

Résistances aux herbicides chez le vulpin et le ray-grass

Des marqueurs moléculaires pour un diagnostic rapide

Christophe Délye*, Annick Matéjicek*, Élise Calmes* et Bruno Chauvel*

Pour mieux gérer les résistances des adventices aux herbicides, il faut identifier rapidement ces résistances. Autrement dit, quand un échec de désherbage avec un herbicide fait suspecter une résistance, il faut vérifier si c'est le cas, et, autant que possible, si les mauvaises herbes résistent aussi à d'autres produits (« résistance croisée »). Ceci afin d'adapter les stratégies de désherbage à mettre en œuvre ensuite : choix des herbicides restant efficaces, méthodes de lutte alternatives, etc.

Et plus vite on aura vérifié, plus vite on pourra agir.

Alors trouver un test qui donne une réponse en un jour au lieu de quelques semaines voire quelques mois, qui permet d'agir immédiatement au lieu d'attendre la campagne suivante, et qui décèle certaines résistances croisées, cela intéresse les praticiens !

La PCR peut répondre à ces besoins. Comme quoi la biologie moléculaire peut avoir des applications pour le terrain... Bien sûr il ne faut pas lui demander plus que ce qu'elle peut donner.

Démonstration à propos du vulpin et du ray-grass

La maîtrise des populations de plantes adventices (« mauvaises herbes ») repose aujourd'hui essentiellement sur l'emploi de traitements herbicides. Or l'emploi intensif de ces molécules a souvent pour conséquences non seulement la sélection, mais aussi la propagation de plantes résistantes.

Aujourd'hui, 252 biotypes résistants ont été identifiés dans 154 espèces d'adventices présentes dans plus de 50 pays (Source : <http://www.weedscience.com>).

La présence d'individus résistants au sein des populations d'adventices rend la gestion du désherbage sans cesse plus difficile, et a pour conséquences un usage accru des herbicides, pouvant entraîner des préjudices tant environne-

mentaux (pollution, perte de biodiversité) que socio-économiques (revenu agricole, qualité des aliments). Il est donc capital de disposer d'outils permettant un diagnostic de la résistance qui soit le plus précoce possible, afin de pouvoir le cas échéant adapter le programme de traitement au profil de résistance de la population d'adventices présente sur la parcelle (photo).

Tests biologiques de sensibilité aux herbicides

Fiables...

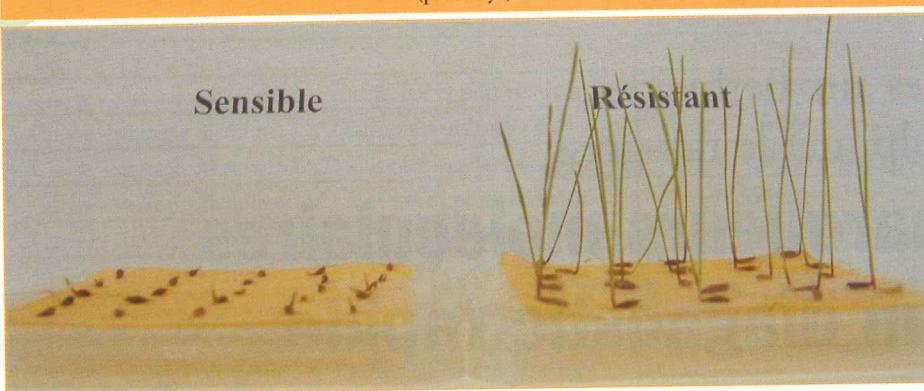
Le cheval de bataille en matière de détection de la résistance aux herbicides est le test biologique, tel que le test « semence » (Figure 1, p. 42). Ce



Échec de désherbage d'une parcelle de blé au printemps 2000 en Bourgogne.
Pour savoir si les vulpins présents étaient résistants, il fallait faire des tests biologiques. Ceux-ci sont fiables mais longs à mettre en œuvre et destructifs : on ne peut tester qu'un herbicide par échantillon.
(ph. Délye, INRA)

* Institut national de la recherche agronomique, Laboratoire de malherbiologie et agronomie, B.P. 86510, 21065 Dijon cedex.

Figure 1 - Lecture d'un test « semence » pratiqué avec du fénoxaprop-P éthyle (*Puma LS*) sur deux populations de vulpin. L'une est sensible à 100 %, l'autre résistante à 97 %.
(ph. Délye)



type de test se base sur l'observation de la survie ou de la croissance de plantes récoltées au champ ou de plantules issues de semences sur lesquelles a été appliquée une dose d'herbicide donnée, réputée discriminer les individus sensibles des individus résistants.

Le test biologique, seul utilisable lorsqu'on ne sait rien des gènes de résistance, présente cependant des inconvénients notables.

... mais longs...

