. Gentit (ANSES). 2017. Lack of evidence of vertical transmission of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' by carrot seeds suggests that seed is not a major transmission pathway. Plant Disease 101(12): 2104-2109, December 2017.  Disponible sur :  <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PDIS-04-17-0531-RE> | Pas de transmission |
| 2017 | **Loiseau, M., et al. (2017b) :**  M. Loiseau, I. Renaudin, P. Cousseau-Suhard, F. Poliakoff, P. Gentit. 2017. Transmission tests of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' by carrot seeds. Acta Horticulturae (1153): 41-46, March 2017.  Disponible sur :  <https://www.ishs.org/ishs-article/1153_7> | Pas de transmission |
| 2017 | **Oishi et al. (2017) :**  M. Oishi, S. Hoshino, Y. Fujiwara, S. Ushiku, Y. Kobayashi, I. Namba. 2017. A comparison of protocols to detect Candidatus Liberibacter solanacearum from carrot seeds, research on the effectiveness of propidium monoazide treatment and evaluation of seed transmission in carrot seeds. Res Bull Plant Prot Japan 53:111–117, March 2017.  Disponible sur [en japonais] :  <https://www.maff.go.jp/pps/j/guidance/r_bulletin/pdf/rb053_016.pdf> | Pas de transmission |
| 2018 | **Haapalainen, M. et al. (2018) :**  M. Haapalainen, J. Wang, S. Latvala, M. T. Lehtonen, M. Pirhonen, and A. I. Nissinen. 2018. Genetic variation of 'Candidatus Liberibacter solanacearum' haplotype C and identification of a novel haplotype from Trioza urticae and stinging nettle. Phytopathology 108(8): 925-934, June 2018.  Disponible sur :  <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-12-17-0410-R> | Pas de transmission |
| 2018 | **Mawassi et al. (2018)**  M. Mawassi, O. Dror, M. Bar-Joseph, A. Piasezky, J. M. Sjölund, N. Levitzky, N. Shoshana, L. Meslenin, S. Haviv, C. Porat, L. Katsir, S. Kontsedalov, M. Ghanim, E. Zelinger-Reichert et al. 2018. 'Candidatus Liberibacter solanacearum' Is Tightly Associated with Carrot Yellows Symptoms in Israel and Transmitted by the Prevalent Psyllid Vector Bactericera trigonica. Phytopathology 108 (9):1056-1066, September 2018.  Disponible sur :  <https://apsjournals.apsnet.org/doi/10.1094/PHYTO-10-17-0348-R> | Pas de transmission |
| 2019 | **Carminati et al. (2019)**  G. Carminati, E. Satta, S. Paltrinieri, A. Bertaccini. 2019. Simultaneous evaluation of ‘ Candidatus Phytoplasma’ and ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ seed transmission in carrot. Phytopathogenic Mollicutes. 9, 141–142, January 2019.  Disponible sur :  <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:mollicutes&volume=9&issue=1&article=071> | Pas de transmission |
| 2020 | **Fujikawa, T. et al. (2020) :**  T. Fujikawa, K. Yamamura, K. Osaki, N. Onozuka, M. Taguchi, A. Sasaki, M. Sato. 2020. Seed transmission of ‘Candidatus Liberibacter solanacearum’ is unlikely in carrot. Journal of General Plant Pathology 86:266–273, May 2020.  Disponible sur :  <https://link.springer.com/article/10.1007/s10327-020-00927-1> | Pas de transmission |

# Comparaison des études

A ce jour, l’étude de Bertolini et al. (2015) est **la seule publication** qui suggère la transmission de Lso par les semences de carotte. Toutefois, ses résultats sont controversés car ils n’ont pas pu être confirmés par les études plus récentes :

