



**HAL**  
open science

# Caractérisation de la résistance non liée à la cible aux herbicides inhibiteurs de l'ACCCase et de l'ALS chez le vulpin des champs (*Alopecurus myosuroides*)

Arnaud Duhoux

► **To cite this version:**

Arnaud Duhoux. Caractérisation de la résistance non liée à la cible aux herbicides inhibiteurs de l'ACCCase et de l'ALS chez le vulpin des champs (*Alopecurus myosuroides*). Sciences de l'environnement. 2011. hal-01877351

**HAL Id: hal-01877351**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01877351v1>**

Submitted on 19 Sep 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



2010-2011

Nancy-Université



## Master FAGE

Biologie et Ecologie pour la Forêt, l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité BIPE

Caractérisation de la **résistance non liée à la cible** aux herbicides inhibiteurs de l'ACCCase et de l'ALS chez le **vulpin des champs** (*Alopecurus myosuroides*)

Arnaud Duhoux

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 05/09/2011

Maîtres de stage :

Christophe Délye, Responsable de laboratoire  
& Jeanne Gardin, Doctorante

INRA Dijon, 17 rue de Sully, 21000 Dijon

Tuteur universitaire : Christophe Robin

MASTER FAGE  
Biologie et Ecologie pour la Forêt,  
l'Agronomie et l'Environnement

Spécialité  
BIPE

Caractérisation de la résistance non liée à la cible aux  
herbicides inhibiteurs de l'ACCCase et de l'ALS chez le vulpin  
des champs (*Alopecurus myosuroides*)

ARNAUD DUHOUX

Mémoire de stage, soutenu à Nancy le 05/09/2011

Maîtres de stage : Christophe Délye, Responsable de  
laboratoire & Jeanne Gardin, Doctorante

Tuteur universitaire : Christophe Robin

INRA Dijon, 17 rue de Sully, 21000 Dijon

# Remerciements

---

Je remercie Xavier Reboud pour m'avoir accueilli dans l'UMR Biologie et Gestion des Adventices de l'Inra de Dijon.

Je tiens également à remercier Christophe Délye et Jeanne Gardin, mes maîtres de stage, qui ont su m'accompagner de manière complémentaire durant ces six mois.

Merci Cécile et Fanny pour les compétences et connaissances supplémentaires qu'elles m'ont apportées, ainsi que pour la bonne ambiance qu'elles font régner dans « le couloir » avec Jeanne, Séverine et Solène.

Merci enfin à tout l'UMR BGA pour la qualité de leur accueil.

# SOMMAIRE

Introduction.....	1
1. Contexte général.....	1
2. Définitions et notions de résistance.....	2
2.1. Une pression de sélection intense à l'origine de la sélection de la résistance.....	2
2.2. La résistance non liée à la cible (RNLC).....	3
2.2.1. Mécanisme général de détoxification.....	3
2.2.2. Familles biochimiques impliquées dans la détoxification.....	4
2.3. Résistance croisée et résistance multiple.....	4
2.3.1. Résistance croisée.....	4
2.3.2. Résistance multiple.....	4
3. Le modèle d'étude : la résistance non liée à la cible aux inhibiteurs de l'ACCase et de l'ALS chez le vulpin des champs.....	4
3.1.1. Les groupes d'herbicides étudiés.....	4
3.1.2. Mode d'action des herbicides inhibiteurs de l'ACCase.....	5
3.1.3. Mode d'action des herbicides inhibiteurs de l'ALS.....	5
3.2. Le vulpin des champs.....	6
4. Etat de l'art de la recherche de gènes de RNLC chez le vulpin des champs.....	6
Matériel et méthode.....	7
1. Analyses phénotypiques.....	7
1.1. Objectif.....	7
1.2. Populations et descendance étudiées.....	7
1.2.1. Descendance F1 (CY46H).....	7
1.2.2. Descendance F2.....	7
1.2.3. Populations du champ.....	7
1.3. Tests de sensibilité aux herbicides.....	7
1.3.1. Obtention des individus.....	7
1.3.2. Clonage des individus.....	8
1.3.3. Traitement des clones.....	8
1.3.4. Modalités de notation des phénotypes.....	9
1.4. Cinétique de prélèvement de matériel végétal.....	9
2. Analyses génotypiques.....	9
2.1. Détection de la RLC par génotypage de l'ALS.....	9
2.1.1. Objectifs.....	9
2.1.2. Principe de la dCAPS.....	9

2.1.3.	Protocole de dCAPS .....	10
2.2.	Séquençage de gènes-candidats de RNLC par PCR.....	11
3.	Analyses transcriptomiques.....	12
3.1.	Objectifs.....	12
3.2.	Extraction des ARN totaux (ARNt).....	12
3.3.	Hybridation soustractive suppressive (SSH) .....	12
3.3.1.	Intérêt et principe de la SSH .....	12
3.3.2.	Recherche de gènes-candidats de RNLC à l'haloxyfop par SSH chez le vulpin des champs .....	12
3.4.	RNA-seq .....	13
	Résultats.....	14
1.	Caractérisation phénotypique de la résistance .....	14
1.1.	Recherche de RNLC aux inhibiteurs de l'ALS dans des populations du champ .....	14
1.1.1.	Recherche de résistance à l'Atlantis dans dix populations jamais traitées avec cet herbicide .....	14
1.1.2.	Détection de RLC dans les individus résistants .....	14
1.2.	Recherche de RNLC aux inhibiteurs de l'ALS dans 10 descendances F2 .....	14
1.2.1.	Recherche de résistance à l'Atlantis dans des descendances F2 issues de plantes du champ jamais traitées avec cet herbicide .....	14
1.2.2.	Détection de RLC dans les individus résistants .....	15
1.3.	Profils de résistance des descendances F1 de plantes résistantes aux inhibiteurs de l'ACCase .....	15
1.3.1.	Caractérisation phénotypique multi herbicides .....	15
1.3.2.	Cinétiques de prélèvement .....	16
2.	Recherche de gènes-candidats de RNLC .....	16
2.1.	Identification de gène-candidats de RNLC à l'herbicide Puma (fenoxaprop) par SSH dans la population du champ Vu02018 .....	16
2.1.1.	Identification des gènes surexprimés .....	17
2.1.2.	Identification de gène-candidats de RNLC .....	18
2.1.3.	Identification de groupes fonctionnels potentiellement impliqués dans la RNLC	18
2.2.	Recherche ciblée de gènes-candidats de RNLC .....	20
2.2.1.	Séquence codante du gène de l'ADK chez le vulpin .....	20
2.2.2.	Séquençage de CYP chez le vulpin.....	20
	Discussion.....	20
1.	De la difficulté d'étude de la RNLC .....	21
1.1.	La RNLC : un caractère imprévisible.....	21

1.1.1.	De nombreux gènes de RNLC sont responsables de la résistance du vulpin de champs aux inhibiteurs de l'ACCase et de l'ALS.....	21
1.1.2.	Transmission des gènes de RNLC dans les descendances F2.....	22
1.1.3.	Conséquences agronomiques .....	22
1.2.	La RNLC : un caractère sous l'influence des conditions externes .....	22
2.	Proposition d'un mécanisme global de RNLC.....	23
2.1.	Des mécanismes généraux de RNLC à l'identification de gènes-candidats .....	23
2.2.	Implication de groupes fonctionnels dans les mécanismes de RNLC.....	24
2.2.1.	Un mécanisme de RNLC constitutifs ? .....	24
2.2.2.	Mise en place de mécanismes de RNLC induits et évolution de l'expression des groupes fonctionnels .....	25
	Conclusion et Perspectives.....	26
	Références bibliographiques.....	27
	Annexes.....	31



# Liste des abréviations

---

**2-4 D** : acide 2,4-dichlorophénoxyacétique (substance active herbicide)

**ABC** : transporteur ABC

**ADK** : adénylate kinase

**ACCase** : acétyle-CoA carboxylase

**ADN** : acide désoxyribonucléique

**ADNc** : ADN complémentaire

**AFC2** : Arabidopsis Fus3-Complementing Gene 2 protein kinase

**ALS** : acétolactate synthase

**AFLP** : amplified fragment length polymorphism

**ARN** : acide ribonucléique

**ARNm** : ARN messenger

**ATP** : adénosine triphosphate

**CYP** : cytochrome P450

**dCAPS** : derived cleaved amplified polymorphism

**GST** : glutathion-S-transférase

**GT** : glycosyl transferase

**HRAC** : Herbicide Resistance Action Committee

**pb** : paires de base

**PCR** : polymerase chain reaction

**qRT-PCR** : quantitative reverse transcription PCR

**R** : résistant

**RLC** : résistance liée à la cible

**RNLC** : résistance non liée à la cible

**S** : sensible

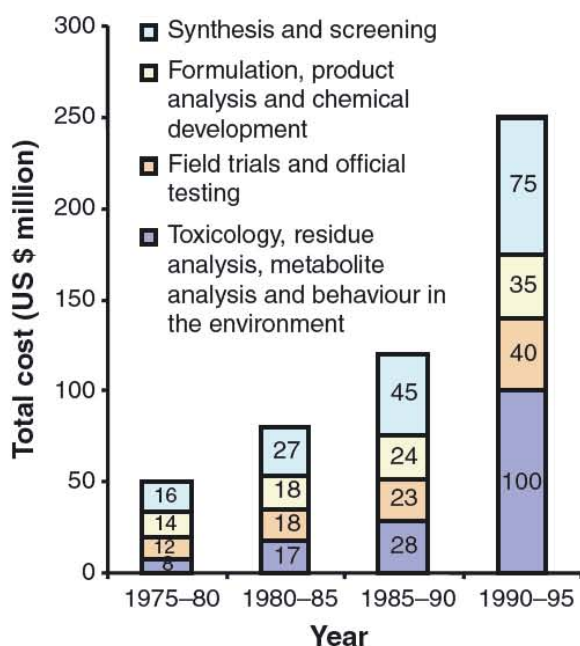
**SSH** : hybridation soustractive suppressive

# Introduction

## 1. Contexte général

Pour nourrir une population mondiale qui ne cesse de croître, la recherche agronomique a toujours cherché à développer de nouvelles technologies visant à augmenter la production agro-alimentaire. Dans ce contexte, l'introduction des pesticides a aidé les agriculteurs à contrôler de manière simple, rapide, efficace et à faible coût de nombreux ennemis des cultures très nuisibles. Les mauvaises herbes constituent la menace la plus préjudiciable (Oerke, 2006), et peuvent engendrer des pertes de rendement atteignant entre un tiers et la moitié de la récolte. Mais l'utilisation systématique des herbicides a des limites et la sélection de mécanismes de résistance aux herbicides dans les populations adventices est la plus préoccupante. Les premiers cas de résistances aux herbicides ont été observés en 1957 à Hawaï et contre le 2-4D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique) (Hilton 1957). Depuis, le nombre de cas de résistance aux herbicides n'a cessé d'augmenter dans le monde et en 2011, 360 populations d'adventices contenant au moins un individu résistant ont été signalées chez 197 espèces monocotylédones et dicotylédones d'adventices (Heap, 2011).

En parallèle à ce problème d'efficacité de la lutte chimique contre les adventices, l'agriculture est soumise à de nouvelles contraintes socio-politiques. Elle doit en effet répondre à des



contraintes environnementales et écologiques qui s'inscrivent dans le plan Ecophyto 2018 et qui a pour finalité à l'horizon 2018, soit en 10 ans, de diminuer de 50% l'usage des pesticides en France, si possible. Or, en appliquant des doses d'herbicides inférieures à celles recommandées, on augmente le risque de sélectionner une résistance (Ruegg *et al.* 2007, Busi *et al.* 2009). Les firmes développant ces pesticides sont elles aussi soumises à des contraintes drastiques pour obtenir de nouvelles autorisations de mise sur le marché (règlement européen EC 1107/2009).

Figure 1: Coûts de développement d'une nouvelle substance active de protection des cultures (Ruegg *et al.* 2007)

Monter un dossier d'homologation pour un nouvel herbicide est très complexe, très coûteux et très contraignant (contraintes toxicologiques et environnementales). D'un côté donc, de plus en plus de substances actives sont interdites sur le territoire français, alors que dans le même temps, peu de nouveaux produits sont commercialisés. Le nombre de substances herbicides disponibles pour les agriculteurs ne cesse ainsi de diminuer. Les produits restants sur le marché pour lutter contre les adventices sont donc utilisés de manière de plus en plus récurrente aggravant le risque de sélection de résistance. Ce cercle vicieux remet même en cause l'utilisation à long terme des herbicides en agriculture si la situation n'évolue pas. **Comment l'agriculteur peut-il lutter contre les adventices, notamment les graminées sur les cultures de céréales d'hiver, si les seuls produits homologués sont sujets à des résistances, ou bien susceptibles de sélectionner rapidement une résistance ?**

## 2. Définitions et notions de résistance

La résistance à un herbicide traduit « la capacité héritable d'une adventice à survivre à un traitement herbicide qui, sous des conditions d'utilisation normales (dose létale recommandée correctement appliquée), réussirait à la maîtriser efficacement » et « à produire une descendance viable » (Gressel 1990).

La sélection d'individus résistants dans une population d'adventices est un processus évolutif, et ce n'est pas l'individu qui change pour devenir résistant ; c'est en fait la fréquence des individus résistants et sensibles dans une population qui change (Powles & Yu 2010).

### 2.1. Une pression de sélection intense à l'origine de la sélection de la résistance

Avant l'application d'herbicides, certains génotypes très peu fréquents peuvent posséder une capacité à résister à des herbicides (Ashigh, 2009). La fréquence initiale des génotypes

#### Génétiques

1. Fréquence des gènes de résistance
2. Nombre de gènes de résistance
3. Dominance des gènes de résistance
4. Coût génétique des gènes de résistance

#### Biologie de l'espèce adventice

1. Autogamie contre allogamie
2. Capacité de production de graines
3. Durée de vie des graines dans le sol
4. Capacité de déplacement des graines et du pollen

#### Herbicide

1. Structure chimique
2. Site d'action
3. Activité résiduelle

#### Application

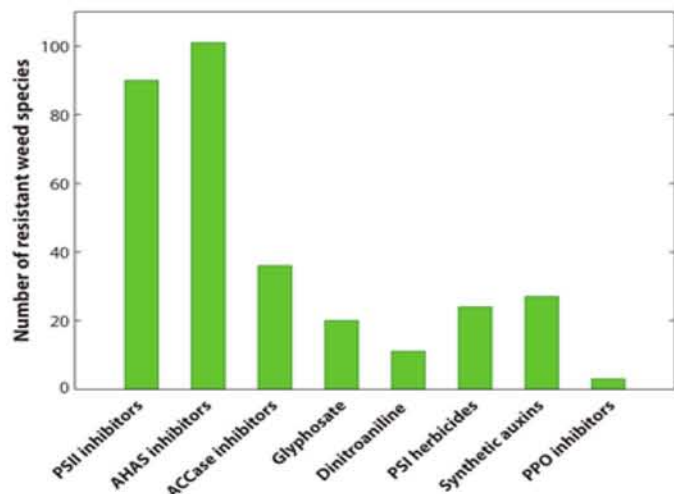
1. Dose d'herbicide
2. Conditions d'application  
(Gauvrit & Lamrani 2008, Ginger G. Light 1999)
3. Facteurs agronomiques  
(rotations des cultures, autres pratiques culturales)

résistants dans la population adventice est très faible, de l'ordre de  $10^{-6}$  à  $10^{-8}$  (Délye 2005, Powles & Yu 2010). Mais si un herbicide est appliqué de manière répétée sur cette population, les individus sensibles sont tués, ce qui confère aux individus résistants un très fort avantage sélectif qui leur permet de proliférer. Au bout d'un nombre variable d'années la fréquence des individus résistants devient préoccupante. Différents facteurs liés à l'espèce adventice et aux caractéristiques de l'herbicide favorisent l'évolution de la résistance (Tableau 1).

**Tableau 1 : Facteurs influençant l'évolution de la résistance dans une population d'adventice (d'après Powles & Yu 2010).**

De même, si les facteurs liés à l'application de l'herbicide diminuent l'efficacité du traitement ou si la dose appliquée est réduite, la pression de sélection exercée sur la population adventice est moindre. Ceci favorise l'évolution de la résistance en sélectionnant des génotypes peu ou moyennement résistants qui sous des conditions optimales de traitement seraient morts (Neve *et al.* 2005, Manalil *et al.* 2011).

Actuellement, les trois groupes d'herbicides ayant sélectionné des résistances chez le plus d'espèces adventices dans le monde sont respectivement les inhibiteurs de l'acétolactate-synthase (ALS), les triazines inhibitrices du photosystème II (PSII), et les inhibiteurs de l'Acétyl-CoenzymeA Carboxylase (ACCCase) (Figure 2). Après le retrait progressif des triazines à partir du début des années 2000 et jusqu'à aujourd'hui, les problèmes de résistance aux herbicides en France touchent principalement deux



**Figure 2 : Nombre d'espèces adventices chez lesquelles des cas de résistance ont été signalés dans le monde (Powles & Yu 2010).**

groupes d'herbicides : les inhibiteurs de l'ACCase et les inhibiteurs de l'ALS. Les inhibiteurs de l'ALS sont utilisés sur dicotylédones et monocotylédones (Gasquez, 2007) alors que les inhibiteurs de l'ACCase sont uniquement graminicides.