La durée de ce type de test varie d'une dizaine de jours à quelques semaines, le temps que les plantes ou plantules expriment les symptômes de l'action de l'herbicide. Ceci ne permet pas toujours d'adapter le programme de traitement en cours de campagne si une résistance est détectée. De plus, il faut disposer de plantes ou de graines viables en quantité suffisante. En outre, la dormance des semences récoltées, plus ou moins importante en fonction des conditions climatiques, retarde encore la réalisation des tests : les résultats ne seront pas connus pour la préconisation du désherbage de prélevée (voire de post-levée certaines années) de la campagne suivante.

... destructifs et « mono-herbicide »

Les tests biologiques sont destructifs : une plante donnée ne peut généralement pas être testée

avec plus d'un herbicide. Ils ne permettent pas l'identification précise de mécanismes de résistance.

Or, plusieurs gènes différents peuvent causer une résistance à un herbicide donné, mais ne conféreront pas le même profil de résistance croisée*. De ce fait, étudier la résistance d'une population d'adventices à plusieurs matières actives nécessite de tester une à une ces matières actives sur des plantes venant de cette population, multipliant le nombre de plantes à tester.

Enfin, les tests biologiques sont de gros consommateurs de main-d'œuvre.

Pour ces différentes raisons, quand des gènes de résistance ont été identifiés, des tests de détection de plantes résistantes basés sur la technique de PCR* semblent être un outil de choix pour le diagnostic de la résistance.

Un modèle d'importance agronomique : la résistance aux anti-graminées

Nous nous sommes intéressés à la résistance de deux adventices majeures des céréales d'hiver : le Vulpin (*Alopecurus myosuroides* Huds.) et le Ray-grass (*Lolium rigidum* Gaud.) aux herbicides de deux familles : les cyclohexanediones, ou « dimes », et les aryloxyphenoxypropionates, ou « fops ». Ces herbicides inhibent l'acétyl-coenzyme A carboxylase chloroplastique (ACCase), un

enzyme-clé de la biosynthèse des acides gras, et donc un point vital du métabolisme de la plante. En France, la résistance à ces molécules, signalée dès le début des années 1980, est en extension régulière (Decoin, 1999 et 2001).

Deux types de mécanismes de résistance sont connus pour ces herbicides (Decoin, 2001) : la détoxication par métabolisation et une ou des modification(s) de l'ACCase. Les deux types de mécanismes peuvent coexister dans une même population d'adventices, voire dans une même plante (Letouzé, 1999). De plus, plusieurs gènes peuvent être impliqués dans la détoxication, ce qui est complexe à étudier.

En revanche, la résistance liée à la cible est plus facilement abordable. En 2001, une mutation* dans le gène codant pour l'ACCase et conférant une résistance à des herbicides a été identifiée chez le ray-grass (Zagnitko et coll., 2001), la sétaire (Délye et coll., 2002) et le vulpin (Délye et coll., sous presse). Dans les trois cas, la mutation identifiée cause la même modification de l'ACCase, à savoir le remplacement d'un acide aminé* (isoleucine) par un autre acide aminé de structure chimique extrêmement semblable (leucine). Ce changement minime est actuellement la seule mutation conférant une résistance liée à la cible identifiée dans l'ACCase.

Développement d'un outil de diagnostic polyvalent

Nous avons développé un test basé sur la PCR visant à détecter la présence d'un allèle « leucine » de l'ACCase dans une plante de ray-grass ou de vulpin.

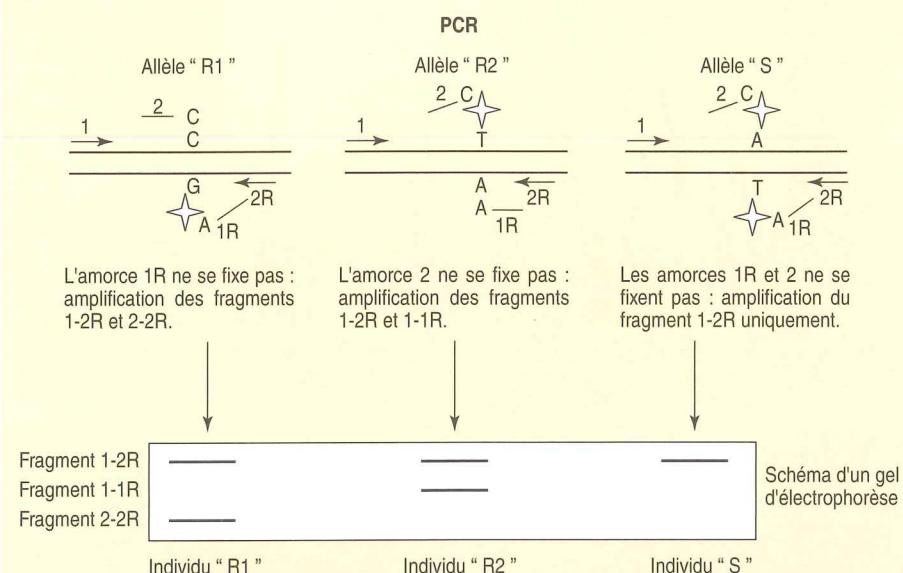
Deux grands principes ont guidé ce travail :