1. En effet, **les conclusions** de Bertolini et al. (2015) affirment la transmission de Lso de la graine au plant de carotte, or :
   1. L’étude Loiseau et al. (2017b) conclut que la transmission de Lso par les graines n'a pas été confirmée, bien que les lots de semences analysés aient la même origine que ceux utilisés par Bertolini et al. (2015). Les auteurs ont suggéré que l'écart dans les résultats pourrait être dû à des conditions agronomiques différentes.
   2. L’étude Loiseau et al., (2017a) a conduit des nouveaux tests, en utilisant des conditions de culture similaires à celles décrites par Bertolini et al (2015) : cela a permis de confirmer les résultats obtenus lors de leur première expérience.
   3. L’étude Oishi et al. (2017) n’a pas relevé de plantule contaminée par Clso et ne confirme pas la transmission de CLso de la semence au plant.
   4. Selon l’étude Haapalainen et al. (2018), Lso n'a pas été détectée dans les cultures de carottes issues de lots de semences dont l'infection par l'haplotype D Lso était connue. Ce résultat est conforme aux résultats des études de Loiseau et al (2017a, 2017b).
   5. L’étude Mawassi et al. (2018) n’a pas non plus observé la transmission de la maladie par la semence. Elle suggère que les psylles représentent les principaux vecteurs de la maladie.
   6. L’étude Carminati et al. (2019) n’a pas observé non plus de transmission CLso par la semence lors des tests réalisés.
   7. Les tests de l’étude Fujikawa, T. et al. (2020) ont utilisé des lots de semences infectés en provenance de France et ont été réalisés dans les mêmes conditions que les études Bertolini et Loiseau. Les résultats ont attesté que le taux de transmission de la bactérie est négligeable.
2. Concernant **les résultats** de Bertolini et al. (2015) :
   1. Après 6 mois de culture, le taux de plantes infectées relevé s’est avéré hétérogène selon les lots (15 à 42%), or les résultats des autres études ont montré :
      * Dans l’étude Loiseau et al., (2017b), seulement 9 plants positifs au CLso ont été relevés sur 432 plants (soit 2% des cas), alors que le taux d’infection des lots de semences était de 96% à 100%, supérieur au taux d’infection des lots utilisés dans l’étude Bertolini (47 à 94%) : la transmission de la bactérie est donc considérée comme rare et difficilement reproductible.
      * Dans l’étude Fujikawa, seulement 2 à 6% des cas ont été testés positifs : une proportion très faible. L’étude a notamment permis d’évaluer statistiquement le risque d’infection que représente CLso : il a été conclu que la transmission par les semences est fortement négligeable.
      * Dans les études Oishi et Carminati, aucun cas positif n’a été détecté.
      * Dans l'étude de Mawassi, aucun cas positif n’a été détecté alors que 30% des lots de semences étaient initialement infectés.
   2. De plus, dans l’étude Bertolini, les plants positifs au *CLso* ne présentaient **pas de symptômes visibles** (sauf pour un cas spécifique représentant moins de 0.7% de l’échantillonnage).
      * Dans les études Loiseau et al., (2017a&b) et Fujikawa, T. et al. (2020), aucun symptôme n’a été détecté, même sur les cas testés positifs.
   3. En outre, des essais en champs ont été réalisés dans l’étude Bertolini et ont observé qu’au bout de 6 mois, 100% de la parcelle était infectée par la bactérie : ce résultat est à **interpréter avec beaucoup de précautions**, car aucun relevé d’analyse n’a été fourni, ni le détail du protocole expérimental ou les conditions de culture : avec si peu d’informations, il n’est pas possible de conclure que les semences soient le facteur de l’infection de la parcelle, celle-ci pouvant être due aussi à d’autres vecteurs, tels que les psylles.
3. Candidatus Liberibacter solanacearum est identifiée comme une **bactérie vasculaire limitée au phloème** :
   1. La bactérie n’est pas cultivable dans un milieu artificiel et ne peut survivre que dans le phloème de la plante ou un insecte vecteur (Bové, 2006 ; Jagoueix et al., 1994 ; Liefting et al., 2009b). Dans le cas des semences, la bactérie aurait été localisée dans le phloème des téguments des graines (Bertolini et al., 2015 ; Mawassi et al., 2018 ; Haapalainen, M. et al., 2018)
   2. Selon l’étude Loiseau et al. (2017b), plusieurs rapports, ayant pour sujet les organismes nuisibles limités au phloème/xylème, ont conclu que la transmission de ce type de pathogène est très rare et difficilement reproductible (Della Coletta-Filho et al., 2014; Hartung et al., 2014; Lapierre & Signoret, 2004).
