

L'identification des gènes impliqués dans le mécanisme de résistance est possible grâce au séquençage de l'ADN.

TESTS MOLÉCULAIRES

DES OUTILS POUR DÉTECTER les résistances

Choisir les herbicides adaptés n'est pas toujours aisé du fait de l'apparition de résistance. La mise au point de tests, simples d'utilisation, pour repérer les parcelles présentant une flore résistante aux herbicides est un atout dans la lutte contre les adventices.

La lutte contre l'apparition de populations résistantes passe par une meilleure connaissance des adventices en vue d'orienter le choix de la famille d'herbicide, en particulier dans un contexte de parcelles à risque. L'élaboration d'un test de résistance, fiable et économique, participe à l'atteinte de cet objectif. ARVALIS - Institut du végétal a ainsi développé un test moléculaire afin d'identifier, dans des populations de ray-grass, la présence d'individus porteurs d'une ou de plusieurs mutations du gène de l'ALS conférant une résistance, liée à la cible, aux herbicides du groupe HRAC B. Les analyses réalisées durant les campagnes 2012 et 2013 montrent que la résistance due à des mutations dans le gène de l'ALS non seulement existe en France mais perdure, en association

à des phénomènes majoritaires de résistance non liés à la cible. Il s'agit principalement pour ces derniers de détoxification (capacité d'un organisme à inactiver des substances toxiques).

Des mutations fréquentes sur ray-grass

Les herbicides inhibiteurs de l'acetolactate-synthase (ALS) sont de plus en plus utilisés, engendrant des problèmes croissants de résistance. Ces derniers peuvent être dus à des mutations ponctuelles dans le gène de l'ALS : il est alors question de résistance liée à la cible.

« **Les résistances** peuvent être dues à des mutations ponctuelles dans le gène de l'ALS : il est alors question de résistance liée à la cible. »

En raison de la vitesse très élevée à laquelle les mutations s'opèrent dans le gène de l'ALS au sein d'une population de ray-grass, le suivi de la résistance aux herbicides ciblé sur le gène de l'ALS

n'a pas été possible par la méthode classique de réplcation de l'ADN (PCR). Le séquençage, enchainement exact de l'alphabet génétique (bases A, T, G, C), partiel ou total du gène est nécessaire pour repérer les sites mutés. Un autre test a donc été développé à partir du génotypage par séquençage pour repérer les 8 sites de mutation présents sur le gène de l'ALS aux positions suivantes: A122, P197, A205, D376, R377, W574, S653, G654.

En 2012, l'application de ce test a permis de cibler 5 mutations, dont les deux plus importantes aux positions 197 et 574, en lien avec les résistances aux trois familles de produits herbicides sulfonylurées, triazolopyrimidines et sulfonilaminocarbonyl triazolinones.

Le test confirme la présence de résistances liées à la cible

Cette technique a été appliquée sur 9 parcelles en 2012 (tableau 1) et 6 parcelles en 2013 présentant des difficultés de déshébage sur ray-grass. Pour chacune des parcelles, 20 plantes ont été prélevées aléatoirement et analysées en laboratoire.

Les résultats confirment la présence de plantes résistantes dans 7 parcelles sur les 15 testées. Sur l'ensemble des 5 sites de mutation étudiés pendant les deux campagnes 2012 et 2013, le site P197 présente des pourcentages de plantes mutées variant de 0 à 45 % en 2012 et de 0 à 95 % en 2013. Une mutation pour le site D376, touchant 50 % des plantes, a été détectée en 2012 sur une parcelle située à Bernienville.

Les mutations identifiées sur le site P197 confèrent aux plantes une résistance à la famille des sulfonylurées, mais leurs effets restent indéterminés sur la famille des triazolopyrimidines et n'ont aucun effet sur la famille des imidazolinones. En d'autres termes, les plantes mutées sont résistantes aux sulfonylurées mais encore sensibles aux imidazolinones.



La vitesse élevée à laquelle les mutations s'opèrent chez le ray-grass provient de son très haut degré de polymorphisme (coexistence de plusieurs formes d'un même gène).

Pour le site D376 la mutation détectée a des effets inconnus sur la résistance des plantes aux trois familles chimiques. C'est la première fois que cette mutation est identifiée en France. Elle génère un nouvel acide aminé, l'acide glutamique, au sein de la protéine issue du gène de l'ALS. Ses effets sur le comportement des plantes vis-à-vis des herbicides sont encore inconnus.

Des résistances de nature différente

Une thèse, cofinancée par ARVALIS - Institut du végétal, est actuellement en cours à l'INRA de Dijon pour étudier le phénomène de résistance non liée à la cible sur Ivraie (ray-grass). La résistance liée à la détoxication des herbicides est majoritaire dans les parcelles. Il est donc important que cette résistance puisse être prise en compte, en complément de la résistance liée à la cible. L'exploitation des données de cette thèse devrait aboutir au développement d'un test complémentaire du séquençage du gène de l'ALS en ciblant les gènes responsables de la détoxication de l'herbicide par PCR quantitative (qPCR). Suite aux premiers résultats obtenus avec le test « ray-grass », ARVALIS - Institut du végétal va étendre son utilisation à d'autres espèces herbacées concernées par des résistances ou susceptibles de l'être : vulpin, brome, coquelicot, etc...