- Le vulpin et le ray-grass ont des génomes très proches. L'outil de diagnostic devait donc être utilisable indifféremment sur ces deux espèces.
- Le code génétique étant dégénéré*, deux mutations causant le même changement isoleucine/leucine existent chez le vulpin et le ray-grass. Le test de diagnostic devait donc détecter ces deux mutations au cours d'une seule réaction de PCR.

Tableau 1 - Résultats de l'analyse par PCR de plantes de vulpin issues de neuf populations et testées avec quatre inhibiteurs de l'ACCase.
Cinquante plantes ont été analysées par population et par herbicide.

Code	Origine ⁽¹⁾	Herbicides							
		Cycloxydime (<i>Stratos ultra</i>)		Fénoxaprop-P éthyle (<i>Puma LS</i>)		Clodinafop-propargyl (<i>Célio</i>)		Éloge (<i>Haloxyfop R</i>)	
		Sensibles	Résistants	Sensibles	Résistants	Sensibles	Résistants	Sensibles	Résistants
VSA98	21	50 S ⁽³⁾	- ⁽²⁾	50 S	-	50 S	-	50 S	-
V003	08	-	50 R2	2 S	48 R2	2 S, 21 R2	27 R2	2 S, 39 R2	9 R2
V010	86	50 S	-	8 S	42 S	48 S	2 S	46 S	4 S
V017	57	50 S	-	50 S	-	50 S	-	50 S	-
V018	54	50 S	-	8 S	42 S	50 S	-	50 S	-
V023	72	41 S	9 S	4 S	46 S	2 S	48 S	23 S	27 S
V029	51	50 S	-	50 S	-	50 S	-	50 S	-
V032	80	18 S	32 R2	6 S	6 S, 38 R2	12 S, 3 R2	3 S, 32 R2	16 S, 20 R2	14 R2
V049	08	-	8 S, 41 R1, 1 R1R2	5 S	43 R1, 1 R2, 1 R1R2	2 S, 6 R1	42 R1	7 S, 2 R2, 22 R1	3 S, 15 R1, 1 R2
Total		309 S	82 R2, 41 R1, 1 R1R2, 17 S	183 S	87 R2, 43 R1, 1 R1R2, 136 S	24 R2, 6 R1, 266 S	59 R2, 42 R1, 53 S	61 R2, 22 R1, 294 S	24 R2, 15 R1, 34 S

(1) : Numéro de département. (2) Aucune plante sensible/résistante n'a été trouvée dans cette population. (3) S, R1 et R2 : allèles de l'ACCase détectés.

Figure 2 - Principe du test de diagnostic de la résistance par PCR allèle-spécifique bidirectionnelle.

4 amorces* (1, 1R, 2 et 2R) sont utilisées. L'amorce 2 est spécifique de l'allèle R1, l'amorce 1R de l'allèle R2. Les allèles R1 et R2 dérivent de l'allèle S par remplacement d'un A par un C (R1) ou un T (R2) dans la séquence du gène de l'acétyl-coenzyme A carboxylase. © C. Délye.

Une fois le test de diagnostic mis au point, nous avons déterminé le profil de résistance croisée conféré par les allèles* « leucine » de l'ACCase chez le vulpin et le ray-grass.

Dans tout ce qui suit, les différents allèles de l'ACCase seront appelés S (isoleucine, sensible), R1 et R2 (leucine 1 et 2, résistants).

Le matériel végétal

Vingt populations de vulpin dont les semences ont été collectées à la fin de la campagne 2000 et la population sensible de référence VSA98 collectée en 1998 ont été utilisée pour cette étude (Tableaux 1 et 2), ainsi que cinq populations de ray-grass collectées entre 1995 et 1999 (Tableau 3, p. 44). Toutes ces populations proviennent de parcelles ayant été traitées essentiellement avec du fénoxaprop-P éthyle (*Puma LS*, Aventis) pendant au moins quatre ans.

Tests de sensibilité aux herbicides effectués

Quatre herbicides ont été testés sur 9 populations de vulpin : trois « fops » : le fénoxaprop-P éthyle (*Puma LS*, Aventis), le clodinafop-propargyle (*Célio*, Évolya, aujourd'hui Syngenta) et l'haloxyfop R (*Éloge*, Bayer S. A.), et un « dime » : le cycloxydime (*Stratos ultra*, BASF).

