

DiagnoVite-LOL: diagnostic rapide des résistances aux herbicides de post- levée chez l'Ivraie (*Lolium* sp.) par séquençage à très haut débit

2017-2018

Christophe Délye (INRA), Séverine Michel (INRA), Ludovic Bonin (Arvalis), Sébastien Poitevin (Arvalis)

Chapeau

Dans les populations des adventices posant le plus de problèmes de résistance, des mutations dans le gène de la cible des herbicides sont généralement un bon marqueur de la présence de résistance. L'avènement des techniques de séquençage dites « de nouvelle génération », qui permettent d'analyser rapidement un très grand nombre d'échantillons, permet désormais d'envisager de développer un outil de diagnostic des résistances « à haut débit ». La preuve de la faisabilité de ce type d'approche a été produite en ciblant l'une des adventices majeures des grandes cultures en France : l'Ivraie ou « ray-grass » (*Lolium* sp.). Cette espèce a évolué des résistances aux principaux modes d'action employés en céréales pour la contrôler en post-levée en sortie d'hiver (herbicides inhibiteurs de l'ALS et de l'ACCase).

Introduction

Le désherbage chimique se trouve aujourd'hui confronté à un double problème. D'une part, une demande sociale de plus en plus concernée par les questions environnementales, qui engendre notamment de nouvelles contraintes réglementaires pour l'utilisation des herbicides. De l'autre, une multiplication des cas de résistance aux herbicides. Prise dans cet étau, la diversité de la gamme d'herbicides disponibles pour les agriculteurs ne cesse de se réduire. Il est donc capital de préserver l'efficacité des herbicides encore disponibles en prévenant l'émergence de résistances, tout minimisant le nombre d'applications. Pour ce faire, il est indispensable de :

- **Détecter** rapidement la présence de plantes résistantes dans les populations d'adventices, afin d'adapter rapidement les pratiques de désherbage. Ceci doit notamment permettre



Fig. 1. Infestation d'Ivraie dans du blé. © C. Délye



d'éviter l'application de traitements en situation de résistance : ces traitements n'auront que peu ou pas d'efficacité, et aggraveront le problème en continuant à sélectionner les plantes résistantes,

Permettre d'évaluer l'efficacité de stratégies de désherbage intégrant pratiques agronomiques non chimiques et applications d'herbicides sur la réduction du risque de sélection de résistances à ces derniers. Ceci implique d'être capable de mesurer la fréquence de plantes résistantes dans les populations d'adventices.

Dans ce contexte, un enjeu prioritaire est le développement d'outils rapides et efficaces pour la détection de résistances aux herbicides. Ces résistances sont causées par des mutations dans le génome des adventices. De telles mutations, une fois identifiées et caractérisées, sont généralement un bon marqueur de la présence de résistances dans les parcelles. Elles peuvent être détectées massivement grâce aux nouvelles techniques de séquençage dites « de nouvelle génération » (NGS), qui permettent d'analyser un très grand nombre d'échantillons simultanément.

En France, plusieurs espèces d'adventices posent un grave problème de résistance (R4P, 2019). En tête de ces espèces, on trouve deux graminées hivernales: les Ivraies ou « ray-grass » (Figure 1) et le Vulpin. Chez ces deux espèces, les résistances aux herbicides de post-levée sont fréquentes et répandues. Les herbicides concernés sont:

- Les inhibiteurs de l'**ACCCase**: « fops » (fénoxaprop, clodinafop, fluazifop, propaquizafop, quizalofop), « den » (pinoxaden) et « dimes » (cléthodime, cycloxydime).
- Les inhibiteurs de l'**ALS**: sulfonilurées (iodosulfuron + mésosulfuron, sulfosulfuron, rimsulfuron...), triazolpyrimidines (pyroxsulame...), imidazolinones (imazamox) et sulfonilaminocarbonyltriazolinones (propoxycarbazone...).

Les résistances à ces deux modes d'action impliquent généralement **un fond de mécanismes de résistance non liée à la cible (détoxification, etc...)** et très souvent associé à des mutations dans le gène de l'**ACCCase** et/ou de l'**ALS**. Les mutations dans ces deux gènes sont bien connues, et peuvent donc être ciblées par un test moléculaire de détection de résistance.

L'objectif de ce projet était de développer un outil moléculaire « haut débit » de diagnostic de la résistance aux herbicides inhibiteurs de l'ACCCase et de l'ALS chez l'Ivraie pour:

- Fiabiliser et faciliter la surveillance des résistances aux herbicides.
- Contribuer à la prévention et à la gestion des résistances aux herbicides.