Des résistances liées à la cible mais pas seulement

Le test moléculaire confirme bien la présence de résistances dans certaines parcelles. À l'inverse, plusieurs d'entre elles, ayant des problèmes de déshébage et donc de résistance, n'ont pas été identifiées comme tel par le test. En effet, il n'y a pas de plantes mutées en 2013 sur les parcelles de Ste Croix (01), Iville (27), Dourdan (91) et Mespuits (91) alors que l'efficacité au champ, mesurée en réduction de biovolume, varie entre 0 et 95 %. La raison la plus probable est que ces plantes pos-

RAY-GRASS : plusieurs mécanismes de résistance entrent en jeu

Lieu	Site P197			Site D376			Efficacité biologique au champ en %*
	Sulfonylurées (Atlantis, Archipel...)	Imidazolinones (Imazamox : Nirvana, Cléranda...)	Triazolopyrimidines (Abak...)	Sulfonylurées (Atlantis, Archipel...)	Imidazolinones (Imazamox : Nirvana, Cléranda...)	Triazolopyrimidines (Abak...)	
Val St Germain (91)	45	0	45	0	0	0	3
Le Magneraud (17)	35	0	35	0	0	0	75
Bernienville (27)	25	0	25	50	50	50	10
Autainville (41)	0	0	0	0	0	0	50
Sermaise (91)	20	0	20	0	0	0	8
Coudray (45)	10	0	10	0	0	0	65
Labastidette (31)	0	0	0	0	0	0	63
Saclas (91)	0	0	0	0	0	0	5
Ste Croix (01)	0	0	0	0	0	0	63

*: % d'efficacité d'un herbicide inhibiteur de l'ALS (réduction de biovolume).

R plantes résistantes selon la littérature **S** plantes sensibles selon la littérature **ND** Non Déterminé

Tableau 1 : Résultats du test moléculaire de la campagne 2012 sur ray-grass. Le pourcentage de plantes mutées pour chaque famille d'herbicide est indiqué pour les deux sites de mutation les plus importants : P197 et D376. Les autres sites ne sont pas mutés.

sèdent une résistance non liée à la cible (détoxication) qu'il n'est pas possible de détecter avec le test moléculaire. Or ce type de résistance est la plus répandue chez les graminées résistantes aux inhibiteurs de l'ALS. La méthode d'échantillonnage au sein de la parcelle peut aussi expliquer les divergences entre les résultats du test moléculaire et l'efficacité biologique. Les recherches doivent donc se poursuivre afin de mieux comprendre les phénomènes de résistance non liée à la cible. Ce type de résistance, propre aux graminées, ne peut être diagnostiqué, pour le moment, que par des tests biologiques.

Dicotylédones : des tests spécifiques

Des méthodes de diagnostic moléculaire, par séquençage de la présence de mutations dans le gène de l'ALS, ont également été développées par le CETIOM pour plusieurs espèces de dicotylédones.

La mise au point de la méthode a été rapide pour les espèces chez lesquelles des phénomènes de résistance aux inhibiteurs de l'ALS étaient déjà répertoriés dans le monde. Ainsi, depuis fin 2011, le CETIOM dispose de méthodes de diagnostic validées pour la sanve, la ravenelle, les tournesols adventices et l'ambrosie (*Ambrosia artemisiifolia*). En 2014, le coquelicot a enrichi cette liste.

Pour d'autres espèces comme les géraniums, la mise au point de l'outil de diagnostic a été plus difficile du fait d'une faible quantité de données disponibles. Le gène codant pour l'ALS présentant des variations de séquences entre espèces, un développement et une validation de la méthode espèce par espèce est nécessaire. Le CETIOM dispose aujourd'hui de méthodes d'identification de mutations du gène codant pour l'ALS sur orobanche rameuse, orobanche cumana, ammi-majus ainsi que sur plusieurs espèces de géraniums (*G. dissectum*, *G. columbinum* et *G. rotundifolium*). Ces outils n'ont pas encore pu être validés, faute d'individus résistants observés à ce jour, mais permettront d'être très réactif lorsque des cas de suspicion de populations résistantes apparaîtront.

Emmanuelle Cariou Pham -
e.cariou-pham@arvalisinstitutduvegetal.fr

Lise Gautellier Vizios -
l.gautelliervizios@arvalisinstitutduvegetal.fr

Gaëlle Chupeau - Catherine Vacher

ARVALIS – Institut du végétal

Martine Leflon - leflon@cetiom.fr

CETIOM