La sensibilité de 50 plantes à chaque herbicide a été déterminée par le test « semences » développé au laboratoire (Figure 1 - Letouzé et Gasquez, 1998 ; Letouzé, 1999) (Tableau 1).

Les 200 plantes testées par population ont ensuite été analysées par PCR. De plus, la sensibilité au cycloxydime de 12 lots de 30 plantes a été déterminée et les plantes ont été analysées par PCR afin d'avoir une idée de la répartition des allèles R1 et R2 (Tableau 2).

Trois herbicides ont été testés sur les cinq populations de ray-grass : deux « fops » : le diclofop-méthyle (*Illoxan CE*, AgrEvo) et le clodinafop-

propargyle, et un « dime » : le cycloxydime. Dans chaque population, 50 plantes ont subi le test « semence » pour chaque herbicide (Tableau 3). Les 150 plantes testées par population ont ensuite été analysées par PCR.

Dans le but de valider le test de diagnostic sur des échantillons provenant du champ, 360 plantes de vulpin provenant d'une parcelle de blé d'hiver en Bourgogne ont été analysées par PCR. Pour ce faire, un fragment de feuille d'1 cm² a été prélevé sur un plant de vulpin tous les 5 m le long de 18 lignes séparées par des intervalles de 7 m.

Extraction d'ADN et PCR

Les échantillons à analyser consistent en un fragment de 1 à 2 cm de long de la première feuille des plantules de vulpin ou de ray-grass résistants,

Tableau 2 - Sensibilité au cycloxydime (*Stratos ultra*) et analyse par PCR de plantes de vulpin issues de douze populations. Trente plantes ont été analysées par population.

Code	Origine ⁽¹⁾	Sensibilité au cycloxydime	
		Sensibles	Résistants
V011	37	2 S	28 R2
V015	89	2 S	28 R2
V024	08	27 S	1 R1, 2 R2
V026	55	2 S	28 R2
V030	78	27 S	3 R2
V059	54	11 S	19 R2
V061	28	1 S	29 R2
V064	02	29 S	1 R2
V065	02	16 S	14 R2
V068	77	9 S	21 R2
V092	62	12 S	18 R2
V099	28	26 S	4 R2

(1) Numéro de département.

ou en la totalité de la semence des plantes sensibles (chez ces dernières, il n'y a pas de développement de la première feuille au cours du test biologique : cf. figure 1). L'ADN est extrait très grossièrement (Délye et coll., 2002).

La technique utilisée pour détecter les allèles de l'ACCase est celle de la PCR allèle-spécifique bidirectionnelle (Figure 2). Si le test fonctionne correctement, on obtient au moins le fragment 1-2R qui sert de contrôle interne à l'analyse.

Il existe quatre types de profils PCR possibles selon le génotype de la plante analysée : les trois illustrés sur la figure 2, et un profil comportant les trois fragments 1-2R, 1-1R et 2-2R pour les plantes qui contiennent à la fois un allèle R1 et un allèle R2 (Figure 3, p. 44).

La séquence des amorces utilisées et les conditions d'amplification sont disponibles sur demande auprès des auteurs.

Pour mieux comprendre le jargon de la biologie moléculaire : petit glossaire des termes suivis d'une * dans le texte.

* **Acide aminé** : Une protéine est constituée d'une succession de trois bases de l'ADN, appelée « codon » (exemple : ATG = méthionine).

* **Allèle** : Des copies d'un gène différent les unes des autres par une ou des mutation(s) sont des allèles de ce gène.

* **Amorce** : Petit fragment d'ADN de 15 à 25 bases de long.

* **Dégénéré (code génétique)** : L'ADN contient 4 bases différentes : A, T, G, C. Les acides aminés qui constituent l'ensemble des protéines des êtres

vivants sont codés dans un gène par une succession de 64 codons pour 20 acides aminés, certains acides aminés sont codés par plusieurs codons. C'est ce qu'on appelle la dégénérescence du code.

* **Mutation** : Changement dans la séquence de bases de l'ADN d'un gène, pouvant amener ou non un changement dans la protéine codée par ce gène.

* **PCR** : Réaction en chaîne de la polymérase. Technique de biologie moléculaire permettant de recopier un nombre de fois très élevé (= « amplifier ») un fragment d'ADN donné dans le génome.

* **Résistance croisée** : Résistance à différentes molécules conférée par un même gène. À ne pas confondre avec résistance multiple : résistance à différentes molécules conférée par plusieurs gènes différents.

Résultats

Le test de diagnostic est fonctionnel

Les conditions de PCR ont été définies sur des plantes de vulpin et de ray-grass dont la séquence du gène codant pour l'ACCase a été préalablement déterminée. Les conditions retenues permettent de détecter spécifiquement les différents allèles de l'ACCase chez le vulpin et le ray-grass (Figure 3).