Une fois validée sur Ivraie, cette approche pourra être ultérieurement étendue à d'autres espèces adventices d'intérêt (Vulpin, Coquelicot, Ambroisie, graminées estivales...).

Toutes les mutations en cause dans des résistances à

Développement d'un outil « à haut débit » de détection des résistances

des herbicides inhibiteurs de l'ALS ou de l'ACCCase connues à ce jour sont localisées dans huit codons de l'ALS et dans sept codons de l'ACCCase (Figure 2).



Fig. 2. Codons du gène de l'ALS et de l'ACCCase dans lesquels se trouvent des mutations en cause dans des résistances aux herbicides.

Le dimensionnement des « runs » (unité d'analyse) de séquençage NGS permet d'envisager de rechercher des mutations conférant une résistance à des herbicides dans l'ensemble de ces 15 codons dans au moins 96 parcelles, en analysant 50 plantes par parcelle (**soient 15 codons criblés dans 4800 plantes par « run »**).

Le principe retenu pour le développement du test a été:

- Collecte de feuilles sur des plantes d'Ivraie provenant de parcelles où le contrôle chimique de cette adventice par des inhibiteurs de l'ALS et/ou de l'ACCCase n'était pas satisfaisant (suspicion de résistance).
- Extraction de l'ADN des 50 plantes de chaque parcelle en mélange (une extraction par parcelle).
- Amplification par PCR des régions de l'ALS et de l'ACCCase portant l'ensemble des codons ciblés partir de l'ADN en mélange contenu dans chaque extraction.
- « Étiquetage » moléculaire des fragments PCR pour retrouver l'échantillon de provenance, donc la parcelle d'origine.
- Séquençage NGS de l'ensemble des fragments PCR étiquetés.
- Analyse de l'ensemble des données grâce à un pipe-line bio-informatique développé à l'INRA. Cette analyse permet la détermination dans chacune des 96 parcelles de la fréquence de chacune des mutations qui y ont été identifiées.

96 parcelles analysées d'un coup

L'échantillonnage de parcelles analysées par le test comportait:

- 42 parcelles dans chacune desquelles 50 feuilles ont été collectées à l'automne 2017.
- 22 parcelles sur lesquelles des semences avaient été collectées en 2014-2015, et 31 sur lesquelles des semences avaient été collectées en 2007. Dans ce cas, les 50 feuilles analysées ont été

collectées sur des plantules issues de ces semences.

L'analyse bioinformatique des 20 millions de séquences obtenues par NGS a permis de rechercher la présence de mutations dans les 96 parcelles analysées. **Seules six parcelles ne contenaient aucune mutation.** Toutefois, **absence de mutations ne signifie pas absence de résistance:** rappelons que la résistance aux inhibiteurs de l'ACCCase comme aux inhibiteurs de l'ALS est

Des mutations partout!

principalement causée par des mécanismes de résistance non liée à la cible (détoxification...) qui ne sont pas détectés par le test utilisé ici.

En ce qui concerne les 90 autres parcelles, au moins une mutation de l'ACCCase a été détectée dans 78 parcelles, et au moins une mutation de l'ALS a été détectée dans 83 parcelles. Ceci indique clairement la présence de résistances aux herbicides agissant sur ces cibles dans les parcelles concernées. La situation est difficile dans 68 parcelles, où au moins une mutation de l'ACCCase et une mutation de l'ALS ont été détectées ensemble.

La fréquence des mutations détectée dans une parcelle varie de 1% (ce qui correspond à une plante hétérozygote mutante dans les 50 plantes analysées) à 93% pour les mutations de l'ALS et à 99% pour les mutations de l'ACCCase.

La fréquence et la distribution géographique des mutations de l'ACCCase et de l'ALS dans les 96 populations d'Ivraie analysées est illustrée sur les Figures 2 et 3.