## 2.2. La résistance non liée à la cible (RNLC)

L'action d'un herbicide peut se décomposer en trois grandes étapes après application sur la plante : la pénétration de la substance active dans la plante, la translocation au sein de la plante vers le site d'action (la cible biochimique) et l'inhibition de l'activité de la cible. Les mécanismes de résistance interfèrent avec au moins une de ces trois étapes, et peuvent coexister dans un même individu (Délye 2005). La RNLC correspond à tous les mécanismes qui ne sont pas des mécanismes de RLC, à savoir le changement de la conformation de la protéine cible (mutation de cible), l'augmentation de l'activité catalytique de la cible, une mutation de régulation (Baerson *et al.* 2002) ou une multiplication du nombre de copies du gène de la cible (Gaines *et al.* 2009) engendrant une surexpression de la cible.

Les mécanismes de RNLC sont divers et variés, et sont basés sur le métabolisme secondaire des plantes qui leur permet de s'adapter et de survivre face aux stress environnementaux (Yuan *et al.* 2007). Différents mécanismes de RNLC peuvent coexister au sein d'une population voire d'un même individu (Petit *et al.* 2010) : la diminution de la pénétration et de la translocation de l'herbicide dans la plante, la métabolisation exacerbée de l'herbicide, et la séquestration de l'herbicide séparément de sa cible permettent de diminuer la quantité d'herbicide atteignant sa cible et provoquent une chute de son efficacité.

### 2.2.1. Mécanisme général de détoxification

La métabolisation exacerbée des herbicides est le mécanisme le mieux connu. On parle également de détoxification. Les individus faisant intervenir ce type de RNLC dégradent rapidement les substances actives. La différence entre les individus sensibles et les individus résistants réside dans l'activité de dégradation supérieure chez les individus résistants qui leur permet de dégrader l'herbicide assez vite pour éviter qu'il n'ait un effet létal pour la plante. En effet, la détoxification fait intervenir des enzymes présentes chez la plante et ayant pour rôle de protéger les cellules des stress environnementaux en général, et notamment des xénobiotiques en les métabolisant (van Eerd *et al.* 2003). L'augmentation de l'activité de dégradation est la conséquence de l'augmentation de l'affinité de ces enzymes pour leur cible,

et/ou de la surexpression des gènes codant pour ces enzymes, et/ou d'une perception meilleure de la molécule active herbicide. Le mécanisme général de détoxification suit un schéma en quatre phases (Yuan *et al.* 2007) (Figure 3).

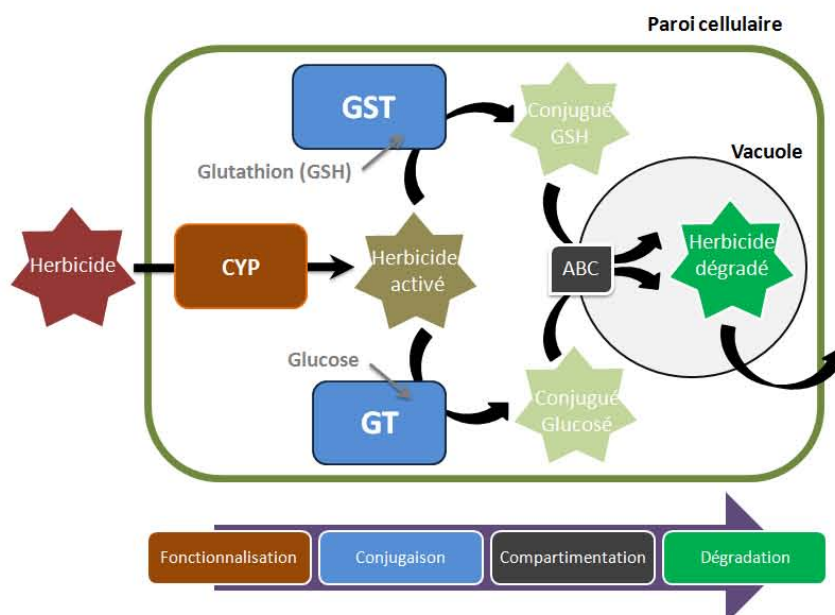


Figure 3 : Activités enzymatiques impliquées dans les quatre phases de la métabolisation des herbicides (D'après Coleman *et al.* 1997, Yuan *et al.* 2007). CYP : cytochrome P450 ; GST : glutathion-S-transférase ; GT : glycosyltransférase ; ABC : transporteurs ABC.

D'abord, les substances actives sont transformées par des réactions d'activation fonctionnelle (oxydation, réduction, hydrolyse...) en composés hydrosolubles (et beaucoup moins toxiques pour la plante); c'est la **phase de fonctionnalisation** qui introduit des groupements fonctionnels nécessaires à l'étape suivante. Lors de la seconde **phase de conjugaison**, les groupements fonctionnels de la substance active sont conjugués à un substrat lui faisant perdre toute sa phytotoxicité et la rendant plus hydrosoluble. Dans un troisième temps, le métabolite conjugué est transporté dans la vacuole ou dans le milieu extracellulaire. Cette **phase de compartimentation** met en jeu des mécanismes de transport actif. Enfin, la quatrième phase consiste à **dégrader le complexe** dans la vacuole grâce à des estérases notamment.

### 2.2.2. Familles biochimiques impliquées dans la détoxification

Si la métabolisation fait intervenir de nombreuses protéines, à ce jour, l'implication dans la résistance par métabolisation exacerbée des herbicides n'a été établie que pour quatre familles d'enzymes (Figure 3):

- des mono-oxygénases à cytochrome P450 lors de la phase de fonctionnalisation par oxydation, isomérisation ou déshydratation (Letouzé & Gasquez 2001).
- des glycosyl-transférases (GT) et des glutathion-S-transférases (GST) lors de la phase de conjugaison à des molécules hydrophobes, respectivement le glucose et le glutathion chez le vulpin des champs (Cummins *et al.* 1999, Brazier *et al.* 2002).
- des estérases qui activent l'herbicide. La résistance est alors provoquée par un défaut d'activation (Cummins *et al.* 2004).

## 2.3. Résistance croisée et résistance multiple

### 2.3.1. Résistance croisée

La résistance croisée désigne le fait qu'un même gène va conférer à la plante une résistance à plusieurs herbicides.

### 2.3.2. Résistance multiple

La résistance est multiple lorsque la résistance à plusieurs herbicides repose sur différents gènes. Plusieurs études montrent l'existence de RNLc croisée ou multiple chez les adventices. En Australie, des individus de Ray-grass (*Lolium rigidum*) ayant développé des résistances suites à la sélection par un inhibiteur de l'ACCase, le diclofop-méthyl, montrent également une résistance aux inhibiteurs de l'ALS sans y avoir été exposés auparavant (Heap & Knight 1982). C'est le cas pour le Chlorsulfuron, une sulfonilurée. Dans la plupart des cas, cette résistance est multiple car elle est le résultat d'une métabolisation exacerbée mettant en jeu plusieurs enzymes comme les cytochromes P450. Il semble néanmoins que dans certains cas, une résistance croisée soit due à la métabolisation catalysée par une seule enzyme de cytochrome P450. Cette enzyme également présente dans le blé est responsable de la sélectivité du chlorsulfuron sur les cultures de blé (Christopher *et al.* 1991).

## 3. Le modèle d'étude : la résistance non liée à la cible aux inhibiteurs de l'ACCase et de l'ALS chez le vulpin des champs

### 3.1.1. Les groupes d'herbicides étudiés

Les premiers herbicides anti-graminée spécifiques, les inhibiteurs de l'ACCase, sont utilisés depuis les années 1960. Ils ont sélectionné aussi bien des mécanismes de RLC que de RNLc dès le début des années 1980 dans le monde et dès 1993 en France, chez plusieurs graminées dont le vulpin des champs (Délye 2005, Heap 2010). Face à la chute de l'efficacité de leurs

produits, la réponse des firmes de la protection des plantes fut alors de faire homologuer de nouveaux produits anti-graminée, possédant un mode d'action différent. Les inhibiteurs de l'ALS n'étaient jusqu'alors efficaces que contre les dicotylédones. De nouvelles substances actives qui étaient efficaces sur les graminées furent alors développées (tout en étant sélectives des cultures de graminée grâce à des molécules phytoprotectrices) et commercialisées. Depuis le milieu des années 2000, elles ont supplanté les inhibiteurs de l'ACCCase. Le premier cas de résistance à ces herbicides détecté chez le vulpin des champs est récent, puisqu'il date de 2006 en France (Délye & Boucansaud 2008).

### **3.1.2. Mode d'action des herbicides inhibiteurs de l'ACCCase**

La biosynthèse des acides gras est primordiale à la survie et au développement des plantes. L'acétyl-coenzyme A carboxylase catalyse la formation du malonyl-CoA en condensant une molécule d'acétyl-CoA avec une molécule de CO<sub>2</sub> en présence d'ATP. Le malonyl-CoA est le premier précurseur de la biosynthèse des acides gras à chaîne ramifiée.

Les inhibiteurs de l'ACCCase sont des herbicides systémiques à pénétration foliaire utilisés en post-levée. Il en existe trois familles : les aryloxyphénoxypropionates (APPs ou « fops »), les cyclohexanediones (CHDs ou « dimes »), et les phénylpyrazolines (« dens ») dont la seule molécule active commercialisée à ce jour est le pinoxaden. Les inhibiteurs de l'ACCCase les plus utilisés sont des fops : le fénoxaprop et le clodinafop. Les inhibiteurs de l'ACCCase sont des inhibiteurs compétitifs de l'acétyl-CoA sur son site de fixation de l'ACCCase. C'est l'ACCCase homodimérique située dans les chloroplastes des poacées qui est ciblée, ce qui bloque la biosynthèse des acides gras. La conséquence physiologique pour la plante est une altération de l'intégrité des membranes cellulaires qui aboutit à leur mort rapide (Devine & Shimabukuro 1994). La génération de peroxydes d'hydrogène cytotoxiques consécutive à l'arrêt de la biosynthèse des acides gras est également citée comme étant une cause primaire de la toxicité des inhibiteurs de l'ACCCase (Cummins *et al.* 1999).

### **3.1.3. Mode d'action des herbicides inhibiteurs de l'ALS**

L'Acétolactate synthase (ALS) est une enzyme dimérique présente chez les plantes et les microorganismes. Elle intervient dans la première étape de la biosynthèse d'acides aminés à chaîne ramifiée. Elle catalyse la formation soit d'acétolactate à partir de pyruvate, et permet ainsi la synthèse de la valine, soit d'acétohydroxybutyrate à partir de 2-kétobutyrate, permettant alors la synthèse de leucine et d'isoleucine (Duggleby *et al.* 2008). L'ALS n'est pas présente chez les animaux ce qui fait des inhibiteurs de l'ALS des herbicides généralement moins toxiques que les inhibiteurs de l'ACCCase (Mazur & Falco 1989, dans Tranel & Wright 2002). Cet argument associé au plus faible grammage à l'hectare (dose d'application au champ dix fois plus faible que les inhibiteurs de l'ACCCase) et au plus large spectre d'action (monocotylédones et dicotylédones) a favorisé leur expansion.

Cinq familles de molécules actives possèdent le même mode d'action, l'inhibition de l'ALS (Annexe). Parmi ces familles, les sulfonilurées sont les substances les plus nombreuses autorisées et appliquées en France, et le mélange (iodosulfuron-mésosulfuron) est selon l'Association Française de la Protection des Plantes (AFPP) l'herbicide le plus utilisé en France sur blé à l'heure actuelle. Toutes ces molécules bloquent la synthèse de la valine, de la leucine ou de l'isoleucine qui aboutit chez la plante à une carence en ces acides aminés engendrant la mort. D'autres mécanismes sembleraient également impliqués dans la toxicité des inhibiteurs de l'ALS, mais ils ne sont pas encore totalement élucidés (accumulation de produits phytotoxiques).

### 3.2. Le vulpin des champs

Le système de culture le plus répandu en France depuis les années 1980, à base de céréales d'hiver, a hautement favorisé les graminées adventices comme le vulpin des champs, et par conséquent l'utilisation répétée des herbicides anti-graminée sur de très grandes surfaces.

Le vulpin des champs (*Alopecurus myosuroides* Huds.) est une plante herbacée annuelle diploïde de la famille des Poacées. C'est une adventice très nuisible en Europe, sur de nombreuses cultures, et particulièrement sur céréales d'hiver et sur colza. En effet, ce type d'assolement crée des conditions favorables pour le vulpin qui a des exigences similaires et un cycle de développement synchrone à celui de ces cultures (sa germination se faisant essentiellement en automne). Sa nuisibilité peut engendrer des pertes de rendement allant jusqu'à 44% de la récolte en céréales (Reade & Milner 2004) et il a été montré en France que son degré d'infestation peut aller jusqu'à une densité de 500 pieds/m<sup>2</sup> dans les cultures de blé (Chauvel *et al.* 1998). Le vulpin des champs est une espèce allogame. Sa pollinisation est anémophile, mais l'essentiel du pollen ne se disperse pas au-delà de 60 mètres, et la dissémination des graines se fait de manière barochore (par gravité à proximité de la plante mère). Une étude a montré que les flux de gènes entre différentes taches d'une même parcelle semblaient très limités (Cavan *et al.* 1998). Cependant, une étude plus large a montré que d'importants flux de gènes ont permis aux mécanismes adaptatifs de résistance aux herbicides de se propager à l'échelle d'un groupe de parcelles (quelques km<sup>2</sup>), notamment par les flux de pollen (Délye *et al.* 2010).

### 4. Etat de l'art de la recherche de gènes de RNLC chez le vulpin des champs

Au sein de l'UMR *Biologie et Gestion des Adventices*, l'unique pôle adventices de l'INRA réunit des écologues, des généticiens et des agronomes pour les étudier. L'unité s'est donné pour mission d'analyser la diversité des adventices et leur évolution en réponse aux modifications de l'agriculture. L'objectif est de réunir les connaissances fondamentales et appliquées nécessaires à une gestion intégrée des infestations adventices limitant l'usage d'herbicides et les impacts environnementaux des systèmes de culture. Deux programmes cadres ont été créés : 1) Diversité des traits biologiques des espèces adventices et leur évolution sous l'effet des pratiques culturales. 2) Influence de l'organisation spatiale et temporelle de la mosaïque de systèmes de cultures et d'espaces non productifs sur le fonctionnement des populations et communautés adventices et sur leurs interactions avec d'autres groupes biologiques. Dans cette optique de limitation de l'usage d'herbicides, une thématique de recherche porte sur l'analyse de l'héritabilité de caractères de variabilité des traits, responsables de l'évolution génétique des populations. Le développement des résistances (RLC et RNLC) aux herbicides est l'un de ces traits.

La RNLC n'a été que très peu étudiée et ce n'est que durant ces dernières années qu'une approche au niveau génétique a été envisagée. La RNLC est due à des différences d'expression et/ou de séquence de gènes entre individus résistants et sensibles (Yuan *et al.* 2007). Le niveau d'expression des gènes s'observe par ailleurs efficacement en quantifiant les premiers produits exprimés : les ARN messagers (ARNm). L'étude du transcriptome du vulpin des champs permet ainsi de déterminer les gènes de RNLC impliqués et surexprimés. Il apparaît que les mécanismes de RNLC font intervenir de nombreuses protéines. Jusqu'à présent, quelques gènes-candidats ont été identifiés chez le vulpin des champs. Nous pouvons citer deux CYP, une GST, une GT, un transporteur ABC et une kinase (adénylate kinase) (Petit 2009). Les objectifs de ce stage sont de fournir de nouvelles données à la fois sur les phénotypes (herbicides concernés) et sur les génotypes en identifiant de nouveaux gènes-candidats pour ensuite valider leur implication dans la RNLC.

# Matériels et Méthodes

---

La caractérisation de plantes vis-à-vis de la RNLC nécessite la mise en place d'une succession d'expérimentations : caractérisation phénotypique des individus, génotypage des résistants pour exclure la présence de RLC, analyses transcriptomiques, séquençage et identification de gènes-candidats de RNLC et enfin, validation du rôle de ces gènes par qPCR (Annexe 1). Une durée de six mois est trop courte pour mener ces expérimentations de la caractérisation phénotypique à la validation de gènes de RNLC sur une seule population. L'étude porte donc sur toutes les étapes du processus de caractérisation, mais ces différentes étapes n'ont pas été effectuées sur les mêmes populations.

## 1. Analyses phénotypiques

### 1.1. Objectif

Caractériser la sensibilité d'individus de vulpin à plusieurs herbicides pour identifier du matériel végétal intéressant pour les étapes suivantes.

### 1.2. Populations et descendance étudiées

Pour utiliser les techniques de biologie moléculaire permettant de détecter des différences d'expression de gènes entre plantes résistantes et sensibles, la production du matériel végétal se porte vers des descendance type F1 et F2. Elles contiennent des individus résistants et sensibles apparentés possédant un patrimoine génétique homogène, ce qui réduit les risques d'observer des différences d'expression de gènes non liées à la RNLC.