Les allèles R1 et R2 ne confèrent pas une résistance croisée systématique

Les résultats de l'analyse de plantes de vulpin et de ray-grass sont donnés dans les tableaux 1 (vulpin) et 3 (ray-grass). Un total de 1 800 plantules de vulpin et de 750 plantules de ray-grass ont été analysées.

Il ressort de nos résultats que :

- La présence d'un allèle R1 ou R2 dans une plante de vulpin ou de ray-grass lui confère une résistance croisée au cycloxydime, au diclofop-méthyle et au fénoxaprop-P éthyle. En revanche, cet allèle ne confère de résistance croisée ni au clodinafop-propargyle, ni à l'haloxyfop R.
- Des plantes ne possédant pas d'allèle R1 ni R2 peuvent être résistantes au cycloxydime, au diclofop-méthyle ou au fénoxaprop-P



éthyle, par d'autres mécanismes de résistance (détoxication, autre mutation de cible ?). Ces observations diffèrent donc de ce qui est connu pour la résistance aux triazines, dont le mécanisme est unique.

Un autre point est à souligner : les populations de vulpin analysées ont toutes été traitées avec essentiellement le fénoxaprop-P éthyle, un « fop ». Les allèles R1 et R2, sélectionnés par ce « fop », confèrent une résistance croisée à deux

« fops » (diclofop-méthyle et fénoxaprop-P éthyle) et à un « dime » (cycloxydime), mais pas à deux autres « fops » (clodinafop-propargyle et haloxyfop R).

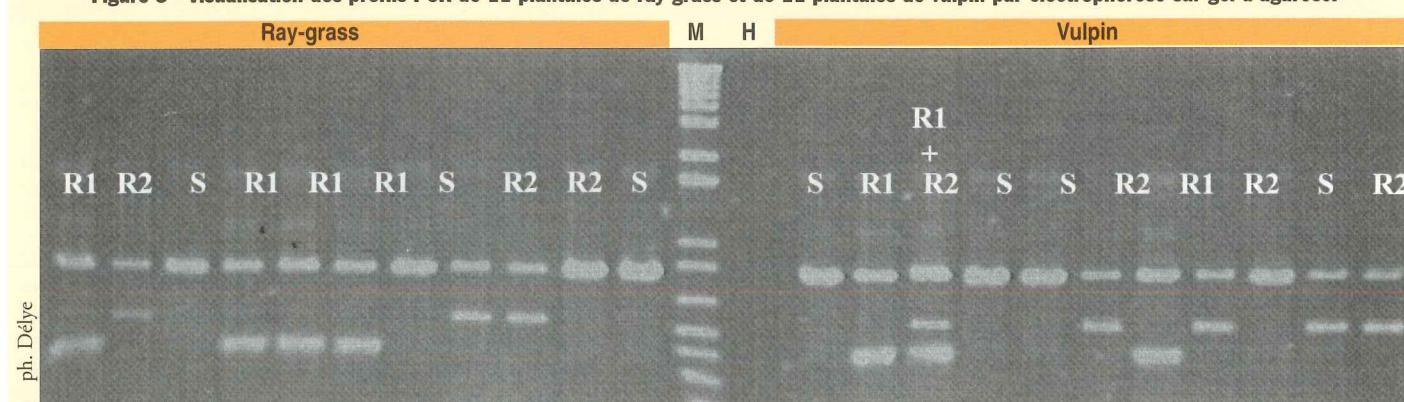
De ce fait, contrairement à ce que l'on pouvait attendre en se référant à des résistances plus anciennes (triazines, urées substituées), la pression de sélection exercée au champ par les traitements ne renseigne pas sur le profil de résistance croisée que vont conférer les gènes de résistance

Tableau 3 - Résultats de l'analyse par PCR de plantes de ray-grass issues de cinq populations et testées avec trois inhibiteurs de l'ACCase. Cinquante plantes ont été analysées par population et par herbicide.

Code	Origine ⁽¹⁾	Herbicides					
		cycloxydime (<i>Stratos ultra</i>)		diclofop-méthyle (<i>Illoxoan CE</i>)		clodinafop-propargyl (<i>Célio</i>)	
		Sensibles	Résistants	Sensibles	Résistants	Sensibles	Résistants
RG95002	11	22 S ⁽³⁾	28 R2	20 S	5 S, 25 R2	26 S, 3 R2	2 S, 19 R2
RG97002	21	50 S	- ⁽²⁾	7 S	43 S	6 S	44 S
RG98003	21	50 S	-	5 S	45 S	9 S	41 S
RG99008	30	-	50 R1	-	50 R1	2 R1	48 R1
RG99007	31	34 S	16 R2	8 S	30 S, 1 R1, 11 R2	8 S, 2 R2	24 S, 16 R2
Total		156 S	44 R2, 50 R1	40 S	36 R2, 51 R1, 123 S	5 R2, 2 R1, 49 S	35 R2, 48 R1, 111 S

(1) : Numéro de département. (2) Aucune plante sensible/résistante n'a été trouvée dans cette population. (3) S, R1 et R2 : allèles de l'ACCase détectés.