En ce qui concerne l'**ACCCase**, la mutation la plus fréquente est de loin la mutation **Leu1781** (présence dans 53 des 96 parcelles), qui confère une résistance à tous les inhibiteurs de l'ACCCase sauf le cléthodime. La seconde mutation la plus fréquemment détectée est la mutation **Gly2078** (présence dans 35 parcelles), qui confère une résistance à tous les inhibiteurs de l'ACCCase, cléthodime inclus. Deux mutations au codon **2088**, qui confèrent également une résistance à tous les inhibiteurs de l'ACCCase, sont présentes dans 30 parcelles (dont 19 où la mutation Gly2078 est également présente). Cette situation est facilement explicable: la résistance de l'Ivraie aux inhibiteurs de l'ACCCase utilisés en céréales (« fops » et pinoxaden) peut être due à n'importe quelle mutation de l'ACCCase, et en plus à des mécanismes de résistance non liée à la cible. Par contre, les résistances aux « dimes » (cléthodime, cycloxydime), qui ne sont pas utilisables en céréales, est essentiellement à des mutations aux codons 1781, 2078 et 2088 de l'ACCCase. De ce fait, **un recours aux « dimes en cultures de colza, betterave... pour retrouver un contrôle de l'Ivraie qui a été perdu en céréales aboutit à la sélection de mutations de l'ACCCase donnant une résistance aux « dimes ».**

Du côté de l'**ALS**, les mutations au codon **197** sont les plus fréquentes (présence dans 68 des 96 parcelles). Ces mutations donnent généralement une résistance élevée aux herbicides de la famille des sulfonyles (iodosulfuron + mésosulfuron...) et une résistance variant selon la mutation aux triazolopyrimidines (pyroxsulame). La seconde mutation la plus fréquemment identifiée est la mutation **Leu574**, qui confère une résistance à tous les inhibiteurs de l'ALS (16 parcelles concernées).