   3. Selon l’étude Haapalainen, M. et al. (2018), il se peut que les bactéries détectées dans les semences soient non viables ou inaptes à passer des téguments de la graine à l'embryon: le suspenseur reliant l'embryon au funicule ne contient pas de phloème (Standler et al., 2005). CLso serait donc limitée aux cellules du phloème (Nissine et al., 2014).
   4. Ces données fournissent donc la preuve que la transmission de la bactérie par la semence est peu probable.
4. Les études concluent que **CLso est transmis par un autre vecteur** que les semences : **Les psylles** :
   1. Selon plusieurs études (Munyaneza, 2012 ; Munyaneza, 2016 ; Haapalainen et al., 2017 ; Nissinen et al., 2014) et l’EPPO, la bactérie est connue pour être transmise par les psylles.
   2. Il a été observé que les psylles sont particulièrement abondantes dans les zones où CLso est connue, ce qui en fait le principal vecteur du pathogène (EPPO ; Mawassi et al., 2018).
   3. Lorsque les psylles se nourrissent du contenu du phloème, ils introduisent la bactérie Lso dans le tissu du phloème du tégument de la graine (MPI Pest Risk Assessment, 2015 ; Monger et Jeffries, 2016). Les agents pathogènes transmis par les semences doivent être détectés à partir de l'embryon des semences (Singh et Mathur, 2004)
5. La **répartition géographique des haplotypes de CLSo** dans le monde laisse suggérer que les semences ne transmettent pas la bactérie dans les pays importateurs.
   1. En effet, les trois haplotypes connus infectant la carotte (C, D et E) sont localisés comme tel : l’haplotype C au nord de l'Europe (Suède, Norvège, Finlande et Allemagne) et transmis par T.apicalis ; les haplotypes D et E au sud de l'Europe / Méditerranée (Espagne, France, îles Canaries, Afrique et Israël) transmis par B.trigonica (Alfaro-Fernandez et al.2012a, b; Hajri et al.2017; Munyaneza et al.2010, 2012, 2015; Tahzima et al.2014).
   2. De plus, des travaux récents ont mis en évidence la présence de la bactérie dans les lots de semences européens depuis les années 1970 (Monger et Jeffries, 2018). Du fait de l’intensité du commerce international, la bactérie aurait dû se propager mondialement. Toutefois, on peut supposer que la présence de CLso n’a pas encore été relevée dans les pays importateurs.
   3. Les travaux de Haapalainen et al., (2018) en Finlande ont identifié l’haplotype D sur 2 des 34 lots de semences de carotte importés. Ce haplotype n’a jamais été observé dans les cultures en Finlande, où seul l’haplotype C a été signalé. Etant donné que les semences de carottes ne sont pas produites en Finlande, celles-ci sont exclusivement importées : ainsi, il aurait été probable d’identifier les autres haplotypes de CLso dans les cultures finlandaises, or ça n’a jamais été le cas. Ainsi, tel que l’ont conclu les auteurs de cette publication, cela suggère que les semences de carotte ne sont pas une source majeure de transmission de Lso.
   4. Les travaux de Mawassi et al. (2018) ont quant à eux identifié la présence de l’haplotype D dans les cultures de carottes en Israël. L’origine de CLso dans ce pays est encore inconnue. Plusieurs scénarios ont été envisagés dans cette étude : CLso pourrait être issue de matériels végétaux importés, de la migration de psylles ou bien la bactérie pourrait être présente en Israël depuis longtemps. Des tests ont alors été menés sur des lots de semences importés datant d’il y a 20 ans : ceux-ci ont révélé la présence d’un haplotype similaire à l’haplotype E. L’Israël importe des semences de carotte de pays connus pour avoir CLso : ainsi, il serait probable que les haplotypes C, D et E soient présents dans les cultures israéliennes. Pourtant, les haplotypes C et E n’ont pour l’instant pas été repérés dans les cultures de carotte en Israël.
6. Pour conclure, les résultats de l’étude Bertolini et al. (2015) ont été contestés par les sept études présentées. Ainsi, l’étude ne représente pas à elle seule une preuve suffisante pour démontrer clairement la transmission de CLso par les semences.
   1. Les résultats positifs obtenus par Bertolini et al. (2015) sont très probablement dus à une contamination croisée lors de l'extraction de l'ADN ou de l'amplification par PCR et / ou à une amplification non spécifique d'organismes étroitement liés aux Liberibacter.