Figure 3 - Visualisation des profils PCR de 11 plantules de ray-grass et de 11 plantules de vulpin par électrophorèse sur gel d'agarose.



Les trois tailles de fragments visibles sur le gel correspondent aux fragments 1-2R, 1-1R et 2-2R de la figure 3.

Quatre plantules de Ray-grass contiennent l'allèle S de l'ACCase, 4 l'allèle R1 et 3 l'allèle R2. Côté Vulpin, 4 plantules contiennent l'allèle S de l'ACCase, 2 l'al-

lèle R1, 4 l'allèle R2 et une les allèles R1 et R2. M : marqueur de poids moléculaire, H : témoin négatif d'amplification (pas d'ADN).

Pour évaluer les tests PCR, on a analysé 1 800 plantules de vulpin mais aussi 750 plantules de ray-grass. Mais on peut aussi tester des plantes adultes (ci-contre, des vulpins). (ph. Decoin)

sélectionnés. La préconisation devient donc plus complexe : il ne s'agit plus de raisonner en termes de mode d'action d'herbicide, mais de profil de résistance croisée conféré par un gène.

Les allèles R1 et R2 sont répandus en France

Les allèles R1 et/ou R2 ont été détectés dans trois des quatre départements où du ray-grass a été collecté (Tableau 3). Les huit populations de vulpin du tableau 1 représentent huit départements ; trois contiennent les allèles R1 et/ou R2. Afin d'avoir une idée de la fréquence de ces allèles en France, 12 autres populations ont été analysées, portant à 16 le nombre de départements étudiés (Tableau 2). Les allèles R1 et/ou R2 ont été détectés en fréquence variable (de 1 à 29 plantes sur 30) dans l'ensemble de ces populations (Tableau 2). Bien que l'échantillonnage de populations de vulpin analysées ne soit pas représentatif de la situation en France, il est possible de tirer quelques conclusions :

- Les allèles R1 et R2 de l'ACCase sont des gènes de résistance assez fréquents. Ils sont présents dans 15 des 21 populations de vulpin analysées, soit 11 des 16 départements étudiés.
- L'allèle R2 semble le plus fréquent chez le vulpin. L'allèle R1 n'a été détecté que dans 2 populations, contre 15 pour l'allèle R2. Chez le ray-grass, l'allèle R1 a été détecté dans une seule population (contre 2 pour l'allèle R2), mais 100 % des plantes de cette population possèdent cet allèle.
- La fréquence variable des allèles R1 et R2 d'une population à l'autre peut refléter le temps depuis lequel ce ou ces allèles sont apparus ou ont été introduits dans une population.

Le test de diagnostic est parfaitement utilisable sur des échantillons de terrain

Un fragment de feuille a été prélevé sur 360 plantes dans une parcelle de Côte-d'Or où une résistance aux inhibiteurs de l'ACCase n'avait pas encore été détectée. Ceci a permis de tester des feuilles de plantes adultes, plus « dures » que le matériel obtenu à partir des tests biologiques. Tous les échantillons ont permis l'obtention de profils PCR parfaitement lisibles. Sur les 360 plantes analysées, 12 contenaient l'allèle R1. Toutes les autres contenaient l'allèle S.

La détection par PCR de la résistance sur cette parcelle a été confirmée par la suite par des tests biologiques. Le test moléculaire peut donc parfaitement être utilisé sur du matériel végétal brut venant du champ.

Les avantages du diagnostic de la résistance par PCR...

Ce test PCR possède des atouts indéniables.

Rapidité et réactivité

Le temps requis entre la réception de l'échantillon et la lecture du profil PCR est de l'ordre d'une journée de travail. Ceci permet de savoir immédiatement si l'allèle R1 et/ou l'allèle R2 sont présents dans une population de ray-grass ou de vulpin. Il est donc possible d'adapter éventuellement les traitements herbicides de post-levée dès l'identification d'une inefficacité de désherbage en pré-levée.

Précision

Le test permet la détection spécifique d'un gène de résistance. La résistance croisée que confère ce gène étant connue, il est aisément de savoir à quels herbicides la population de vulpin ou de ray-grass échantillonnée sera résistante.

Souplesse vis-à-vis du matériel végétal

Le diagnostic peut être effectué à partir de semences ou de petits fragments de feuilles ou de tiges. Il n'est pas nécessaire de disposer de matériel vivant.