Épis d'Ivraie dans du blé. © C. Délye

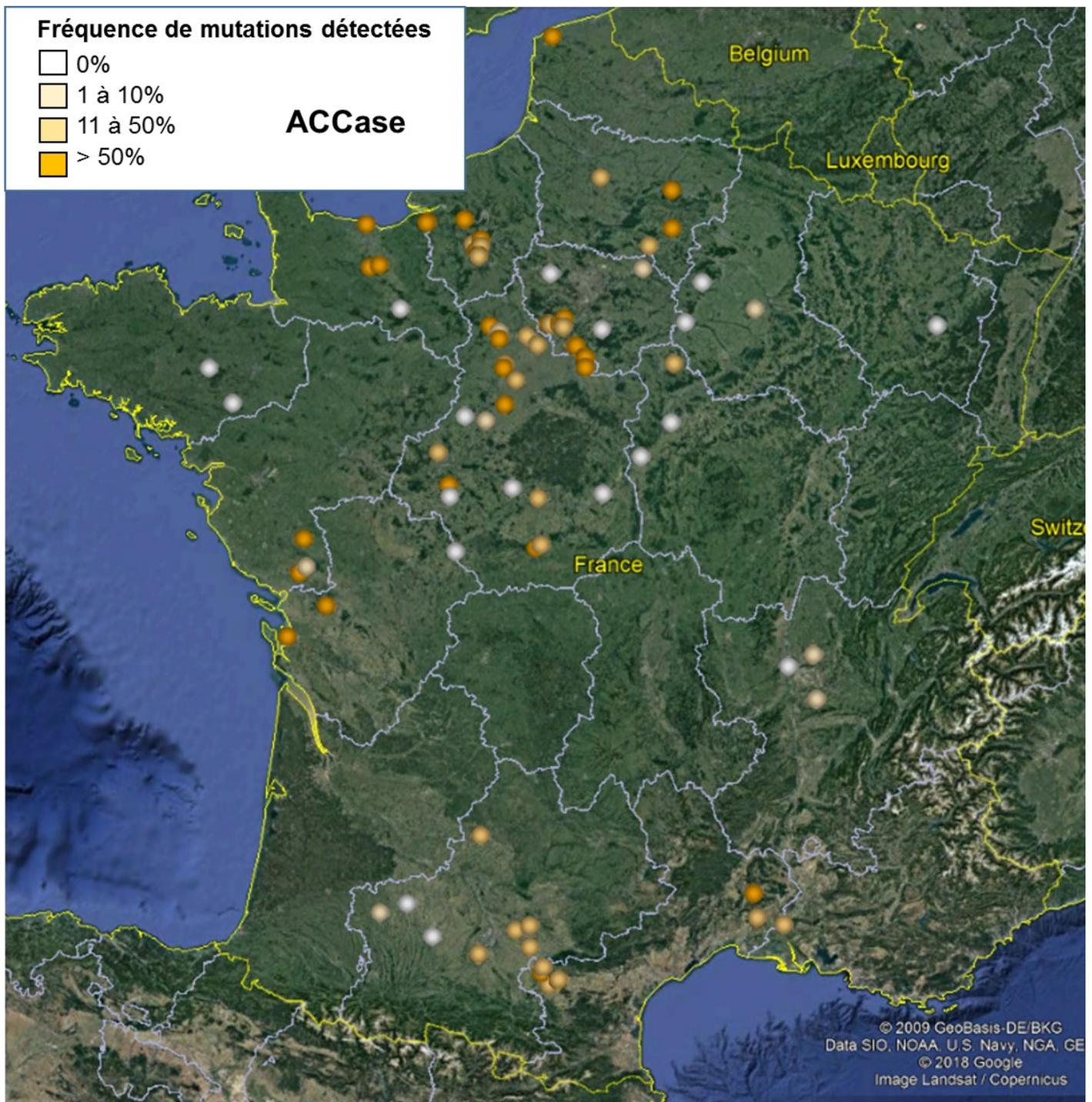


Fig. 3. Distribution géographique des 96 parcelles analysées et fréquence des mutations au gène de l'ACCase dans les 50 plantes d'ivraie qui y ont été prélevées.

Conclusions

Un outil moléculaire de détection des résistances utilisant les technologies des NGS a été développé avec succès. Il permet la recherche de **toutes** les mutations connues pour conférer une résistance à des herbicides dans les gènes de l'ACCase et de l'ALS. La première utilisation de cet outil a permis d'analyser 96 parcelles où des difficultés de contrôle de l'ivraie par des inhibiteurs de l'ACCase et/ou de l'ALS avaient été signalées. La présence de résistance à au moins un des modes d'action étudiés a été confirmée dans 90 des 96 parcelles étudiées.

Le test développé permet la recherche de mutations à

sept codons de l'ACCase et à huit codons de l'ALS grâce à l'amplification par PCR de deux fragments de l'ACCase et trois de l'ALS. L'analyse des 96 échantillons de 50 plantes chacun a nécessité 480 PCR et un run de NGS. La même étude aurait pu être effectuée de manière « classique » par une analyse plante à plante sur la base d'un génotypage par PCR. Ceci aurait nécessité d'utiliser 15 tests de génotypage par PCR (un par codon étudié) sur chacune des 96x50 plantes étudiées, soit 72 000 PCR. Ceci illustre le **gain de temps colossal** permis par le test NGS.

Par ailleurs, le test NGS permet l'identification précise des mutations présentes à un codon donné (par exemple, six mutations différentes ont été identifiées au codon 197 de l'ALS), ce qui n'est pas possible avec les