# Autres arguments

1. La transmission par la semence n’a pas été clairement démontrée pour les autres espèces Liberibacter (Hilf et al. 2013, Hilf 2011, Van Vuuren et al. 2011).*»*
   1. Chez la pomme de terre, cette bactérie ne se transmettrait pas par les semences véritables (Munyaneza, 2012).
   2. De même, dans les premières études sur la transmission par graines d'agrumes de «Candidatus Liberibacter asiaticus», la possibilité d'une transmission verticale de cette bactérie a été débattue (Tatineni et al. 2008; Tirtawidjaja 1981). Cependant, des recherches intensives menées par Hartung et al. (2010) n’ont jamais permis de découvrir des symptômes typiques de Huanglongbing (maladie du dragon jaune, produit par Candidatus Liberibacter spp.) ni de tests positifs pour ‘Ca. L. asiaticus » au cours des trois années d’essais sur 723 plants issus de graines récoltées sur des agrumes infectés. Actuellement, il n'y a toujours aucune preuve de sa transmission par les graines d'agrumes. Les rapports antérieurs sur la transmission de l'agent pathogène par les semences n'ont jamais été confirmés.
   3. Dans le cadre de travaux internes réalisés par l’ANSES, les plants germés à partir de semences de fruits infectés de tomate, poivron et tamarillo ont tous été testés négatifs au *CLso*.
2. Pour rappel, seules les bactéries CLso d’haplotypes des solanacées (A et B), ainsi que son vecteur *Bactericera cockerelli*, sont inscrits dans la liste A1 de EPPO : « List of pests recommended for regulation as quarantine pests » (selon la version la plus récente de Septembre 2020). Les haplotypes des apiacées (C, D, E) ne sont pas considérés comme des organismes nuisibles de quarantaine potentiels.

# Conclusion

Ces études récentes permettent d’affirmer que **la transmission** de la bactérie Candidatus Liberibacter Solanacearum par les semences de carottes et d’Apiacées **n’est pas démontrée**. Ainsi, les mesures établies par la Turquie pour les importations de semences de carottes (test PCR négatif exigé) ne sont techniquement plus justifiables.

Sur la base de ces sources scientifiques, le **Japon**, la **Nouvelle-Zélande**, deux pays particulièrement restrictifs sur les normes phytosanitaires, ainsi que le **Costa Rica** et l’**Argentine** ont retiré leurs exigences sur Candidatus Liberibacter Solanacearum, en 2020 et 2021.

Nous sollicitons donc les autorités sanitaires préuviennes de bien vouloir retirer les exigences d’analyse PCR de CLso sur les semences de carotte afin que les importations françaises puissent de nouveau être opérationnelles.