#### 1.2.1. Descendance F1 (CY46H)

La descendance F1 CY46H est issue du croisement entre une plante résistante aux inhibiteurs de l'ACCase et d'une plante sensible. Elle a été caractérisée partiellement avant mon arrivée et elle possède environ 50% d'individus résistants au pinoxaden et au clodinafop, deux inhibiteurs de l'ACCase (Petit, 2009). Aucune RLC ACCase et ALS n'est présente.

#### 1.2.2. Descendance F2

Des descendance F2 ont été obtenues avant mon arrivée. Ces plantes sont issues de croisements entre deux individus d'une même lignée F1 sur la base de leur profil de résistance à plusieurs herbicides. Les lignées F1 ont été obtenues de la même manière que la CY46H. Nous avons au total caractérisé dix descendance F2 avec pour chacune un effectif allant de 10 individus à 49 individus. Le détail des croisements à l'origine de ces descendance est renseigné en annexe.

#### 1.2.3. Populations du champ

Dix populations du champ ont été récoltées entre 2001 et 2004 dans des parcelles françaises dans lesquels des cas de résistance aux inhibiteurs de l'ACCase ont été observés. Dans ces populations, nous recherchons des résistants aux inhibiteurs de l'ALS.

## 1.3. Tests de sensibilité aux herbicides

### 1.3.1. Obtention des individus

Des graines issues des différentes populations et descendance de vulpin des champs ont été mises à germer dans des boîtes de Pétri sur du papier Germaflor imprégné d'une solution de  $\text{KNO}_3$  à 3g/L qui sert à lever la dormance. Après germination, les plantules sont repiquées dans des barquettes. Ces étapes sont réalisées dans des modules climatisés à 22°C/jour et



18°C/nuit avec une photopériode de 14h. Chaque plantule est ensuite repiquée dans un godet pour l'individualiser. Les godets, qui occupent une place plus conséquente, sont alors transférés en serre.

### 1.3.2. Clonage des individus

Une fois les plantules individualisées en godets, il faut attendre que la plante talle. Nous utilisons une méthode de clonage par bouturage. Cette méthode consiste à séparer les talles d'une plante de manière à obtenir x clones possédant le même génotype à partir d'une seule plante à x talles. Le clonage nous permet d'effectuer plusieurs répétitions et de passer plusieurs modalités de traitement sur un même individu, et donc sur un même génotype. Seuls les talles qui n'ont pas initié une floraison sont clonés, puis traités une fois enracinés au stade 3-4 feuilles.

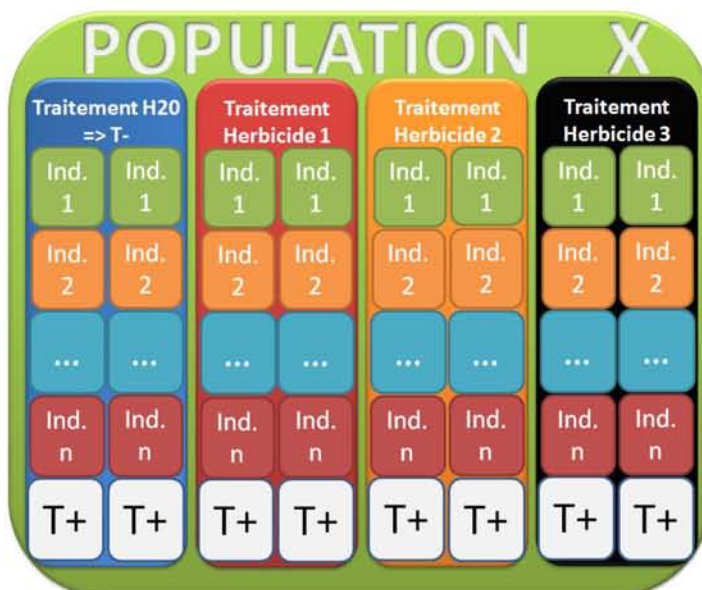
### 1.3.3. Traitement des clones

Les traitements herbicides sont effectués grâce à un banc de traitement simulant le passage d'un pulvérisateur au champ. Il comporte une buse délivrant 300 L.ha<sup>-1</sup> (équivalent eau), à une pression de 400 kPa et à une vitesse de 6,6 km/h (cf. Délye *et al.* 2008). Les herbicides utilisés sont appliqués à la dose recommandée au champ (Tableau 2) et avec leur éventuel adjuvant.

Tableau 2 : Herbicides utilisés pour la caractérisation phénotypique de la population F1 CY46H

Matière active	Herbicide-Fabricant (dose recommandée)	Mode d'action	Famille chimique
iodosulfuron+mésosulfuron	Atlantis-BayerCropscience (3g/ha iodo+15g/ha méso)	Inhibiteur de l'ALS	Sulfonylurée
haloxyfop	Eloge-Dow (40g/ha haloxyfop)	Inhibiteur de l'ACCase	Aryloxyphénoxypropionates
clodinafop	Celio-Syngenta (30g/ha clodinafop)		
quizalofop	Pilot-Philagro (60g/ha quizalofop)		

Nous appliquons la modalité « Traitement Herbicide» à 2 clones de chaque individu (2 répétitions) et pour chaque herbicide (Figure 4). Un contrôle de l'efficacité du traitement est



réalisé grâce au traitement de deux clones d'une plante sensible de référence issue d'une population contenant 100% de plantes sensibles à tous les herbicides testés. Une modalité « pulvérisation H2O » est également appliquée à 2 clones de chaque individu pour comparer les clones traités à un témoin non traité et pour s'assurer que le phénotype observé est bien la conséquence du traitement herbicide.

Figure 4 : Dispositif expérimental d'un traitement multi herbicides ; Ind. = Individu ; T+ témoin positif de l'efficacité des traitements = individu sensible de référence ; T- témoin négatif = traitement à l'eau.

La salle de traitement est climatisée à une température de 20°C et l'hygrométrie y est d'environ 80%. Ces conditions doivent permettre une pénétration foliaire optimale de l'herbicide dans la plante (Gauvrit, 1996). Les clones traités restent dans la salle de traitement deux heures après le traitement et sont ensuite remis en serre.

#### **1.3.4. Modalités de notation des phénotypes**

Nous effectuons une première notation des phénotypes quinze jours après le traitement. Elle consolide les résultats de la notation finale des phénotypes réalisée 30 jours après le traitement. Les phénotypes sont notés de la façon suivante : les clones morts sont classés sensibles (S), les clones vivants et moins développés que les témoins « H<sub>2</sub>O » sont classés résistants mais affectés par le traitement (r) et les clones vivants et aussi développés que les témoins « H<sub>2</sub>O » sont classés résistants (R).

#### **1.4. Cinétique de prélèvement de matériel végétal pour des analyses de transcriptomiques**

Les individus d'une même population ayant les phénotypes sensibles et résistants les plus marqués sont utilisés pour réaliser une cinétique de prélèvement. Nous appliquons la même démarche que pour un test de sensibilité classique, mais nous prélevons des lots de deux clones par individu avant le traitement et de manière régulière après le traitement. Les modalités sont donc les suivantes (Annexe 2) :

- Une modalité « avant traitement » (non traité)
- X modalités après traitement avec des prélèvements à des intervalles de temps différents après traitement (HAT).
- Une modalité « phénotype » pour confirmer le phénotype attendu 30 jours après le traitement (non prélevée)
- Une modalité « H<sub>2</sub>O » pour s'assurer que le phénotype observé est bien la conséquence du traitement herbicide (non prélevée).

Le prélèvement est réalisé en coupant chaque clone à la base du talle, puis en l'immergeant dans de l'azote liquide avant de le stocker à -80°C le plus rapidement possible pour « figer » le transcriptome avant que l'ARN ne se dégrade ou que l'expression des gènes n'évolue. Les prélèvements jusqu'à deux heures après traitement sont effectués dans la salle de traitement. Les clones sont ensuite remis en serre pour les autres prélèvements.

## **2. Analyses génotypiques**

### **2.1. Détection de la RLC par génotypage de l'ALS**

#### **2.1.1. Objectifs**

Vérifier que la résistance d'un individu à un inhibiteur de l'ALS est conférée par des mécanismes de RNLC et non par une mutation de l'ALS. Seules des mutations de l'ALS sur les codons P197 et W574 ont à ce jour été rencontrées chez le vulpin (Délye & Boucansaud, 2008).

#### **2.1.2. Principe de la dCAPS**

La technique dCAPS repose sur une PCR qui crée un site de restriction pour une enzyme, sur le codon où la mutation est recherchée (Figure 5). Lorsque le codon n'est pas muté, le site de restriction est formé par l'extrémité 3' d'une des amorces utilisées et la séquence du codon ciblé. Chez un individu muté, la séquence du codon ne forme pas le site de restriction avec l'extrémité 3' de l'amorce.

L'autre amorce est dessinée pour les codons 197 et 574 de manière à amplifier des fragments de 238 pb et 400 pb respectivement. Ce fragment est amplifié par PCR, puis digéré par l'enzyme adéquat. Lorsque le codon n'est pas muté, l'enzyme coupe le fragment en deux alors qu'un fragment non muté n'est pas digéré. L'amorce utilisée pour créer le site de restriction mesure environ 40 pb pour que l'on puisse observer une différence de taille entre les fragments digérés et non digérés par électrophorèse sur gel d'agarose.

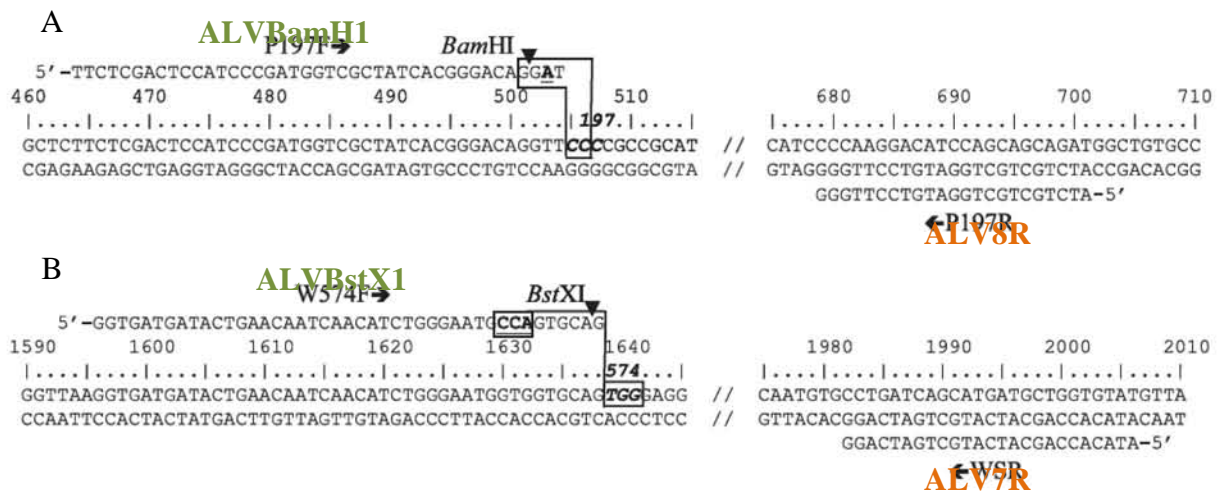


Figure 5 : Position des amorces et des sites de restriction des enzymes BamH1 et BstXI utilisées pour la digestion dCAPS sur le gène de l'ALS sur les codons P197 (A) et W574 (B) (Délye & Boucansaud, 2008). Les amorces forward sont en vert ; les amorces reverse sont en orange. Le site de restriction des enzymes est encadré et la position de la coupure indiquée par une flèche.

### 2.1.3. Protocole de dCAPS

#### Protocole de PCR

L'ADN génomique (ADNg) des individus à tester est extrait par la méthode Brutus (Annexe). Sur le codon W574, une PCR simple suffit à détecter la présence ou l'absence de mutation sur le fragment. Sur le codon P197, nous réalisons une première PCR avec les amorces ALV6 (5'-CAA GCG CGC CGA CAT CCT CGT C-3') et ALV 8R puis une PCR gigogne avec les amorces ALVBamH1 et ALV8R (Figure 5) pour amplifier le fragment.

Pour chaque PCR, un mix de 20 µl est déposé dans un puits de plaque ou dans un tube PCR 0,5 ml. Il est composé de 70 mM Tris-HCl pH=8,8, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 17 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM beta-mercaptoéthanol, 0,05% (wt/vol) polyoxyéthylène-ether W1, 0,2 mg/ml serum albumine bovin, 200 mM de chaque dNTP, 0,5 unités de *Taq* ADN polymérase, et 0,4µM de chaque amorce reverse et forward pour la première PCR de dCPAS sur le codon P197, 0,1µM pour la PCR gigogne de dCAPS sur le codon P197 et 0,2µM pour la PCR de dCAPS sur le codon W574. L'ADNg est ajouté au mix par la technique de tremper de cône qui consiste à attirer un faible volume d'échantillon (< 1 µl) dans le cône d'une pipette par capillarité, puis à le relâcher dans le mix PCR. Le programme PCR utilisé se compose de 5 minutes de dénaturation à 95°C suivies de 37 cycles de 5 secondes de dénaturation à 95°C, 10 secondes d'hybridation des amorces à 65°C pour P197 et à 60°C W574 et de 30 secondes d'élongation à 72°C. Les amplicons sont visualisés par révélation UV après électrophorèse sur un gel d'agarose à 2% ensuite baigné dans du bromure d'éthidium.

### Digestion enzymatique

La digestion du codon P197 est réalisée par l'enzyme de restriction BamH1, à 37°C durant trois heures et celle du codon W574 par BstX1 à 55°C durant trois heures. Les mix de digestion sont les suivants :

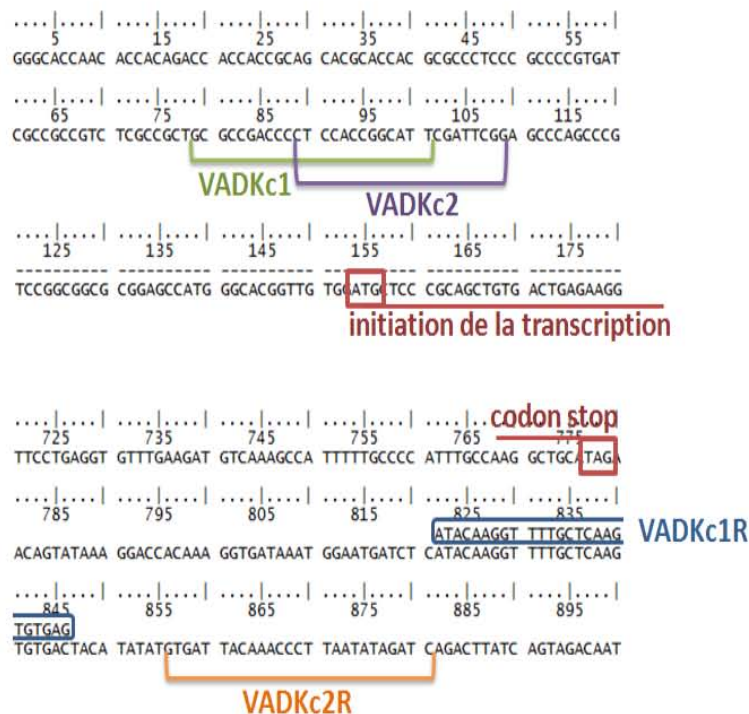
- 5 unités BamH1 + 15 µl BamH1 buffer (Fermentas) + 3 µl H<sub>2</sub>O + 5 µl de mix PCR
- 5 unités BstX1 + 0,5 µl BstX1 buffer (Fermentas) + 4 µl d'H<sub>2</sub>O + tout le mix PCR

Nous faisons migrer l'amplicon digéré par électrophorèse sur un gel d'agarose à 3% et les résultats révélés aux UV sont analysés de la manière suivante :

- Pour P197, on obtient deux fragments pour un individu sensible (200pb et de 38pb) et un seul pour un individu résistant (238pb).
- Pour W574, on obtient deux fragments pour un individu sensible (372pb et de 39pb) et un seul pour un individu résistant (411pb).

## 2.2. Séquençage de gènes-candidats de RNLC par PCR

Quelques gènes intervenant potentiellement dans les mécanismes de RNLC ont déjà été



identifiés, chez le vulpin (Petit 2009). C'est le cas d'une adénylate kinase (ADK). Jusqu'alors, seul un petit fragment de 305 pb de la séquence codante du gène de l'ADK a pu être séquencé, alors que les gènes homologues ont une séquence codante d'environ 800 pb. Ce gène est très conservé chez les poacées et on retrouve des séquences homologues chez le blé (*Triticum aestivum*), l'orge (*Hordeum vulgare*) et le brachypode (*Brachypodium distachyon*).

