



# Vulpin et ivraies, détecter vite les résistances à certains herbicides blé

Diagnostic rapide de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS (sulfonylurées, triazolopyrimidines, sulfonylamino-carbonyl-triazolinones)

Christophe Délye\*, Karelle Boucansaud\*, Fanny Pernin\* et Bernard Couloume\*\*

Pourquoi déceler le plus tôt possible les résistances de mauvaises herbes à certains herbicides ? Pour éviter des échecs de traitement qui sont des applications inutiles de pesticides. Et aussi pour garder efficaces le plus longtemps possible les herbicides actuels, l'arrivée de produits nouveaux n'étant pas pour demain. Comment effectuer ces détections précoces ? Avec des tests « ADN ». De tels tests permettant de diagnostiquer des résistances aux inhibiteurs de l'acétolactate-synthase (ALS) ont été développés pour deux espèces majeures de graminées adventices : les ivraies (« ray-grass », *Lolium* spp.) et le vulpin des champs (*Alopecurus myosuroides*). Les résultats de l'analyse d'échantillons « suspects » montrent que la résistance due à des mutations dans l'ALS existe en France chez ces deux espèces. La sélection au champ de plantes résistantes peut être rapide si on ne prend pas de précautions.

## Herbicides blé : une situation tendue que la résistance risque d'aggraver

L'emploi intensif des produits phytosanitaires, dont les herbicides, est actuellement remis en question : retrait de nombreuses substances (Directive 91/414/CE, Decoin, 2008), réduction de moitié de l'usage des produits phytosanitaires d'ici 2018 (Plan Écophyto 2018). De ce fait, la gamme des solutions herbicides disponibles risque d'être de plus en plus restreinte. En outre, les contraintes économiques conduisent les agriculteurs à réduire le nombre d'applications. Néanmoins, les herbicides ont toutes les chances de rester longtemps une garantie

d'une production agricole suffisante et de qualité (Di Tullio *et al.*, 2007).

Sur blé, la tendance actuelle est d'employer majoritairement des herbicides inhibiteurs de l'acétolactate-synthase (ALS, cf. Tableau 1). Mais le développement de résistances aux herbicides peut réduire voire annuler l'efficacité des applications d'herbicides en général et des inhibiteurs de l'ALS en particulier. Car ces derniers sont la famille d'herbicides pour laquelle le plus de cas de résistance ont été signalés dans le monde (Heap, 2008).

Peu de nouvelles substances, et aucun nouveau mode d'action, ne semblent devoir être mis sur le marché dans un futur proche. Il est donc indispensable de préserver l'efficacité des substances disponibles, notamment des inhibiteurs de

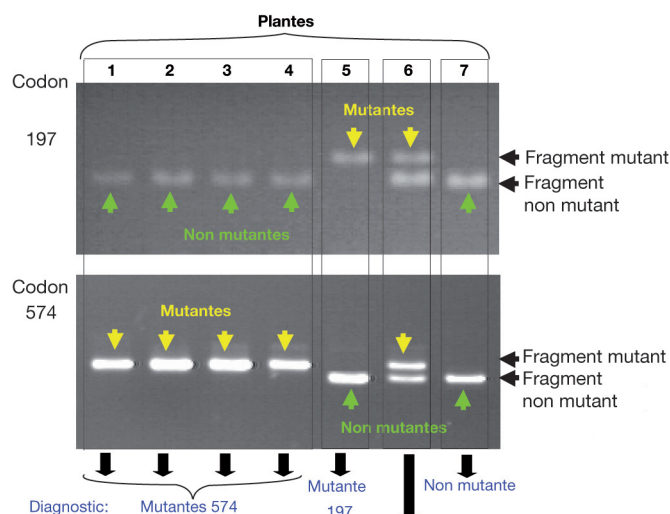
**Tableau 1 - Profils de résistance croisée associés aux mutations connues dans le gène de l'ALS (d'après Tranel *et al.*, 2008). R, résistance ; S, sensibilité, PDD, pas de données. Attention : ces données sont une synthèse de la littérature. Une caractéristique de la plupart des travaux publiés est de ne considérer qu'une mutation particulière, dans une espèce donnée, et une ou deux substances actives représentant une ou deux familles chimiques. L'existence d'exceptions aux profils donnés dans ce tableau est donc possible.**