La performance et la polyvalence confirmées

F
L
U
R
I
A
F
O
L

Impact R Sopra®



Impact Sopra®



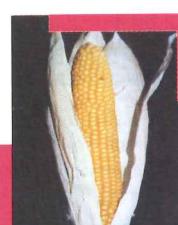
Yellow®



Cicero®



Atout®



Atout 10®

 CHEMINOVA

119, rue Pierre Corneille . 69003 Lyon

Tél : 04 78 71 07 75

Fax : 04 78 62 24 73

IMPACT R Sopra® : AMM n°8300091 - SC - 94 g/l de flutriafol + 200 g/l de carbendazime - Xn nocif
IMPACT Sopra® : AMM n° 8300092 - SC - 125 g/l de flutriafol - Xn nocif
CICERO® : AMM n° 9100303 - 47 g/l de flutriafol + 300 g/l de chlorothalonil - Xn nocif
YELLOW® : AMM n° 9100304 - 117,5 g/l flutriafol + 250 g/l carbendazime - Xn nocif
ATOUT® : AMM n° 9100305 - 0,42 % de flutriafol + 5 % de carbofuran - Xn nocif
Nocif en cas d'ingestion. Irritant pour les yeux. Peut entraîner une sensibilisation par contact avec la peau. Possibilité d'effets irréversibles.
ATOUT® 10 : AMM n° 9200039 - 0,5 % de flutriafol - Non classé.
Marques déposées de CHEMINOVA A/S.

Réutiliser les échantillons

Il sera possible de réutiliser les échantillons pour les soumettre à d'autres tests moléculaires de diagnostic, une fois que ceux-ci auront été développés.

... et ses limites

Outre la nécessité de disposer d'un équipement de base, le test PCR possède les inconvénients de son avantage principal : la spécificité. Parce qu'il est spécifique d'un gène de résistance donné, il est « aveugle » aux autres gènes de résistance. Ceci est bien illustré par l'existence de plantes ne possédant ni l'allèle R1, ni l'allèle R2, mais qui sont résistantes par d'autres mécanismes (Tableaux 1 et 3).

En d'autres termes, si l'on détecte l'allèle R1 ou l'allèle R2 dans une plante, on peut dire qu'elle sera résistante au cycloxydime, au diclofop-méthyle et au fénoxaprop-P éthyle, mais on ne peut pas dire à quels herbicides elle sera sensible, car une même plante peut contenir plusieurs gènes de résistance (Decoin, 2001).

Pour pallier cet inconvénient, il faudrait développer autant de tests de diagnostic qu'on aura identifié de gènes de résistance, ce qui rendrait le diagnostic à l'aide d'outils moléculaires aussi

lourd, voire plus lourd à mettre en œuvre que les tests biologiques.

Et maintenant ?

Il semble n'exister que peu de mutations du gène de l'ACCase conférant une résistance à des herbicides. À ce jour, une seule a été associée à une résistance. Nos données suggèrent que les allèles R1 et R2 de l'ACCase sont les allèles les plus fréquents conférant une résistance à des herbicides inhibant cet enzyme (Delye et coll., sous presse). Cependant, des études enzymologiques ont montré que quelques autres mutations existent dans l'ACCase, associées à des profils de résistance croisée différents (Gronwald, 1991 ; Tardiff et Powles, 1994), dont une mutation qui confère une résistance croisée à plusieurs « fops », mais pas aux « dimes ».

L'identification de telles mutations et le développement d'outils moléculaires de diagnostic sont l'un de nos objectifs. Il est clair que ces outils sont d'un intérêt majeur pour le diagnostic de la résistance, mais aussi pour des utilisations plus fondamentales comme l'étude de la propagation des gènes de résistance dans les populations d'adventices, afin de formuler des préconisations visant à enrayer celle-ci. Toutefois, développer

autant de tests moléculaires qu'il y a de gènes de résistance semble irréalisable. En outre, s'il est assez simple d'étudier les gènes codant pour des cibles enzymatiques d'herbicides (elles sont connues) afin d'y rechercher des mutations, il est beaucoup plus complexe d'étudier les nombreux gènes gouvernant la résistance par détoxication.

Un bon compromis semble être de développer des outils tels que celui décrit ici pour le diagnostic des résistances liées à la cible de l'herbicide les plus fréquentes, et de les utiliser en combinaison avec des tests biologiques, qui sont mieux adaptés aux cas de résistances dues à des détoxications. ■

Remerciements : à la Région Bourgogne pour son soutien financier (Contrat numéro HCP 01/5112/12) ; à Jacques Gasquez (INRA Dijon) pour avoir permis l'utilisation des populations de vulpin et de ray-grass étudiées au cours de ce travail.