Figure 6 : Position des amorces utilisées pour amplifier l'ADK sur le gène de l'ADK de l'Orge d'hiver (*Hordeum vulgare*)

Nous avons donc cherché à amplifier le gène de l'ADK de vulpin par PCR sur de l'ADN complémentaire rétro-transcrit (ADN<sub>c</sub>) et de l'ADN<sub>g</sub> de vulpin pour ensuite le faire séquencer par une société spécialisée (Cogenics). Pour cela, il a fallu dessiner des amorces sur les séquences les plus conservées du gène, en se basant sur un alignement des séquences connues (Figure 6). Deux amorces Forward (VADKc1 et VADKc2) et deux amorces Reverse (VADKc1R et VADKc2R) ont été créées et nous avons ensuite ajusté les paramètres (couple d'amorces, concentration des amorces, concentration des ADN<sub>c</sub>, température de ligation des amorces (T<sub>m</sub>), durée d'élongation et PCR gigognes) de la PCR pour tenter d'obtenir une amplification spécifique de l'ADK de vulpin.

De même, il est clairement démontré que des molécules de la famille des cytochromes P450 (CYP) participent aux mécanismes de détoxification d'herbicides chez certaines espèces de Poacées adventices et cultivées (ivraie, panic, blé, orge, maïs). L'implication de ces gènes n'a pas été démontrée chez le vulpin, mais la récurrence de leur implication chez d'autres Poacées en fait des gènes-candidats intéressants. Nous avons essayé d'amplifier quatre de ces CYP

dans le génome du vulpin en utilisant des amorces créées sur la base des séquences de ces autres espèces.

### 3. Analyses transcriptomiques

Les mécanismes de RNLC sont basés sur une surexpression de gènes chez les plantes résistantes par rapport aux plantes sensibles (Yuan *et al.* 2007). Toute technique permettant de mettre en évidence une différence d'expression de gènes est donc pertinente pour ces études. Le génome du vulpin n'est pas séquencé mais sa connaissance n'est pas nécessaire à l'emploi de certaines techniques.

#### 3.1. Objectifs

Identifier et valider le rôle de gènes de RNLC.

Déterminer si ces gènes sont surexprimés de manière induite ou constitutive.

#### 3.2. Extraction des ARN totaux (ARNt)

L'extraction des ARNt des individus est réalisée grâce au kit « RNeasy Plant mini Kit » de Qiagen. Un traitement ADNase est effectué durant l'extraction avec le kit « RNase Free DNase Set » de Qiagen. Les ARNt extraits sont quantifiés à l'aide d'un spectromètre Nanodrop. La pureté de nos échantillons est également vérifiée (ratio A260/A280 proche de 2 et ratio A260/A230 entre 2,0 et 2,2).

#### 3.3. Hybridation soustractive suppressive (SSH)

##### 3.3.1. Intérêt et principe de la SSH

Les ARNm sont une étape transitoire de l'expression des gènes et leur quantité dans le transcriptome est corrélée à un niveau d'expression des gènes. La SSH permet de détecter les ARNm surexprimés abondamment ( $\geq 3$  fois) dans un échantillon (résistants ou avant traitement) par rapport à un autre (sensibles ou après traitement).

La réalisation de la SSH à partir des ARNt se fait comme suit (Annexe 3) : les ARNt sont extraits des individus sélectionnés. Les échantillons de bonne qualité sont rétrotranscrits en ADNc double brin. L'échantillon dans lequel des transcrits surexprimés sont recherchés est appelé *tester* et l'échantillon de référence est appelé *driver*. Ils sont ensuite digérés par RsaI pour produire des extrémités franches. Chaque échantillon « tester » est alors divisé en deux pour être lié à deux adaptateurs double brin différents (Annexe 3, étape 1). Une première hybridation est réalisée entre chaque *tester* et le *driver*, de sorte que les fragments surexprimés chez le « tester » ne s'hybrident pas tous avec le « driver » (Annexe 3, étape 1). Lors de la seconde hybridation, les deux échantillons contenant les *tester* et le *driver* sont mélangés, et les brins simples homologues du « tester » peuvent alors s'hybrider entre eux (Annexe 3, étape 2) pour former des hybrides avec les deux adaptateurs (F). Une enzyme remplit les extrémités (adaptateurs), et les fragments possédant les deux adaptateurs (fragments des gènes surexprimés) sont détectés par l'amplification exponentielle par PCR grâce à des amorces spécifiques se liant aux adaptateurs (Annexe 3, étape 3).

##### 3.3.2. Recherche de gènes-candidats de RNLC à l'haloxyfop par SSH chez le vulpin des champs

###### 3.3.2.1. Cinétique de prélèvement et population étudiée

*Nous avons réalisé une cinétique de prélèvement sur des individus résistants et sensibles de la population F1 CY46H traités au Gallant (inhibiteur de l'ACCase). Les prélèvements ont été réalisés avant traitement (AT), 2 heures après traitement (2HAT) et 6HAT.*

### 3.3.2.2. Protocole de la SSH

Le protocole de la SSH est joint en annexe (Annexe). Elle est réalisée grâce au kit « PCR-select™ cDNA Substraction Kit » de Clontech. La synthèse des ADNc à partir des ARNt est faite avec le kit « PCR-select™ cDNA Synthesis Kit » de Clontech.

### 3.3.2.3. Identification de fragments de gènes-candidats par séquençage 454

Nous avons analysé les résultats d'une SSH réalisée sur la population du champ Vu02018 Les clones ont été traités au Puma LS (inhibiteur de l'ACCase) et prélevés avant traitement (AT) et 2,5HAT.

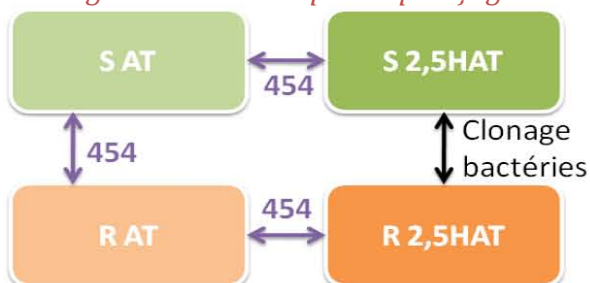


Figure 7 : Carré des comparaisons des quatre modalités de la SSH ; 454 = séquençage 454.

Quatre comparaisons entre les échantillons issus de la cinétique sont réalisées (Figure 7). La notation « comparaison A/B » signifie que l'échantillon A est utilisé comme *tester* et l'échantillon B comme *driver*. La SSH aboutit à un mélange d'amplicons qu'il faut ensuite séquencer individuellement. La comparaison R2,5HAT/S2,5HAT a été étudiée précédemment et les amplicons ont été séquencés suite au clonage individuel dans des plasmides de bactéries. Les fragments de gènes surexprimés des trois autres comparaisons RAT/R2,5HAT, SAT/S2,5HAT et SAT/RAT ont été séquencés par 454 à l'Inra de Toulouse. Le 454 séquence individuellement chaque amplicon présent dans les échantillons. Les séquences obtenues sont ensuite comparées de manière automatisée à la base de données internationale GenBank grâce à l'algorithme Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Cet algorithme cherche les homologies entre la séquence que nous lui proposons et la séquence des gènes de la base de données. Nous ressortons alors le gène codant pour une protéine ayant la plus forte homologie avec notre fragment de gène. L'homologie est traduite dans un indice statistique nommé E-value (expectation-value). Plus cet indice est faible, plus l'homologie est importante et on considère souvent que lorsque l'E-value est supérieure à  $10^{-4}$ , l'homologie avec le gène proposé est trop faible pour être prise en compte.

Les gènes ainsi identifiés sont alors confrontés à la base de données de Gene Ontology (<http://www.uniprot.org/>) qui réfère les fonctions de toutes les protéines codées par les séquences de GenBank, quand elles sont connues. Nous recherchons également certaines fonctions intéressantes de ces gènes dans la littérature.

### 3.4. RNA-seq

Le RNA-seq est basé sur le séquençage du transcriptome. Il permet de quantifier l'expression de l'ensemble des gènes exprimés et apporte également la séquence des transcrits (Wilhelm *et al.* 2009).

Nous avons réalisé une cinétique de prélèvement sur des individus sensibles et résistants de la population CY46H traités à l'Atlantis. Des prélèvements ont été réalisés avant traitement (AT), 2HAT, 6HAT, 12HAT, 24HAT, 36HAT et 48HAT. Les échantillons d'ARN extraits doivent être traités par RNA-seq par la société Fasteris et les résultats analysés à l'Inra de Toulouse.

# Résultats

## 1. Caractérisation phénotypique de la résistance

### 1.1. Recherche de RNLC aux inhibiteurs de l'ALS dans des populations du champ

#### 1.1.1. Recherche de résistance à l'Atlantis dans dix populations jamais traitées avec cet herbicide

Le but est d'estimer la fréquence de plantes résistantes dans ces différentes populations. 37% des individus avaient moins de quatre talles clonables et n'ont pas pu être traités (Figure 8). Cette proportion varie d'environ 10% (*pop 5*) à près de 70% si bien que les populations *pop 6* et *pop 8* n'ont respectivement que 3 et 5 individus caractérisés.

Sur l'ensemble des populations, on observe que 34% des individus traités sont résistants, 50% sont sensibles et 16% ont un phénotype faiblement résistant avec un clone mort et l'autre vivant. Ces fréquences sont en revanche très hétérogènes entre les populations, de 0% de résistant dans la *pop 5*, à 0% de sensible dans la *pop 9*. Notons que les individus ayant un phénotype intermédiaire sont présents dans les populations majoritairement composées d'individus résistants d'une part (*pops 1, 3, 7, 9 et 10*), et dans la population exclusivement composée d'individus sensibles d'autre part (*pop 5*).

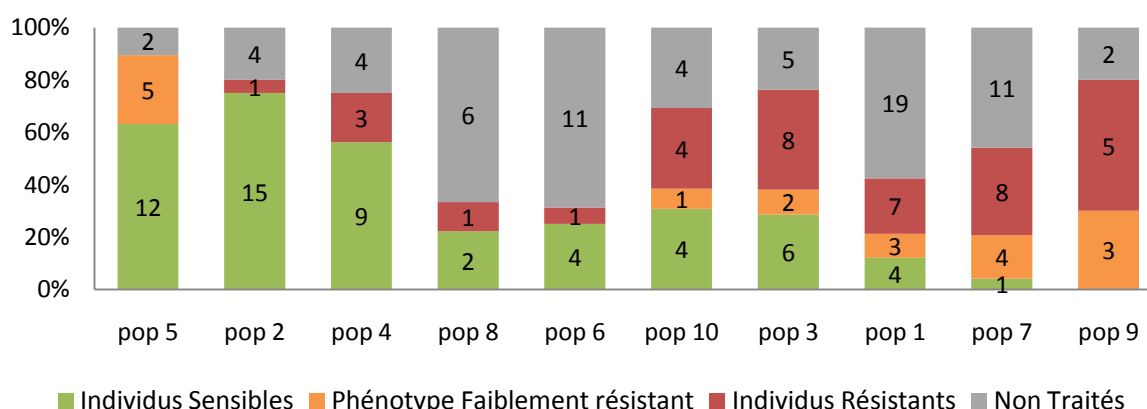


Figure 8 : Caractérisation phénotypique des populations du champ; non déterminés = non traités ; autres = un clone résistant, l'autre sensible.

#### 1.1.2. Détection de RLC dans les individus résistants

Le protocole dCAPS a été appliqué aux 40 individus phénotypés résistants. Aucun individu RLC n'a été détecté.

### 1.2. Recherche de RNLC aux inhibiteurs de l'ALS dans 10 descendance F2

#### 1.2.1. Recherche de résistance à l'Atlantis dans des descendance F2 issues de plantes du champ jamais traitées avec cet herbicide

Certaines descendance possèdent moins de vingt individus (*F2-4, F2-8 et F2-9*) en raison d'une faible production de graines et/ou d'une faible germination (Figure 9). 13% des individus n'ont pas pu être traités. Ce pourcentage est de 50% pour la descendance *F2-9*. Pour les neuf autres, il est au maximum de 20% (*F2-1, F2-3 et F2-4*).

Sur l'ensemble des descendance, on observe que 6% des individus traités sont résistants, 87% sont sensibles et 7% possèdent un phénotype faiblement résistant. La grande majorité des individus est donc sensible. Cependant, ces fréquences varient entre les descendance, de 0% de résistants dans la F2-8, à 40% de résistants dans la F2-9. Notons que les individus dont le phénotype est faiblement résistant sont moins fréquents dans les descendance sans résistants (0% à 14% des individus traités ont un phénotype intermédiaire) que dans celles possédant des résistants (5% à 25% des individus traités ont un phénotype intermédiaire).

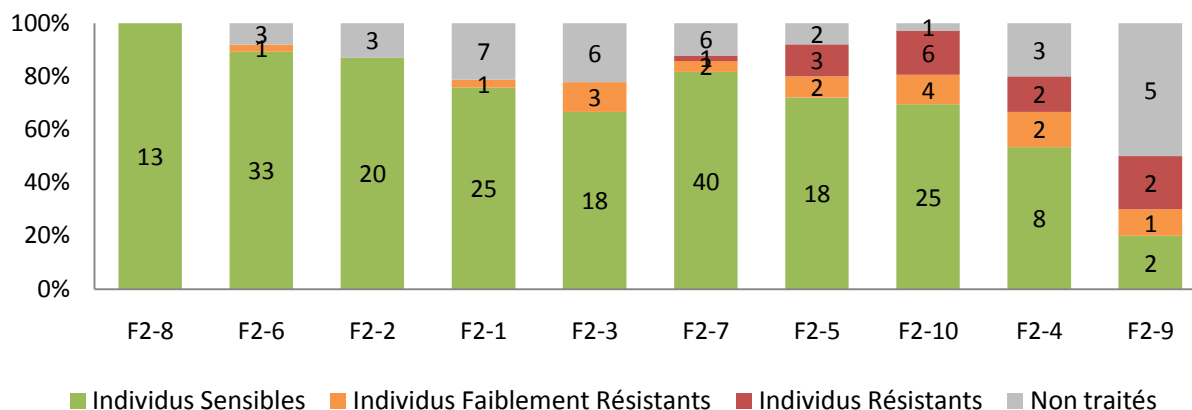


Figure 9 : Caractérisation phénotypique des descendance F2 ; non déterminés = non traités ; autres = un clone résistants, l'autre sensible.

### 1.2.2. Détection de RLC dans les individus résistants

Le protocole dCAPS a été appliqué à tous les individus phénotypés résistants. Aucun individu RLC n'a été détecté.

## 1.3. Profils de résistance des descendance F1 de plantes résistantes aux inhibiteurs de l'ACCase

### 1.3.1. Caractérisation phénotypique multi herbicides

Le phénotype de trente individus de la descendance F1 CY46H a été caractérisé avec l'Atlantis et trois inhibiteurs de l'ACCase (haloxyfop, quizalofop et clodinafop). Les proportions d'individus résistants sur l'ensemble de la population (

Tableau 3) sont :

- de 42% pour l'Atlantis (iodosulfuron+mésosulfuron) ;
- de 90% pour le Celio (clodinafop) ;
- de 38% pour le Gallant (haloxyfop) ;
- de 7% pour le Pilot (quizalofop).

Chacun des trente individus a été traité avec les quatre herbicides. Neuf individus présentent un phénotype faiblement résistant (un clone mort, l'autre vivant) pour au moins un herbicide. Nous avons sept profils phénotypiques différents sur les 21 autres individus dont le phénotype est marqué (pas moyennement résistant) et complet. Un seul individu est sensible aux quatre herbicides utilisés (profil phénotypique P1) et un seul autre individu y est résistants (profil phénotypique P2). Ce dernier individu est le seul résistants au quizalofop. Entre les deux profils phénotypiques exclusivement sensible et exclusivement résistants, trois profils phénotypiques sont observés de manière plus fréquente avec 23,5% (P3 et P5) à 33% (P2) des individus, alors que les deux derniers ne sont représentés que par un seul individu (P4 et P6).

Sur l'ensemble des phénotypes, on ne retrouve jamais d'association systématique de résistance à deux herbicides différents.



Tableau 3 : Profils de résistance à quatre herbicides des individus de la population CY46H

Profil Phénotype	ALS		ACCCase		nombre d'individus	% d'individus
	Atlantis	Gallant	Pilot	Celio		
	iodo/méso	haloxyfop	quizalofop	Clodinafop		
P1	S	S	S	S	1	5%
P2	S	S	S	R	7	33%
P3	S	R	S	R	5	23,5%
P4	R	S	S	S	1	5%
P5	R	S	S	R	5	23,5%
P6	R	R	S	R	1	5%
P7	R	R	R	R	1	5%
<b>% résistants</b>	<b>42%</b>	<b>38%</b>	<b>7%</b>	<b>90%</b>		

### 1.3.2. Cinétiques de prélèvement

#### *Cinétique de prélèvement pour la SSH*

Nous avons sélectionné cinq individus de la population CY46H sensibles et six résistants au Gallant (Annexe) pour réaliser une cinétique de prélèvement destinée à la réalisation d'une SSH. Les phénotypes les plus marqués par rapport au Gallant et aux autres herbicides (résistance multiple) sont choisis, tout en vérifiant *a priori* la capacité des individus à produire des talles. Les témoins phénotypiques sensibles étaient morts au bout de 30 jours. Les résistants étaient très petits, faibles et parfois décolorés. Nous avons effectué une SSH en opposant trois individus sensibles et trois individus résistants.