Position de l'ALS		Familles d'inhibiteurs de l'ALS autorisées sur blé en France		
Numéro	Nombre de mutants résistants connus	Sulfonylurées	Triazolopyrimidines	Sulfonylamino-carbonyl-triazolinones
122	1	R	S	PDD
197	8	R	R	R
205	1	R	R	PDD
574	1	R	R	R
653	2	S	S	PDD
Substances actives autorisées sur blé en France		Amidosulfuron, flupyrsulfuron, iodosulfuron, méso-sulfuron, metsulfuron, sulfosulfuron, thifensulfuron, tribenuron	Florasulam	Propoxycarbazone-sodium
Exemples de produits formulés (substances actives)		Archipel (méso-sulfuron + iodosulfuron), Allié (metsulfuron)	Primus	Attribut

\* INRA, UMR 1210 Biologie et Gestion des Adventices, 17, rue Sully, 21000 Dijon.

\*\* Bayer CropScience France, 16, rue Jean-Marie-Leclair, 69009 Lyon.

**Figure 1** - Visualisation des profils PCR de 7 plantes de Vulpin après électrophorèse sur gel d'agarose (positions 197 [haut] et 574 [bas]). Les tests pour les positions 122, 205 et 673 ne sont pas illustrés (toutes les plantes testées sont non mutantes à ces positions). Chaque plante contient deux copies du gène de l'ALS. Les plantes 1 à 4 possèdent uniquement le fragment non mutant pour la position 197 et le fragment mutant pour la position 574 : elles ont une mutation à la position 574 sur leurs deux copies. La plante 5 possède uniquement le fragment mutant pour la position 197 et le fragment non mutant pour la position 574 : elle a une mutation à la position 197 sur ses deux copies. La plante 6 possède le fragment non mutant et le fragment mutant pour les deux positions : elle a une mutation à la position 197 sur une copie, et une à la position 574 sur l'autre. La plante 7 possède uniquement le fragment non mutant pour les deux positions : elle n'a aucune mutation.



l'ALS, et de rationaliser au mieux leur emploi : un minimum d'applications pour un maximum d'efficacité. Une façon d'y contribuer est de développer des outils permettant un diagnostic rapide et précoce de la résistance.

## La résistance aux inhibiteurs de l'ALS

L'essentiel de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS semble dû à des mutations ponctuelles dans le gène de l'ALS. Des études conduites sur plus de 30 espèces d'adventices ont bien caractérisé ces mutations (Tranel *et al.*, 2008). Cinq positions de l'ALS, toujours les mêmes, sont impliquées dans la résistance (Tableau 1, p. 33).

Toute mutation se produisant à une de ces positions dans l'ALS d'une plante rend cette plante résistante à des inhibiteurs de l'ALS (mais pas forcément à tous, cf. Tableau 1). Sachant cela, il est possible de développer des « tests ADN » de diagnostic des mutations dans l'ALS sans attendre que la résistance se déclare au champ.

## Les tests ADN

Un test ADN permet de détecter une ou des mutations d'intérêt dans le génome d'un individu. Ici, le but était d'identifier des mutations dans le gène de l'ALS. La démarche « classique » dans ce cas est :

- 1) attendre qu'un problème de résistance se déclare au champ,
- 2) collecter des plantes ou des semences,
- 3) vérifier par des tests biologiques que des plantes sont réellement résistantes,

- 4) identifier la ou les mutations en cause,
- 5) développer un test de diagnostic des mutations identifiées (un test par mutation). Cette démarche doit être effectuée de nouveau chaque fois qu'une mutation non détectée par les tests disponibles est en cause dans une résistance. La démarche « classique » est donc longue, et nécessite de développer autant de tests de diagnostic que l'on trouve de mutations. Dans le cas de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS, ceci impliquerait de développer pas moins de 13 tests ! (Tableau 1).

Nous avons donc utilisé une technique dérivée de la PCR permettant de détecter à l'aide d'un seul test toutes les mutations possibles à une position donnée de l'ALS (Délye *et al.*, 2008). Cette technique permet d'amplifier à partir d'un petit morceau de feuille (1 cm x 1 cm) un fragment du gène de l'ALS contenant l'une des cinq positions cruciales pour la résistance. Le diagnostic se fait par digestion enzymatique du fragment. L'enzyme coupe le fragment amplifié par PCR uniquement s'il contient la version non mutante (« sensible ») de la position. Si une mutation, quelle qu'elle soit, est présente à la position étudiée, le fragment amplifié par PCR n'est pas coupé.