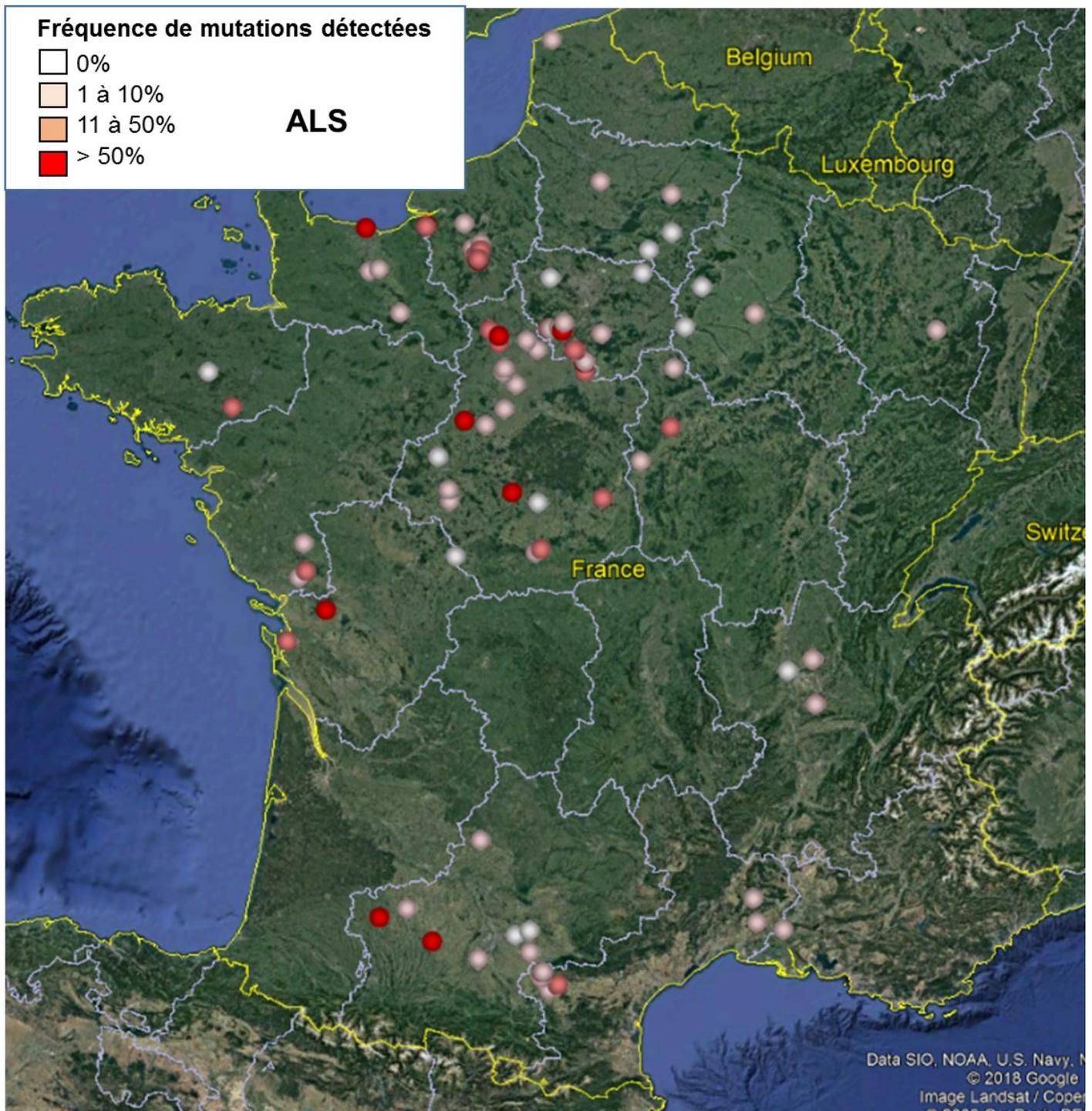


Fig. 4. Distribution géographique des 96 parcelles analysées et fréquence des mutations au gène de l'ALS dans les 50 plantes d'Ivraie qui y ont été prélevées.

tests de génotypage classiques par PCR.

Le seuil de détection du test NGS se situe aux alentours de 1%, c'est à dire une plante hétérozygote mutante parmi 50. Ce seuil est amplement suffisant s'il s'agit de confirmer un cas de résistance déjà avancé (en cas d'échec de traitement). En revanche, un seuil de 1% ne permettrait pas de détecter précocement l'évolution de résistance dans les parcelles, lorsque les plantes résistantes sont en fréquences très faibles (moins de 1%). Cet inconvénient peut être contourné en analysant plusieurs lots de 50 plantes pour une même parcelle. Ainsi, le test NGS pourrait être utilisé pour la recherche précoce de résistances dans les parcelles afin de tuer la résistance dans l'œuf. Il est en

effet bien établi que **plus une résistance est décelée de manière précoce, plus il est facile de s'en débarrasser** en adaptant les pratiques de désherbage pour éliminer les quelques plantes résistantes présentes.

Dernier point mais non le moindre, la mise au point de ce test sur Ivraie valide la pertinence de l'approche « NGS » pour le diagnostic de résistances. **Les potentialités ouvertes sont immenses, quand on songe qu'il des résistances à des herbicides chez au moins 22 espèces d'adventices en France (R4P, 2019), et chez au moins 256 dans le monde (Heap, 2019).**

En savoir plus

Réseau R4P, Statut des résistances en France.

<https://www.r4p-inra.fr/fr/statut-des-resistances-en-france/>

Résistance aux herbicides en grandes cultures: les Ivraies (ray-grass), *Lolium* sp. Fiche pratique associée à la Note commune inter-instituts 2019 pour la gestion des résistances des adventices aux herbicides en grandes cultures. www.r4p-inra.fr/fr/la-note-commune-herbicides-est-en-ligne/

Remerciements

Nous remercions les techniciens d'Arvalis pour leur aide dans la sélection des parcelles à échantillonner.

Soutien financier



Les auteurs



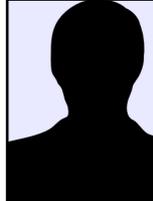
Christophe Délye est chargé de recherches à l'INRA de Dijon, spécialiste de l'évolution des résistances aux herbicides chez les adventices.



Séverine Michel est technicienne de recherche en biologie moléculaire à l'INRA de Dijon.



Ludovic Bonin est spécialiste du désherbage des céréales à paille au sein d'Arvalis.



Sébastien Poitevin est ingénieur en charge des prélèvements au sein d'Arvalis.