#### *Problème rencontré pour le RNA-seq*

Nous avons sélectionné quatre individus de la population CY46H sensibles et quatre résistants à l'Atlantis (Annexe) pour réaliser une cinétique de prélèvement.

Nous avons réalisé cette cinétique de prélèvement une première fois en serre. Lors de l'observation des phénotypes, un mois après le traitement du 4 Mai 2011, les clones de sept des huit individus étaient vivants. Le seul individu dont les clones étaient morts était un individu sélectionné comme résistant, et un seul des deux témoins positifs (clones d'une plante sensible de référence) était mort. Les clones non traités (« H<sub>2</sub>O ») étaient vivants. Devant ces résultats douteux, nous n'avons pas extrait l'ARN de cette cinétique de prélèvement. Le matériel végétal nécessaire pour refaire ce traitement a été produit de nouveau et l'expérience a été répétée en Juin sur les mêmes individus. Un mois après le traitement effectué le 31 Mai 2011, tous les clones des individus sélectionnés comme sensibles et comme résistants étaient morts (ainsi que les clones de la plante sensible de référence). Les clones non traités (« H<sub>2</sub>O ») étaient vivants. Encore une fois, nous n'avons pas extrait l'ARN de cette cinétique de prélèvement. Aucun échantillon n'a donc pu être produit qui soit utilisable pour le RNA-seq.

## 2. Recherche de gènes-candidats de RNLC

### 2.1. Identification de gène-candidats de RNLC à l'herbicide Puma (fenoxaprop) par SSH dans la population du champ Vu02018

La fonction biologique des protéines putativement codées par les amplicons séquencés et identifiées par l'algorithme Blast a été recherchée grâce au classement fourni par « Gene

Ontology » pour les modalités RAT/R2,5HAT, SAT/RAT et SAT/S2,5HAT. La modalité de comparaison S2,5HAT/R2HAT avait été analysée préalablement par clonage dans le plasmide de (Petit 2009). Nous avons confronté les résultats de cette modalité avec les trois comparaisons que nous avons étudiées.

### 2.1.1. Identification des gènes surexprimés

Respectivement 66%, 70% et 64% des séquences surexprimées avaient des homologies significatives avec une séquence de GenBank pour les comparaisons RAT/R2,5HAT (60 séquences identifiées), comparaison SAT/RAT (39 séquences identifiées) et SAT/S2,5HAT (41 séquences identifiées).

Le niveau de surexpression des séquences identifiées est exprimé par le *nombre de lectures (read)* des amplicons du gène codant pour cette protéine dans l'échantillon. Le Tableau 4 présente les protéines associées aux amplicons pour lesquels on a les plus grands nombres de lectures. Une kinase (ADK) est particulièrement surexprimée avec des *nombres de lectures* de 626 pour la comparaison RAT/R2,5HAT, de 596 pour la comparaison SAT/S2,5HAT et de 216 pour la comparaison SAT/RAT. En comparaison, le *nombre de lectures* moyen de l'ensemble des fragments au sein d'une modalité est au maximum de 30. Cette kinase est donc énormément surexprimée d'une part chez les individus résistants par rapport aux sensibles, et suite à un traitement herbicide. D'autres protéines, et notamment des kinases, sont également fortement surexprimées (Tableau 4).

Tableau 4 : gènes les plus surexprimés dans les modalités étudiées

Modalité	RAT /R2,5HAT	SAT /RAT	SAT /S2,5HAT	S2,5HAT /R2,5HAT	Blast X
Méthode de séquençage	454			Bactéries	
Séquence présentant la plus forte homologie	Nombre de read			Nombre de transcrits	E-value max
<b>UMP/CMP kinase (ADK)</b>	<b>626</b>	<b>216</b>	<b>596</b>	<b>36</b>	6,00E-06
hexose transporter		98			0,003
metalloendopeptidase	97				1,00E-46
RNA processing factor 1	67				1,00E-46
putative serine/threonine protein kinase	11	63			2,00E-79
SNF1-related protein kinase	61				4,00E-38
GTP-binding protein		58			1,0E-117
male sterility protein 2	6	58			2,00E-30
AFC protein kinase		49			9,00E-05
ATP-dependent Clp protease		48			1,00E-10
diacylglycerol kinase	47				5,00E-11
putative BSD protein			43		8,00E-09
unknown			41		3,00E-52
putative valyl tRNA synthetase			41		3,00E-05

Quatre autres gènes sont présents dans plusieurs comparaisons. La Rubisco est surexprimée dans les trois modalités, avec 42 *lectures* dans la comparaison RAT/R2,5HAT, 20 *lectures* dans la comparaison SAT/ RAT, et 10 *lectures* dans la comparaison SAT/S2,5HAT. Elle est donc plus surexprimée chez les résistants que chez les sensibles avant traitement et suite au traitement herbicide.

Les protéines ribosomales (40S, 50S et 60S) sont largement représentées dans les comparaisons AT/2,5HAT, mais elles n'apparaissent pas dans la comparaison SAT/RAT. On remarque néanmoins que la somme des *nombre de lectures* de ces protéines ribosomales est de 108 pour les résistants, et seulement de 34 pour les sensibles.

Enfin, deux protéines apparaissent dans les comparaisons RAT/R2,5HAT et SAT/RAT : une sérine/thréonine kinase et une protéine de stérilité mâle impliquée dans la réponse au stress oxydatif.

### 2.1.2. Identification de gène-candidats de RNLC

Les gènes-candidats de RNLC sont sélectionnés selon deux critères. Le premier est la détection d'une surexpression du gène dans les modalités RAT/R2,5HAT et SAT/RAT combinée si possible à une absence de détection dans la modalité SAT/S2,5HAT. La seconde est basée sur la connaissance de l'implication d'une protéine de la même famille dans un mécanisme de RNLC. Quatre gènes-candidats codant potentiellement pour des protéines d'intérêt ont été identifiés dans les comparaisons selon ces critères (Tableau 5) :

- Deux kinases, dont une ADK,
- Une protéine de stérilité mâle potentiellement impliquée dans la réponse au stress oxydatif,
- Une glycosyltransférase (GT) potentiellement impliquée dans la conjugaison de l'herbicide à un hexose.

Tableau 5 : Gènes-candidats de RNLC les plus intéressants

nom / région	fonction biologique	Nombre de lectures			Blast X
		RAT/R2,5HAT	SAT/RAT	SAT/S2,5HAT	E-value
UMP/CMP kinase (ADK)	transmission de signal	626	216	596	6,00E-6
serine/threonine protein kinase	transmission de signal	11	63		2,00E-79
male sterility protein	réponse au stress oxydatif	6	58		2,00E-30
glycosyltransferase (GT)	détoxication		12		3,00E-55

### 2.1.3. Identification de groupes fonctionnels potentiellement impliqués dans la RNLC

Les protéines identifiées peuvent être regroupées selon six groupes fonctionnels. Ils sont présentés en annexe (Annexe 4).

#### Métabolisme des protéines

On constate que les gènes du métabolisme des protéines cumulent le plus grand nombre de gènes surexprimés identifiés suite au traitement herbicide (Annexe 4) : respectivement 46% et 43% des gènes surexprimés codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme des protéines pour les comparaisons RAT/R2,5HAT et SAT/S2,5HAT. Cette fonction cumule seulement 15% des gènes surexprimés pour la comparaison SAT/RAT.

Le métabolisme des protéines regroupe des protéines ayant des sous-fonctions différentes parmi lesquels nous pouvons reconnaître la régulation de la synthèse des protéines et la

dégradation des protéines. L'importance de ces sous-fonctions varie selon la comparaison étudiée :

- RAT/R2,5HAT : les  $\frac{3}{4}$  des protéines de ce groupe régulent la synthèse des protéines (protéines ribosomales) ; les protéines de dégradation des protéines sont minoritaires (13% des gènes).
- SAT/S2,5HAT : le nombre de protéines de régulation de la synthèse des protéines (protéines ribosomales) est moins important (44% des gènes) et on observe à l'inverse plus de protéines de dégradation des protéines (37% des gènes).
- SAT/RAT : les protéines de régulation de la synthèse des protéines deviennent minoritaires (20% des gènes), mais seulement cinq gènes codant potentiellement pour des protéines pouvant avoir cette fonction ont été identifiés.

Ces observations suggèrent une biosynthèse de protéines plus active suite au traitement chez les résistants et les sensibles.

### *Métabolisme général*

Les protéines du métabolisme général sont impliquées dans la biosynthèse des lipides et des sucres. Les gènes codant pour des protéines de ce groupe représentent respectivement 10% et 11% des gènes surexprimés identifiés pour les comparaisons RAT/R2,5HAT et SAT/S2,5HAT, contre 22% pour la comparaison SAT/RAT. L'activité de ces voies de biosynthèse semble être réduite suite au traitement herbicide.

### *Transport de molécules et transmission de signal*

Les protéines de transport de molécules sont des protéines transmembranaires et des protéines du cytosquelette. Les protéines de transmission de signal sont des kinases. Les gènes codant pour des protéines de transport de molécules et des protéines de transmission de signal représentent une part variable du nombre total de gènes surexprimés identifiés selon les comparaisons. On remarquera que ces deux groupes fonctionnels occupent à chaque fois la même part : ils représentent chacun seulement 5% à 6% des gènes pour la comparaison SAT/S2,5HAT, 11% pour la comparaison RAT/R2,5HAT, et jusqu'à 15% pour la comparaison SAT/RAT. Les voies de signalisation semblent activées après traitement et chez les résistants.

### *Réponse au stress*

Deux fonctions de réponse au stress ont été identifiées : la réponse à un stress oxydatif interne et la réponse à un stress exogène (température, eau, lumière, xénobiotiques). Les gènes surexprimés codant pour des protéines de réponse à ces stress sont plus nombreux pour la comparaison SAT/S2,5HAT avec 19% des gènes surexprimés identifiés, contre 9% pour la comparaison SAT/RAT et seulement 2% pour la comparaison RAT/R2,5HAT.

### *Photosynthèse*

Des gènes codant pour des protéines de la photosynthèse ont également été identifiés. Ils représentent une part relativement stable d'environ 10% des gènes surexprimés identifiés dans les trois comparaisons. On notera notamment la surexpression dans les trois comparaisons des gènes codant pour des enzymes participant à la synthèse de la Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase (rubisco) et pour des protéines intervenant dans la collecte de l'énergie lumineuse (chlorophylle).

## 2.2. Recherche ciblée de gènes-candidats de RNLC

### 2.2.1. Séquence codante du gène de l'ADK chez le vulpin

Nous avons réalisé deux PCR gigognes : une première PCR avec le couple d'amorces VADKc1/VADKc2R à 1,6µM et un Tm de 60°C et une seconde PCR gigogne en utilisant comme matrice le mix de la première avec le couple d'amorces internes VADKc2/VADKc2R à 1,6µM et un Tm de 60°C.

Un amplicon de 800 paires de bases a été obtenu et séquencé. La séquence a été comparée à la base de données internationale GenBank grâce à l'algorithme Blast X. Le gène le plus proche identifié est celui de l'ADK du riz avec une E-value de  $2.10^{-86}$ . Les deux séquences ont été alignées grâce au logiciel Bioedit (Annexe). Nous avons obtenu ainsi l'intégralité de la séquence codante du gène de l'ADK de vulpin.

### 2.2.2. Séquençage de CYP chez le vulpin

La taille des fragments attendus pour un CYP est entre 1500pb et 1600pb.

- Pour le CYP 71R4, nous avons amplifié un fragment de 1500pb que nous avons séquencé. Le gène obtenu n'est pas homologue à un CYP, mais à une protéine bactérienne.
- Pour le CYP 81A12, nous avons pu amplifier un fragment de 1600 paires de bases en effectuant deux PCR gigognes, mais de manière non spécifique (présence d'autres amplicons). Nous avons isolé ce fragment grâce à une purification sur gel et nous l'avons séquencé. Le gène obtenu n'est pas homologue à un CYP mais à une protéine de fonction inconnue.
- Pour les CYP 71C6V1 et CYP 89B16, nous amplifions des fragments de plusieurs tailles de manière non spécifique à bas Tm, et aucun fragment de plus de 1000 paires de bases au delà de 55°C. Les PCR gigognes ne fonctionnent pas.

Une amorce poly-T a également été utilisée en amorce reverse d'une première PCR sur ADNc. Une amorce Reverse inadéquate peut empêcher d'amplifier le fragment désiré. On utilise alors une amorce poly-T complémentaire de la queue poly-A de l'extrémité du gène avec une amorce gène-spécifique en Forward lors d'une première PCR, puis on réalise une PCR gigogne sur cette matrice. Nous n'avons réussi à amplifier de manière spécifique aucun fragment de la taille des quatre CYP recherchés par cette approche.

# Discussion

## 1. De la difficulté d'étude de la RNLC

### 1.1. La RNLC : un caractère imprévisible

#### 1.1.1. De nombreux gènes de RNLC sont responsables de la résistance du vulpin des champs aux inhibiteurs de l'ACCase et de l'ALS

La caractérisation phénotypique avec quatre herbicides de la population CY46H révèle sept profils phénotypiques différents et souligne une ségrégation indépendante des phénotypes résistants dans ces profils car deux résistances ne sont pas automatiquement associées. Cette observation confirme que des gènes de RNLC différents sont en cause dans la résistance à différents herbicides (Petit *et al.* 2010). L'hypothèse d'une résistance multiple est confirmée. Les plantes du champ utilisées pour le croisement à l'origine de la descendance CY46H n'ont jamais été exposées ni à l'Atlantis, ni au Gallant, ni au Pilot, or on retrouve des individus résistants à ces herbicides dans cette descendance. Certains gènes de RNLC sélectionnés par des inhibiteurs de l'ACCase (Puma) pourraient donc conférer une résistance à des herbicides

avec le même mode d'action (Gallant et Pilot), mais aussi à l'Atlantis possédant un mode d'action différent.

La RNLC à l'Atlantis semble conférée par des gènes sélectionnés par des inhibiteurs de l'ACCase. Une hypothèse propose que de nombreux gènes de RNLC coexistent dans les plantes. Ils confèreraient chacun un niveau de résistance propre à un herbicide pour des herbicides ayant des modes d'action différents, et ce serait la somme du niveau de résistance conféré par l'accumulation de chacun de ces gènes dans une plante qui permettrait à la plante de survivre ou non (Petit *et al.* 2010) (Figure 10).

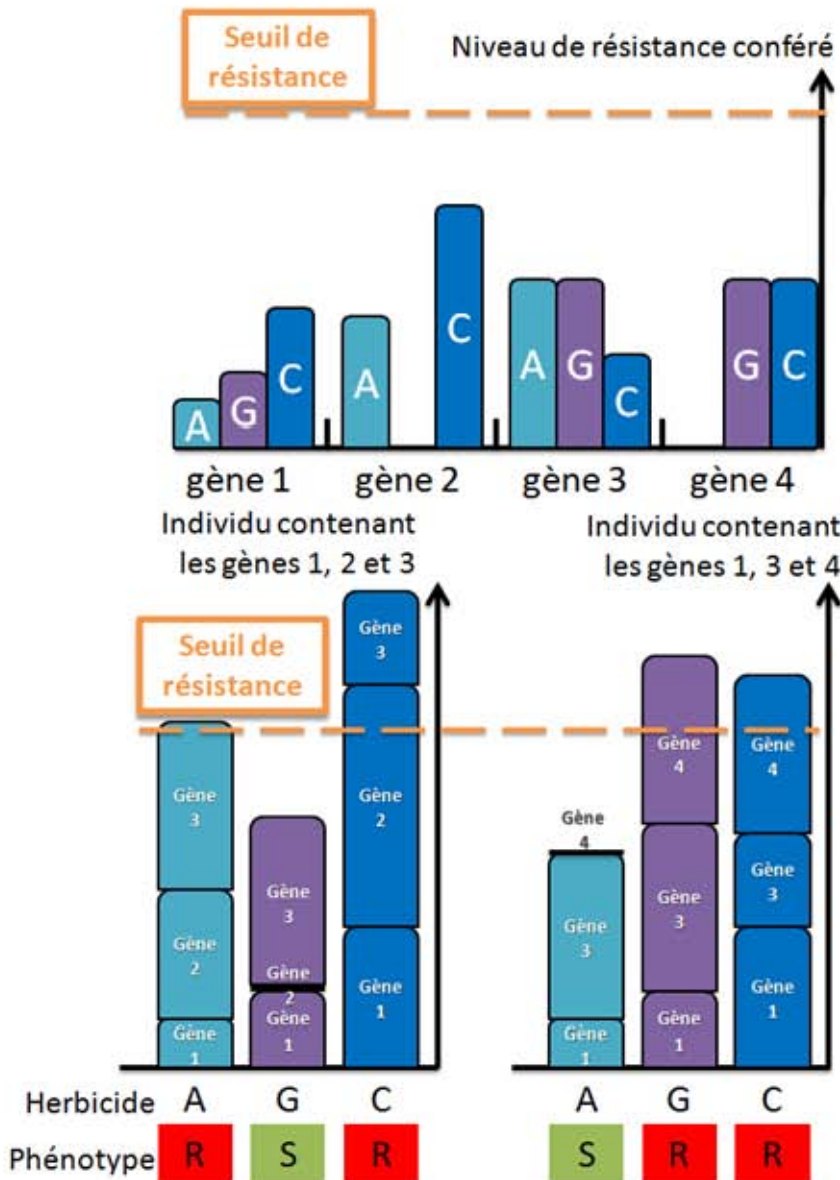


Figure 10 : Illustration de l'acquisition de la RNLC par accumulation de gènes et cumul des niveaux. A : Atlantis ; G : Gallant ; C : Célio ; R = résistant et S = sensible.