Summary

BLACK-GRASS AND RYE-GRASS RESISTANCE TO HERBICIDES

Molecular markers for a rapid diagnosis

Weed control is more and more hampered by herbicide resistance. At the same time, optimal efficacy of spraying programs is required for both environmental and economical considerations. Resistance-diagnostic tools that are both accurate and fast are thus required for this purpose.

Here, we report a PCR-based assay that enable to detect genes conferring resistance to graminicide herbicides both in Black-grass and Rye-grass. These genes have been detected throughout France. The whole test can be performed within 24 hours, and enable to know to which herbicides a weed population is resistant.

The test, however, does not enable to predict to which herbicides the weed population remains sensitive. We conclude that molecular assays should be coupled with bioassays to conduct optimal resistance management strategies.

Key words : cereals, black-grass, rye-grass, resistance genes, cross resistance, herbicides, biological tests, PCR.

Résumé

La résistance aux herbicides est un problème d'importance croissante pour la maîtrise des plantes adventices. Il est en effet nécessaire d'optimiser les traitements herbicides, pour des raisons à la fois économiques et de respect de l'environnement. Pour cela, il faut disposer d'outils de diagnostic de la résistance qui soient rapides et précis.

Nous présentons ici un test de détection par PCR de gènes de résistance à herbicides anti-graminées. Ce test est utilisable indifféremment sur le vulpin ou le ray-grass. Les gènes de résistance ciblés sont présents dans toute la France. Les résultats du test sont disponibles beaucoup plus rapidement que ceux de tests biologiques « classiques » (24 heures), et permettent de savoir à quels herbicides une population de ces adventices est résistante.

Toutefois, le test PCR ne permet pas de dire à quels herbicides cette population reste sensible. De ce fait, tests biologiques et tests moléculaires doivent être utilisés de façon complémentaire pour aider à une gestion rationnelle de la résistance.

Mots-clés : céréales, vulpin, ray-grass, gènes de résistance, résistances croisées, herbicides, tests biologiques, PCR.

Caractéristiques comparées des tests « semence » et « PCR ».

	Test « semence »	Test « PCR »
Matériel de base	Semences aptes à germer uniquement	Tous fragments de plantes, semences... même morts
Délai de réponse	De deux semaines à plusieurs mois (selon dormance des semences)	24 heures
Nature de la réponse	Résistance à un herbicide donné	Présence d'un gène de résistance donné
Avantage principal	Détection de la résistance à un herbicide quel que soit le mécanisme	Diagnostic de la résistance croisée associée à un gène
Inconvénient principal	Nécessite un matériel végétal viable/ apte à germer	Ne détecte qu'un seul mécanisme de résistance
Coût approximatif, hors main-d'œuvre	27,5 euros pour 100 semences et un herbicide	50,2 euros pour 100 analyses

Bibliographie

DECoin M., 1999 - Résistance de graminées adventices : comment les détecter, les gérer, les prévenir. Phytoma-LdV n°515, avril, pp. 15 à 18.

DECoin M., 2001 - Du côté des résistances d'adventices. Avec Jacques Gasquez, quelques enseignements du colloque « Biologie des mauvaises herbes » de septembre 2000 à Dijon. Phytoma-LdV n°534, janvier, pp. 14 à 17.

DÉLYE C., WANG T. ET DARMENCY H., 2002 - An isoleucine-leucine substitution in chloroplastic acetyl-Co A carboxylase from green foxtail (*Setaria viridis* L. Beauv.) is responsible for resistance to the cyclohexanedione herbicide sethoxydim. *Planta* n°214, pp. 421-427.

DÉLYE C., CALMES É. ET MATEJICEK A., sous presse - SNP markers for black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) genotypes resistant to acetyl CoA-carboxylase inhibiting herbicides. *Theoretical and Applied Genetics*.

GRONWALD J.W., 1991 - Lipid biosynthesis inhibitors. *Weed Science* n°39, pp. 435-449.

LETOUZE A., 1999 - Détection et caractérisation des résistances aux herbicides antigraminées chez le Vulpin (*Alopecurus myosuroides* Huds.). Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Lorraine, 132 pages.

LETOUZE A. ET GASQUEZ J., 1998 - Développement d'un test standardisé pour la recherche de résistances croisées. *Annales du*

XVII^e COLUMA-ANPP, pp. 141-148.

TARDIFF F. J. ET POWLES S. B., 1994 - Herbicide multiple-resistance in a *Lolium rigidum* biotype is endowed by multiple mechanisms : isolation of a subset with resistant acetyl-CoA carboxylase. *Physiologia Plantarum* n°91, pp. 488-494.

ZAGNITKO O., JELENKA J., TEVZADZE G., HASELKORN R. ET GORNICKI P., 2001 - An isoleucine-leucine residue in the carboxyl-transferase domain of acetyl-CoA carboxylase is critical for interaction with aryloxyphenoxypropionate and cyclohexanedione inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* n° 98, pp. 6617-6622.