Les individus résistants à l'Atlantis et au Gallant sont plus petits et plus faibles un mois après traitement que les résistants au Celio. Cette observation va dans le sens de l'hypothèse présentée si l'on admet que les gènes de RNLC qui ont pu être accumulés dans cette descendance confèrent un niveau de résistance relativement faible à l'Atlantis et au Gallant qui ne les ont pas sélectionnés (Figure 10).

### *1.1.2. Transmission des gènes de RNLC dans les descendances F2*

Les parents des descendances possèdent des profils phénotypiques de résistance aux herbicides inhibiteurs de l'ACCCase et de l'ALS différents (Annexe 5). Les profils phénotypiques avec la résistance au plus grand nombre de substances sont ceux des parents de la descendance F2-5, puis ceux des descendances F2-1, 6, 4 10 et 9. Les parents des autres descendances sont moins résistants. On retrouve logiquement de fortes proportions de plantes résistantes à l'Atlantis dans les descendances F2-5, 10, 4 et 9, mais aucun individu réellement résistant dans les descendances F2-6 et F2-1. On peut supposer que dans le premier cas, les descendants ont hérité suffisamment de gènes de leurs parents pour être résistants (Figure 10). Dans le second cas, les gènes ont été dispersés par la ségrégation, et aucun descendant n'en contient assez pour être résistant. On observera également que les parents des descendances F2-5 et F2-6 présentent un profil phénotypique similaire à la différence près que les premiers sont résistants au Celio alors que les seconds y sont sensibles. Des gènes de RNLC au Celio pourraient donc être impliqués dans le niveau de RNLC à l'Atlantis observé dans la descendance F2-5. Enfin, les descendances issues des parents les plus sensibles aux inhibiteurs de l'ACCCase et de l'ALS ne possèdent pas d'individu résistant car aucun descendant n'a accumulé assez de gènes de RNLC (F2-8, 2 et 3).

Certains descendants sont plus résistants à l'Atlantis que les parents. Plus de gènes de RNLC issus des deux parents ont donc été accumulés dans ces plantes, qui sont donc doublement intéressantes pour la réalisation d'études transcriptomiques : elles possèdent un fond génétique homogène ce qui assure une expression plus homogène du génome entre les individus, et des individus résistants devraient posséder plus de gènes de RNLC que les parents.

### *1.1.3. Conséquences agronomiques*

On notera que tous les herbicides testés sont confrontés à des plantes résistantes dans la population CY46H. Pour le Celio, déjà utilisé sur les plantes mères, on atteint une proportion de résistance de 90%. D'un point de vue agronomique, cet herbicide n'a plus lieu d'être utilisé sur une population de ce type. Le Pilot possède une efficacité plus importante avec 7% de plantes résistantes. Ceci peut être dû à la formulation de l'herbicide qui ne contient pas de molécule phytoprotectrice et qui serait donc plus agressive pour la plante (Cummins et al. 2009), ou au fait qu'il n'est pas sélectionné la résistance. La présence à des proportions de 38% (Gallant) et de 42% (Atlantis) de plantes résistantes à des herbicides jamais utilisés en champ pose un problème agronomique très important. Ces constats soulignent la difficulté de la préconisation et du conseil aux agriculteurs pour lesquels il devient très compliqué de gérer efficacement certaines adventices. Le constat est le même pour les plantes du champ résistantes à l'Atlantis.

Les descendances F2 étudiées suggèrent enfin une évolution relativement complexe et aléatoire de la RNLC d'une année à l'autre, mais qui tend vers l'accumulation de gènes de RNLC dans certains individus qui deviennent de plus en plus préoccupants.

## **1.2. La RNLC : un caractère sous l'influence des conditions externes**

Lors des trois traitements Atlantis effectués sur huit individus de la population CY46H au cours de ce stage, les phénotypes observés ont changé. Le premier traitement effectué le 27

Mars 2011 a donné des phénotypes sensibles et résistants, le second traitement effectué le 4 Mai 2011 a donné des phénotypes principalement résistants, alors que le troisième traitement effectué le 31 Mai 2011 a donné des phénotypes exclusivement sensibles. Le traitement au Gallant d'autres individus de cette population à cette date mène à la même conclusion. La métabolisation des herbicides peut être affectée par des facteurs externes à la plante (Gauvrit 1996). La température a une influence sur l'activité des enzymes. De fortes températures augmentent le pouvoir de métabolisation des herbicides de la plante (Milner *et al.* 2006), mais diminuent au contraire la pénétration et la translocation de la substance active et ainsi l'efficacité du traitement herbicide (Muzik 1964). L'impact de la température sur ces trois traitements herbicides est difficile à évaluer. Les relevés de température (Figure 11) montrent que lors du premier traitement (27 Mars), les températures en journée oscillent autour de 25°C alors que lors du dernier traitement (31 Mai), elles oscillent seulement autour de 20°C. Cette différence de température peut expliquer une moins bonne activité de détoxification chez les individus supposés résistants lors du troisième traitement à l'origine des phénotypes sensibles observés.

L'alimentation en eau peut également affecter la métabolisation de l'herbicide par la plante. Il a été montré que le chiendent est plus sensible au fluazyfop-buthyl (inhibiteur de l'ACCCase) lorsque la capacité de rétention en eau (CR) est de 100% que lorsqu'elle est de 50% (Coupland & Bond 1998). La migration du fluazyfop-buthyl vers les méristèmes ainsi que son activation en fluazyfop sont diminués lorsque la CR est trop faible. Or, les plantes traitées le 31 Mai ont été arrosées abondamment par subirrigation le matin même du traitement. Une CR trop importante peut être la cause de la sensibilité accrue observée. Ces observations alimentent l'hypothèse d'une RNLC complexe et influencée par de nombreux facteurs externes à la plante.



Figure 11 : Températures relevées en serre de J-1 à J+2 autour des jours J de traitement à l'Atlantis (°C)

## 2. Proposition d'un mécanisme global de RNLC

### 2.1. Des mécanismes généraux de RNLC à l'identification de gènes-candidats

Certains gènes peuvent être surexprimés sans pour autant être impliqués dans la RNLC. Ceci est d'autant plus vrai que l'analyse porte sur une population du champ dont le fond génétique n'est pas homogène. Par exemple, la surexpression des gènes de la photosynthèse chez les plantes résistants et suite au traitement herbicide peut être liée au changement des conditions d'éclairage après le traitement, sans lien avec la résistance.

Les gènes-candidats retenus l'ont été pour deux raisons : la première est l'implication connue de protéines de la même famille dans les mécanismes de détoxification. C'est le cas de la glycosyltransférase (GT), car l'implication d'une glycosyltransférase dans la détoxification en conjuguant l'herbicide à une molécule de glucose a déjà été montrée (Cummins *et al.* 1999).



La seconde raison repose sur le fait que ces gènes soient surexprimés dans les deux modalités RAT/R2,5HAT et SAT/RAT, et pas dans la modalité SAT/S2,5HAT. C'est le cas de la sérine/thréonine kinase et d'une protéine de réponse au stress oxydatif (male sterility protein 2). La sérine/thréonine kinase fonctionnerait comme une « unité centrale » qui reçoit des informations liées aux stress environnementaux et qui transmet le signal en faisant évoluer le métabolisme, l'expression du génome, et la croissance des cellules (Hardie 1999). Notons de plus qu'une sérine/thréonine phosphatase possédant une fonction antagoniste à la kinase est surexprimée dans la modalité SAT/S2,5HAT. Cette phosphatase pourrait bloquer la voie de réponse à la présence d'herbicide chez les individus sensibles.

L'ADK est fortement surexprimée chez le *tester* de tous les échantillons, et dans la comparaison S2,5HAT/R2,5HAT. Elle est surexprimée plus fortement dans la modalité RAT/R2,5HAT que dans la modalité SAT/S2,5HAT. Un niveau seuil d'expression pourrait exister et son dépassement pourrait être en partie responsable du niveau de résistance observé. C'est un gène-candidat intéressant, mais qui n'est pas un gène de détoxification. C'est un gène de régulation. Par ailleurs, nous pouvons séparer les gènes de RNLC selon deux types (Petit 2009). D'abord, des gènes « régulateurs » qui perçoivent et transmettent le signal de la présence de substance active (kinases). Ensuite, les gènes « effecteurs » qui participent au mécanisme de détoxification (glycosyltransferase). Reste à savoir si la résistance acquise est le fait de la surexpression des gènes « régulateurs », des gènes « effecteurs », ou des deux.

## 2.2. Implication de groupes fonctionnels dans les mécanismes de RNLC

### 2.2.1. Un mécanisme de RNLC constitutifs ?

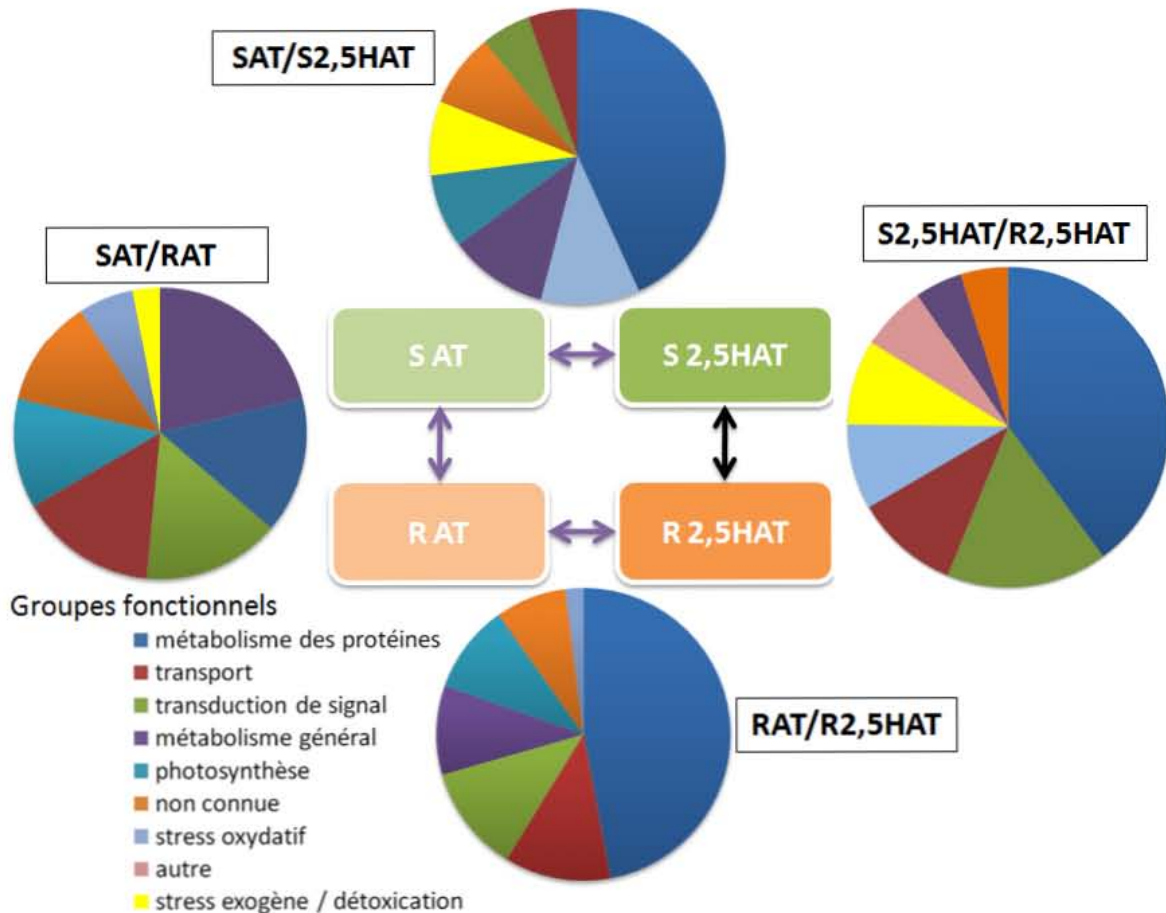


Figure 12 : Proportion des gènes surexprimés selon leur groupe fonctionnel dans les quatre comparaisons.

Des gènes de RNLC peuvent être surexprimés de manière constitutive chez les résistants. Ils sont très intéressants car ce sont ces gènes qui pourraient nous permettre de différencier avant l'application d'un traitement herbicide les plantes résistantes des sensibles. Des gènes de tous les groupes fonctionnels définis sont surexprimés dans la modalité SAT/RAT, mais affirmer leur implication constitutive dans la RNLC est impossible. En effet, nous avons identifié des gènes surexprimés chez les plantes résistantes par rapport aux sensibles, mais d'autres gènes peuvent être surexprimés chez les individus sensibles (Figure 12).

La protéine GT potentiellement impliquée dans le mécanisme de détoxication surexprimée dans les plantes résistantes par rapport aux plantes sensibles avant traitement semble l'être de manière constitutive. Cette possibilité a été démontrée pour un gène codant pour une protéine de la famille des GST chez le vulpin (Cummins *et al.* 1999) et pour l'ADK. Pour résumer, il semble que des mécanismes de détoxication existent dans les plantes résistantes de manière constitutive et que des protéines kinases participent à la régulation de l'activité des protéines effectrices impliquées. Cette surexpression constitutive peut entraîner un coût sur la croissance et/ou la reproduction des individus résistants (Vila Aiub *et al.* 2005).

### *2.2.2. Mise en place de mécanismes de RNLC induits et évolution de l'expression des groupes fonctionnels*

L'hypothèse de l'induction de mécanismes de RNLC supplémentaires suite au traitement herbicide paraît plausible. D'abord, plus de gènes sont surexprimés dans la modalité RAT/R2,5HAT que dans les autres, ce qui suggère la mise en marche de mécanismes spécifiques chez les individus résistants suite à la perception de l'herbicide. Ensuite, la part des fonctions biologiques présentées évolue chez les sensibles et les résistants suite au traitement herbicide. La surexpression de gènes potentiels du métabolisme des protéines est activée par le traitement herbicide, en particulier les protéines ribosomales (Figure 11). Ceci suggère qu'une adaptation de l'expression du génome est induite par le traitement. Des gènes potentiels des voies de biosynthèse des sucres et des lipides sont surexprimés chez les plantes résistantes par rapport aux plantes sensibles avant traitement. Deux hypothèses peuvent être présentées. La première est que le métabolisme est plus actif avant traitement chez les plantes résistantes, hypothèse suggérée par d'autres travaux (Cummins *et al.* 2009). La seconde est que les voies métaboliques actives sont différents chez les sensibles et chez les résistants. Suite au traitement herbicide (SAT/S2,5HAT et RAT/R2,5HAT), ces gènes sont moins nombreux à être surexprimés, et les gènes surexprimés le sont moins fortement. Ces voies pourraient être inhibées par le traitement en réponse au stress perçu.

Le traitement herbicide provoque un stress oxydatif dans la plante qui peut être à l'origine de sa mort (Cummins *et al.* 1999). Les gènes potentiellement impliqués dans la réponse au stress oxydatif et de détoxication sont plus activés suite au traitement herbicide chez les sensibles que chez les résistants (Figure 12). Une étude a montré qu'un gène surexprimé constitutivement chez une plante résistante n'est pas ou est peu induit chez cette plante par rapport à une plante sensible par le traitement herbicide car il est déjà très exprimé (Cummins *et al.* 2009). Cette hypothèse est applicable à ces gènes. S'ils sont déjà au maximum de leur activité chez les résistants avant traitement, on peut percevoir une surexpression suite au traitement herbicide chez les plantes sensibles, mais pas chez les plantes résistantes. Enfin, la SSH ne permet de détecter que les gènes surexprimés plus de trois fois. Des gènes moins surexprimés mais impliqués dans la RNLC, peuvent exister.

# Conclusion et perspectives

---

Nous avons réalisé cette étude afin d'identifier des gènes-candidats de RNLC surexprimés chez les individus résistants par rapport aux sensibles. La première phase consiste à caractériser la résistance phénotypique des individus dans lesquels nous souhaitons rechercher ces gènes. Nous avons pu nous rendre compte que la RNLC est un trait adaptatif difficile à étudier car imprévisible et complexe. En effet, si les mécanismes de RNLC mettent en jeu un bagage protéique important, chaque protéine prise indépendamment ne semble pas indispensable à une plante pour survivre à un traitement herbicide. L'hypothèse d'une accumulation de gènes de RNLC conférant chacun un (faible ?) niveau de résistance et permettant d'atteindre un seuil au delà duquel la plante survit est confortée par cette étude.

Les gènes candidats de RNLC surexprimés chez les résistants par rapport aux sensibles et suite à un traitement herbicide se situent à deux niveaux de la réponse à l'agression : des gènes « régulateurs » qui percevraient l'herbicide et réguleraient les mécanismes de détoxification. Les candidats à ce rôle sont essentiellement des protéines kinases. Certaines kinases semblent être surexprimés de manière constitutive chez les plantes résistantes par rapport aux sensibles. C'est le cas de l'ADK et de la sérine/thréonine protéine kinase qui serait un régulateur central de l'expression du génome et des mécanismes de réponse aux stress. D'autres gènes « effecteurs » seraient directement impliqués dans une étape de la détoxification. Le candidat à ce rôle est une protéine GT, probablement surexprimée de manière constitutive. L'existence possible de mécanismes constitutifs discriminant les plantes résistantes des sensibles est encourageant quant à l'objectif de détection des plantes résistantes avant application du traitement herbicide. Les conditions climatiques non contrôlées durant la période du stage ont freiné l'avancement du processus de caractérisation phénotypique des individus. De nouvelles études menées sous des conditions mieux contrôlées (enceinte ou autre saison) et sur des plantes possédant un patrimoine génétique homogène

L'implication des « gènes-candidats » identifiés ici dans la RNLC doit être validée. Cette étape est réalisée grâce à la technique de PCR quantitative. L'amplification de gènes de références dont l'expression est stable chez tous les individus a été développée pour pouvoir comparer l'expression de l'ADK dans un premier temps, et d'autres gènes-candidats par la suite. L'étape suivante sera de déterminer les « **gènes majeurs de RNLC** » sur lesquels des marqueurs de résistance peuvent donner un diagnostic rapide. Alors, pour boucler la boucle, il sera intéressant d'étudier la dynamique de ces gènes dans les populations, impactée par les conditions environnementales et les pratiques culturales afin d'identifier les leviers d'action pour l'optimisation de l'emploi d'herbicides.

# Références bibliographiques

---

- Ashigh, J., I. Rajcan & F.J. Tardif (2008). Genetics of Resistance to Acetohydroxyacid Synthase Inhibitors in Populations of Eastern Black Nightshade (*Solanum Ptychanthum*) from Ontario. *Weed Science* **56**: 210-215.
- Baerson, S.R., D.J. Rodriguez, M. Tran, Y.M. Feng, N.A. Biest, & G.M. Dill (2002). Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. *Plant Physiology* **129**: 1265-75.
- Brazier, M., D.J. Cole & R. Edwards (2002). O-Glucosyltransferase activities toward phenolic natural products and xenobiotics in wheat and herbicide-resistant and herbicidesusceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Phytochemistry* **59** : 149-156.
- Burton, J.D., J.W. Gronwald, D.A. Somers, J.A. Connelly, B.G. Gengenbach & D.L. Wyse (1987). Inhibition of Plant Acetyl-Coenzyme a Carboxylase by the Herbicides Sethoxydim and Haloxyfop. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **148**: 1039-44.
- Busi, R. & S.B. Powles (2009). Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses, *Heredity* **103**: 318–325.
- Busi, R., M.M. Vila-Aiub & S.B. Powles (2010). Genetic control of a cytochrome P450 metabolism based herbicide resistance mechanism in *Lolium rigidum*, *Heredity* **106**: 1-8
- Cavan, G., P. Biss, & S.R. Moss (1998). Localized origins of herbicide resistance in *Alopecurus myosuroides*. *Weed Research* **38**: 239-45.
- Chauvel, B. & J. Gasquez (1994). Relationships between Genetic-Polymorphism and Herbicide Resistance within *Alopecurus Myosuroides* Huds. *Heredity* **72**: 336-44.
- Chauvel, B., M. Delattre, J.P. Guillemain & J. Gasquez (1998). Essai de gestion d'une population de vulpin résistante aux herbicides. In : *Dix-septième Conférence du Columa-Journées Internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes*, Dijon, 117-124.
- Christopher, J.T., S.B. Powles, D.R. Liljegrees, & Z.A.M. Holtum (1991). Cross resistance to herbicides in annual rye grass (*Lolium rigidum*). *Plant Physiology* **95**: 1036-1043.
- Coleman, J., M. Blake-Kalff & E. Davies (1997). Detoxification of xenobiotics by plants: Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science* **2** : 144-151.
- Couée, I., C. Sulmon, G. Gouesbet & A. El Amrani (2005). Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxydative stress. *Journal of Experimental Botany* **57**: 449-459.
- Cummins, I., D.J. Cole & R. Edwards (1999). A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *The Plant Journal* **18** : 285-292.
- Cummins, I., & R. Edwards (2004). Purification and cloning of an esterase from the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*), which bioactivates aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Plant Journal* **39**: 894-904.

- Cummins, I., D.N. Bryant & R. Edwards (2009). Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Plant Physiology* **7**: 807-820.
- Délye, C., A. Matějček & J. Gasquez (2002). PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). *Pest Management Science* **58** : 474-478.
- Délye, C., X.Q. Zhang, C. Chalopin, S. Michel, & S.B. Powles (2003). An isoleucine residue within the carboxyl-transferase domain of multidomain acetyl-CoA carboxylase is a major determinant of sensitivity to aryloxyphenoxypropionate but not to cyclohexanedione inhibitors. *Plant Physiology* **132** : 1716–1723.
- Délye, C., (2005). Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Science* **53** : 728-746.
- Délye, C., Y. Menchari, J.-P. Guillemin, A. Matějček, S. Michel, C. Camilleri & B. Chauvel (2007). Status of black-grass (*Alopecurus myosuroides*) resistance to acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors in France. *Weed Research* **47** : 95-105.
- Délye, C. & K. Boucansaud, (2008). A molecular assay for the proactive detection of target site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides*. *Weed Research* **48** : 97-101.
- Devine, M.D. & R.H. Shimabukuro (1994). Resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibiting herbicides. *Herbicide resistance in plants* (Boca Raton: CRC Press): 141-69.
- Duggleby, R.G., J.A. McCourt, L.W. Guddat (2008) Structure and mechanism of inhibition of plant acetoxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 309-324.
- Gaines T.A., W. Zhang, D. Wang, B. Bukun, S.T. Chisholm, D.L. Shaner, S.J. Nissen, W.L. Patzoldt, P.J. Tranel, A.S. Culpepper, T.L. Grey, T.M. Webster, W.K. Vencill, R.D. Sammons, J. Jiang, C. Preston, J.E. Leach & P. Westra (2009). Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *Proceedings of the National Academy of Science* **107**: 1029-1034
- Gasquez, J., G. Bay & K. Boucansaud (2007). Mise au point sur des graminées adventices d'un test biologique spécifique des inhibiteurs de l'ALS. In : *Vingtième Conférence du Columa-Journées Internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes*, Dijon.
- Gauvrit, C. (1996). Efficacité et sélectivité des herbicides. *INRA Editions*, Paris, France, 2-7380-0617-5.
- Gauvrit, C. & T. Lamrani (2008). Influence of application volume on the efficacy of clodinafop-propargyl and fenoxaprop-P-ethyl on oats. *Weed Research* **48**: 78-84.
- Gressel, J. & A.L. Segel (1990). Modelling the effectiveness of herbicide rotation and mixtures as strategies to delay or preclude resistance. *Weed Technologies* **4**: 186-198.
- Hardie, D.G. (1999). Plant protein serine/threonine kinases: Classification and functions. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 97-131.
- Harwood, J.L. (1988). Fatty acid metabolism. *Annual Review of Plant Physiology* **39**: 101-138

- Harwood, J.L. (1989). The properties and importance of acetyl-coenzyme A carboxylase in plants. *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference-Weed*, Brighton, 155-162.
- Heap, I.M. & R. Knight (1982). A population of ryegrass tolerant to herbicide diclofop-methyl. *Journal of the Australian Institute of Agricultural Science* **48**: 156.
- Heap, I. M. (1997). The occurrence of herbicide-resistant weeds worldwide. *Pesticide Science* **51** : 235-243.
- Heap, I. M. (2010). International survey of herbicide resistant weeds. Disponible sur: [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org).
- Hilton, H.W. (1957). Herbicide tolerant strain of weeds. *Hawain Sugar Planters Association Annual Reports* pp.69.
- Kreuz, K., R. Tommasini & E. Martinoia (1996). Old enzymes for new job. Herbicide detoxication in plants. *Plant Physiology* **111**: 349-353.
- Letouzé, A. & J. Gasquez (2001). Inheritance of fenoxaprop-P-ethyl resistance in a blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) population. *Theoretical and Applied Genetics* **103** : 288-296.
- Letouzé, A. & J. Gasquez. (2003). Enhanced activity of several herbicide-degrading enzymes: a suggested mechanism responsible for multiple resistance in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.), *Agronomie* **23**: 601-608.
- Light, G.G., P.A. Dotray & J.R. Mahan (1999). Thermal dependence of pyriithiobac efficacy in *Amaranthus palmeri*. *Weed Science* **47**: 644-650.
- Manalil, S., R. Busi, M. Renton & S.B. Powles (2011). Rapid evolution of herbicide resistance by low herbicide dosages. *Weed Science* **59**: 210-217.
- Menchari, Y., C. Delye & V. Le Corre (2007). Genetic variation and population structure in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.), a successful, herbicide-resistant, annual grass weed of winter cereal fields. *Molecular Ecology* **16**: 3161-3172.
- Muzik, T.J. & W.G. Mauldin (1964). Influence of environment on the response of plants to herbicides. *Weeds* **12**: 142-148.
- Neve, P. & S.B. Powles (2005). Recurrent selection with reduced herbicide rates results in the rapid evolution of herbicide resistance in *Lolium rigidum*. *Theoretical and Applied Genetics* **110**: 1154-1166
- Oerke, E.C. (2006). Crop losses to pests. *Journal of Agricultural Sciences* **144** : 31-43.
- Petit, C. (2009). Caractérisation de la résistance non liée à la cible aux herbicides inhibiteurs de l'Acétyl-coenzyme A carboxylase chez le vulpin des champs (*Alopecurus myosuroides* Huds.) : de la population au gène. Thèse de doctorat Sciences de la vie : Université de Bourgogne. 192 pages.
- Petit, C., G. Bay, F. Pernin & C. Délye (2010). Prevalence of cross- or multiple resistance to the acetyl-coenzyme A carboxylase inhibitors fenoxaprop, clodinafop and pinoxaden in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) in France. *Pest Management Science* **66** : 168-177.
- Powles, S.B. & Q. Yu (2010). Evolution in Action: Plants Resistant to Herbicides. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 317-347.

Reade, J.P.H. & L.J. Milner (2004) A role for glutathione S-transferases in resistance to herbicides in grasses. *Weed Science* **52**: 468-74.

Rüegg, W.T., M. Quadranti & A. Zoschke (2007). Herbicide research and development: challenges and opportunities. *Weed research* **47**: 271-275.

van Eerd, L.L., R.E. Hoagland, R.M. Zablotowicz, & J.C. Hall (2003). Pesticide metabolism in plants and microorganisms. *Weed Science* **51**: 472-95.

Vila-Aiub, M.M., P. Neve & S.B. Powles (2005). Resistance cost of a cytochrome P450 herbicide metabolism mechanism but not an ACCase target site mutation in a multiple resistant *Lolium rigidum* population. *New Phytologist* **167**: 787-796

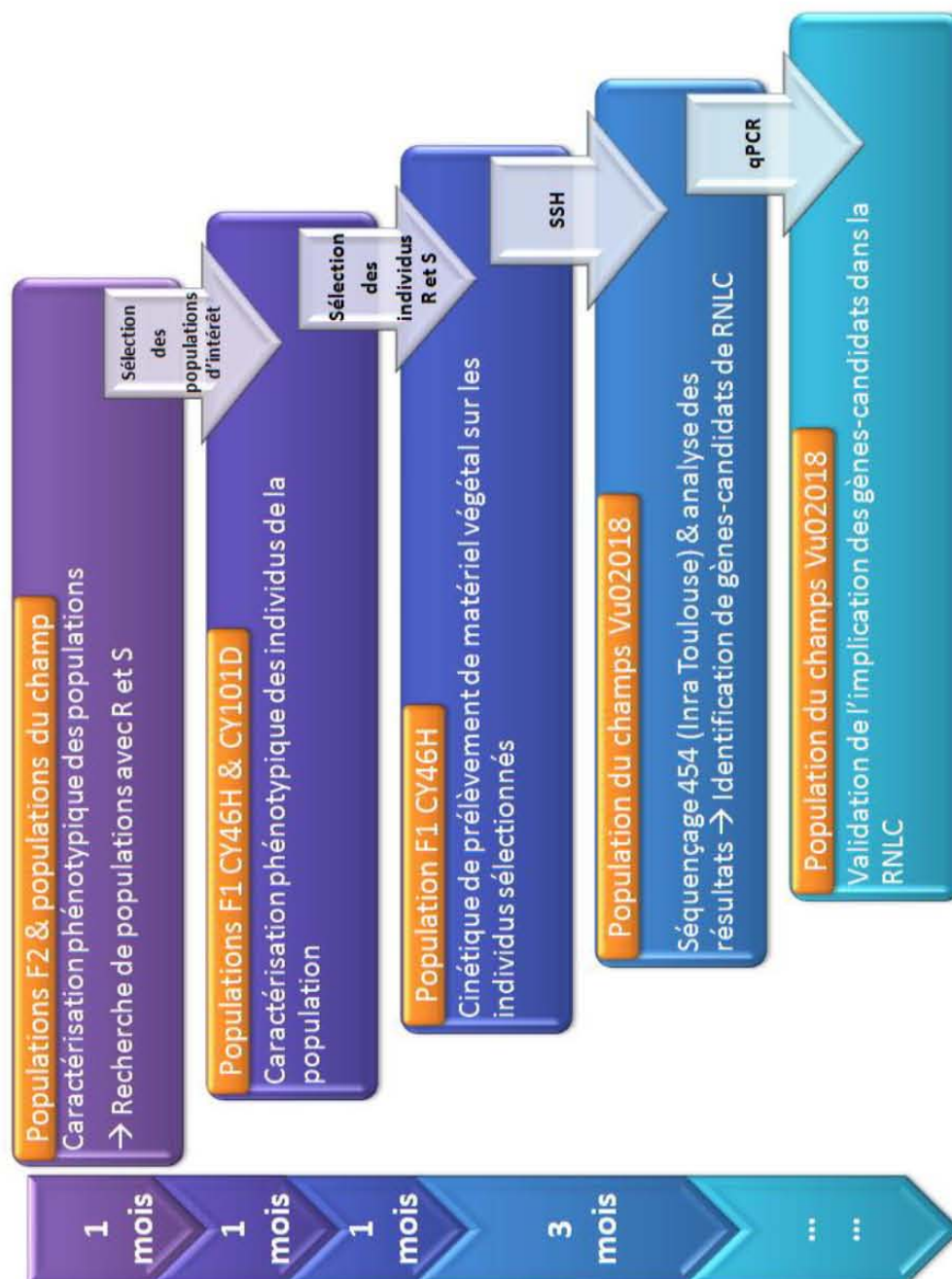
Yuan, J.S., P.J. Tranel & C.N. Stewart (2007) Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in Plant Science*, **12**: 6-13.

# ANNEXES

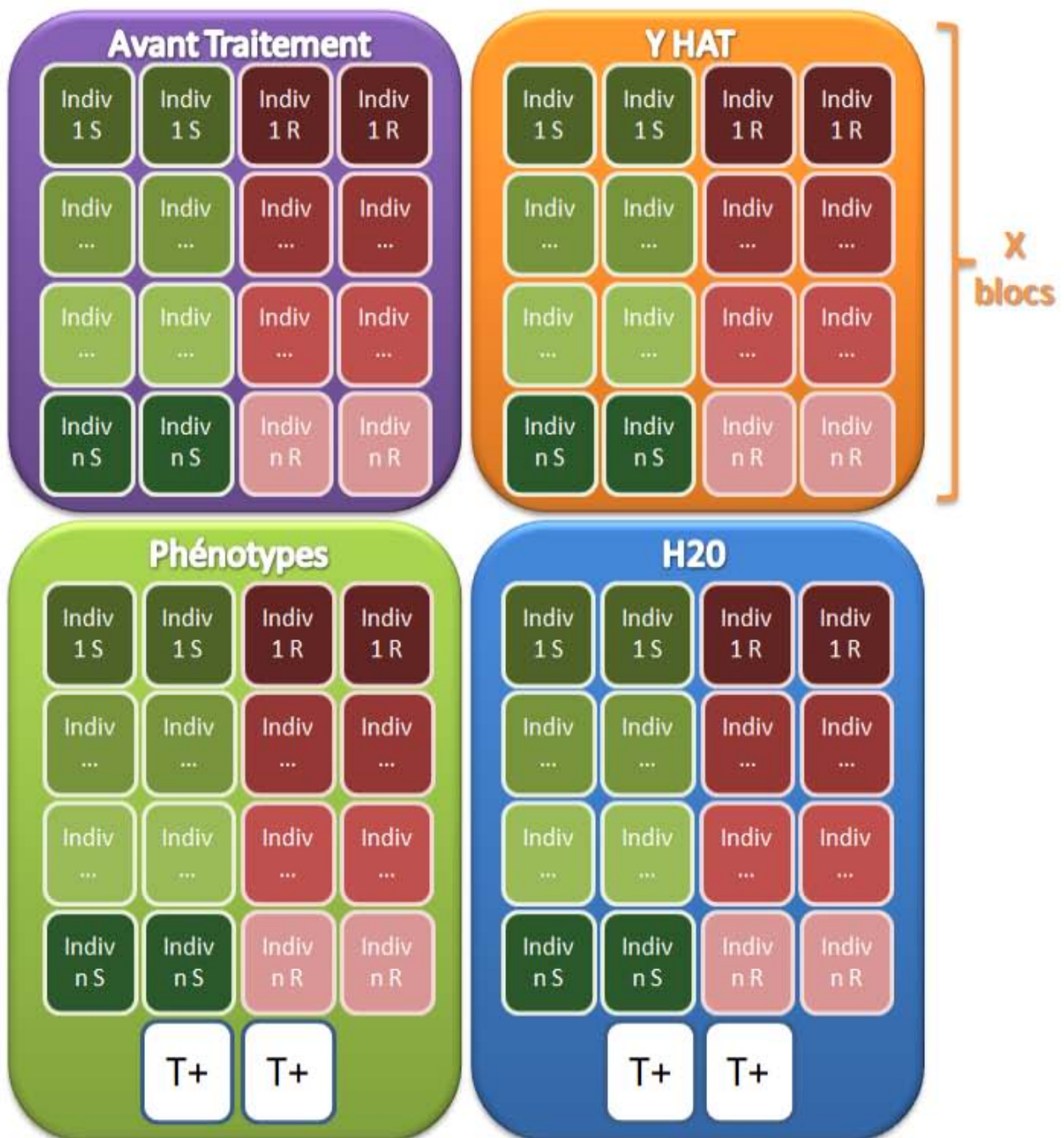
---



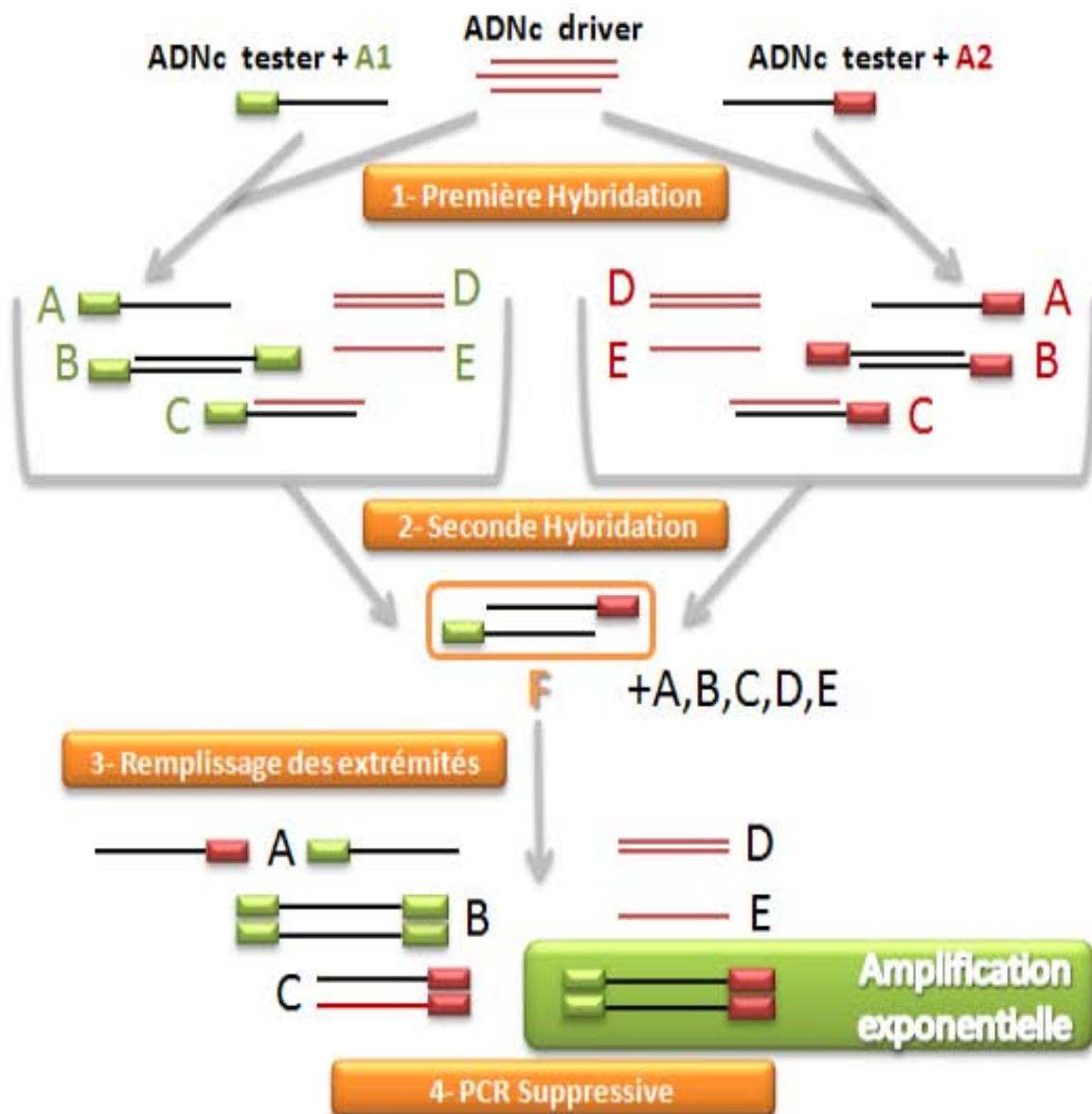
# Annexe 1 : Etapes du processus de caractérisation de la RNLC et temps nécessaire pour leur réalisation (La population utilisée au cours du stage est indiquée en orange).



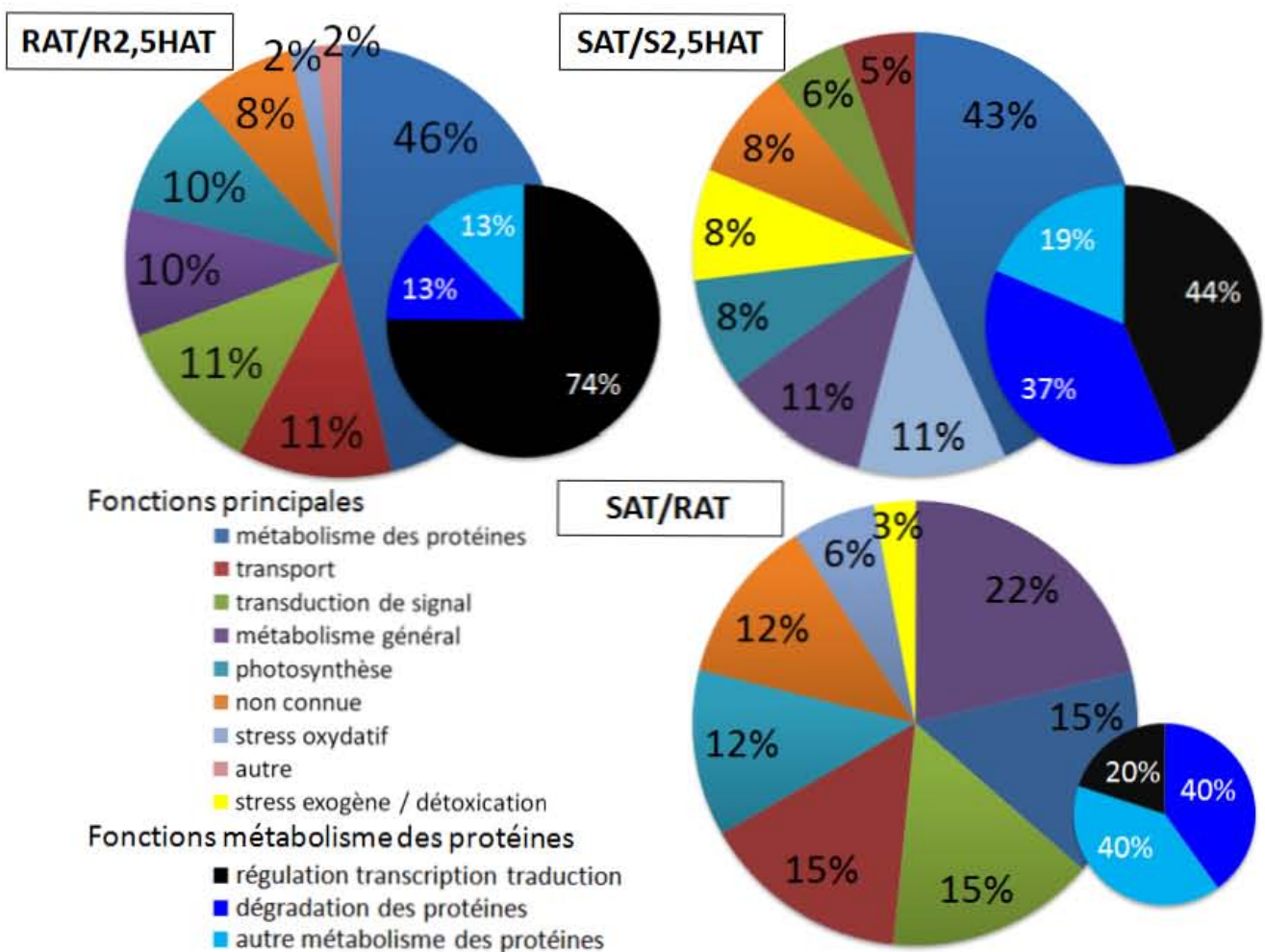
Annexe 2 : Dispositif expérimental d'une cinétique de prélèvement ; HAT : heures après traitement, S : individu sensible, R : individu résistant, T+ : individu sensible de référence.



# Annexe 3 : Principe de l'hybridation soustractive suppressive (SSH)



# Annexe 4 : Groupes fonctionnels surexprimés dans les 3 modalités de la SSH dans la population du champ Vu02018.



Annexe 5 : plan de croisement des descendances F2 étudiées et profils phénotypiques associés des parents

Croisement	Phénotype par herbicide										
	ACCCase				ALS		ACCCase				ALS
	Puma	Celio	Axial	Atlantis		Puma	Celio	Axial	Atlantis		
F2-1	R	S	R	r	X	R	S	R	r		
F2-2	S	r	S	r	X	S	S	r	r		
F2-3	S	S	r	r	X	r	S	S	r		
F2-4	S	S	r	r	X	R	R	R	r		
F2-5	R	R	R	r	X	R	R	R	S		
F2-6	R	S	R	r	X	R	S	R	S		
F2-7	S	S	r	r	X	S	S	S	S		
F2-8	S	r	S	r	X	S	S	S	S		
F2-9	r	S	S	S	X	R	S	R	r		
F2-10	r	S	S	S	X	R	r	R	r		

# Abstract

---

Herbicides inhibiting Acetyl-CoenzymeA carboxylase (ACCase) and Acetohydroxyacid synthase (AHAS) are among the most widely used in France and in the world. Their intensive use selected resistant plants into weed populations. It was assessed that non-target-site resistance (NTSR) to herbicides inhibiting ACCase is prevalent on target-site resistance (TSR) in many black grass (*Alopecurus myosuroides*) populations which is a very harmful weed in the cereal fields. While TSR mechanisms are well known and understood, NTSR mechanisms have not been studied much by now.

We tried to identify genes conferring NTSR to ACCase inhibitors and AHAS inhibitors into black grass thanks to a Suppressive Subtractive Hybridization (SSH) technology of analysis of the transcriptome. Characterization of NTSR involves a five steps process: to look for populations containing NTSR individuals, to characterize the phenotype of each individual of these populations, to set resistant and sensitive plants apart before and after the herbicide treatment into a freezer, to identify NTSR “candidate genes”, and check the role of these genes in NTSR mechanisms. This work is about the first four steps of the process, which have been done with herbal material from different plants and populations because of the short time available.

NTSR is an unforeseeable adaptive trait involving a large set of genes, and influenced by external factors. By characterizing the phenotype of many plants with several herbicides inhibiting ACCase and AHAS, we could assess that NTSR is a complex, polygenic and unforeseeable process. It relies on the accumulation of genes, each conferring a different level of resistance to each herbicide. An aim of this work is to identify some of these genes and to understand how they get involved in NTSR. We noticed that NTSR genes selected with herbicides inhibiting ACCase also encodes enzymes involved in NTSR to herbicides inhibiting AHAS. Different levels of expression or different sequences of NTSR genes both confer a level of resistance to the plants.

Several biochemical functions seem to be involved, and two steps can be focused on: the perception of the herbicide and the transduction of the signal (regulators, kinases proteins), and the action of effectors (transport, response to stress, detoxification proteins). We could identify four NTSR “candidate genes”: two of them are regulators, the other ones are effectors. A glycosyl transferase protein (GT) seems to be over expressed has a constitutive gene in resistant plants compared to sensitive plants, and a protein probably involved in response to oxidative stress is over expressed in resistant plants both before the herbicide treatment and as a result of the herbicide perception. We also identified many proteins putatively involved in a response to oxidative and environmental stresses.

**Key words:** *Alopecurus myosuroides*, black grass, non target site resistance, herbicide, acetyl-Coenzyme A carboxylase, acetohydroxyacid synthase, transcriptomics, genetic control

# Résumé

---

Les herbicides inhibiteurs de l'Acétyl-CoenzymeA carboxylase (ACCCase) et de l'Acétolactate synthase (ALS) sont parmi les plus répandus en France et dans le monde. Leur emploi intensif a sélectionné des plantes résistantes dans des populations d'adventices. Il a été montré que la résistance non liée à la cible aux inhibiteurs de l'ACCCase (RNLC) est prédominante sur la résistance liée à la cible (RLC) dans de nombreuses populations de vulpin des champs (*Alopecurus myosuroides*), adventice très nuisible des cultures de céréales d'hiver. Or, si la RLC est relativement bien connue, peu d'études ont été menées à ce jour sur la RNLC.

Nous avons cherché à identifier des gènes-candidats de RNLC aux inhibiteurs de l'ACCCase et de l'ALS chez le vulpin des champs grâce à une technique d'analyse du transcriptome, l'hybridation soustractive suppressive (SSH). Le processus de caractérisation de la RNLC fait intervenir cinq étapes : la recherche de populations possédant des individus résistants, la caractérisation phénotypique des individus de cette population, le prélèvement de matériel végétal avant et après traitement sur des individus sensibles et résistants, l'identification de gènes-candidats de RNLC et la validation du rôle de ces gènes dans la RNLC. Ces travaux concernent les quatre premières étapes, réalisées sur du matériel végétal différent car le déroulement du processus complet sur une seule population nécessite un délai supérieur à six mois.

La RNLC est un trait adaptatif imprévisible mettant en jeu un ensemble de gènes important et sous l'influence de facteurs externes à la plante. La caractérisation phénotypique de plante avec plusieurs herbicides inhibiteurs de l'ACCCase et de l'ALS nous permet de définir la RNLC de complexe, polygénique, et imprévisible. Elle repose sur l'accumulation de gènes conférant chacun un niveau de résistance variable aux différents herbicides. Un objectif de cette étude est d'identifier ces gènes, et de comprendre leur implication dans la RNLC. Nous nous apercevons que les gènes de RNLC sélectionnés par des inhibiteurs de l'ACCCase sélectionnés jusqu'à aujourd'hui codent pour des protéines également responsables de la RNLC aux inhibiteurs de l'ALS. Ce sont des différences d'expression et/ou de séquence des gènes de RNLC dans la plante qui sont à l'origine des niveaux de résistance observés.

Parmi les gènes candidats identifiés, différentes fonctions biochimiques semblent intervenir à deux niveaux : la perception de l'herbicide et la transmission du signal reçu (protéines kinases), et la mise en action des effecteurs de la RNLC (protéines de transport, de réponse aux stress, de régulation de l'expression du génome). Nous avons identifié quatre gènes-candidats de RNLC parmi lesquels deux gènes régulateurs et deux gènes effecteurs. Une glycosyl transférase (GT) semble être surexprimée de manière constitutive chez les plantes résistantes par rapport aux sensibles, et une protéine de réponse au stress oxydatif est surexprimée chez les résistants avant traitement et suite au traitement herbicide. De nombreuses protéines potentiellement impliquées dans la réponse aux stress oxydatif et environnement ont également été identifiées.

**Mots clés :** *Alopecurus myosuroides*, vulpin des champs, résistance non liée à la cible, herbicide, acétyl-coenzyme A carboxylase, acétolactate synthase, transcriptomique, contrôle génétique