La différence de taille observée après électrophorèse (Figure 1) permet de déterminer si la plante analysée est mutante ou non à la position considérée. En cas de détection de mutation, la position à laquelle cette mutation a été détectée renseigne sur les substances auxquelles la plante mutante est résistante (Tableau 1).

Cinq tests (un par position) permettant de diagnostiquer une résistance ont été développés pour chacune de deux espèces majeures de graminées adventices : le vulpin des champs (*Alopecurus myosuroides* Huds.) et les ivraies (« ray-grass », *Lolium* spp.) (Photos page de droite).

## Analyse de quelques parcelles « à problèmes » : la résistance est là !

Les tests ADN ont été utilisés pour analyser 10 échantillons d'ivraies et 12 de vulpin (50 plantes par échantillon) provenant de parcelles où des problèmes de contrôle de ces adventices par des inhibiteurs de l'ALS ont été rencontrés en 2006 ou en 2007 (Tableau 2).

La présence de plantes résistantes dans ces échantillons a également été recherchée à l'aide de tests biologiques de sensibilité (application du mélange iodosulfuron + mésosulfuron, formulation *Atlantis*® WG, sur des lots de 50 plantules au stade 3-4 feuilles).

## Résistance confirmée dans certaines parcelles...

Dans un des échantillons d'ivraie et dans 8 des échantillons de vulpin, de 25 à 100 % des plantes contiennent des mutations dans l'ALS (Figure 2, p. 36).

Les mutations détectées ne concernent que deux positions : 197 et 574. Dans deux des échantillons de vulpin, nous avons détecté la présence simultanée de mutations à ces deux positions (197 et 574), y compris dans une même plante (Figure 2 ; le diagnostic est illustré sur la figure 1).

Les résultats des tests ADN sont corroborés par ceux des tests biologiques (Tableau 2).

Pour ces 9 échantillons, le problème de contrôle observé est clairement lié à la présence de fortes fréquences de plantes mutantes. En effet, même si des différences de sensibilité peuvent exister selon la substance active, l'espèce considérée et la mutation, la plupart des travaux publiés montrent que les mutations aux positions 197 et 574 confèrent toutes deux une résistance aux trois familles d'inhibiteurs de l'ALS autorisés sur blé (Tableau 1).

## ... mais pas dans toutes

Aucune plante mutante n'a été détectée dans 9 des échantillons d'ivraies et dans 4 des échantillons de vulpin (Figure 2).

Les tests biologiques confirment que ces échantillons contiennent très peu ou pas du tout de plantes résistantes (Tableau 2).

Le problème de contrôle observé sur les parcelles concernées semble donc essentiellement dû à une mauvaise application des herbicides. Quelques plantes résistantes ont toutefois été mises en évidence par les tests biologiques. Il est possible qu'elles possèdent une résistance

non liée à l'ALS, qu'il n'est pas possible de détecter à l'aide de nos tests ADN.

La résistance non liée à l'ALS est le plus souvent due à une métabolisation exacerbée d'herbicides ; elle est aussi appelée « détoxication ». La métabolisation exacerbée d'herbicides est très répandue chez le vulpin dans le cas de la résistance aux « fops » (inhibiteurs de l'acétyl-coenzyme A carboxylase ; exemples : fénoxa-prop [*Puma LS®*], clodinafop [*Célio®*]) (Délye *et al.*, 2006).

Son importance dans la résistance aux inhibiteurs de l'ALS reste à évaluer chez le vulpin et les ivraies.

**Sans précautions, la résistance peut évoluer rapidement**

Un résultat frappant de ce travail est la détection de plantes mutantes en fréquences très élevées dans certains échantillons. On observe en effet la présence de jusqu'à 100 % de plantes mutantes sur des parcelles n'ayant reçu des inhibiteurs de l'ALS anti-graminées que pendant 4 ans (5 à 6 applications, Tableau 2).

Ces parcelles étaient pour la plupart conduites en monoculture de blé et désherbées quasi-exclusivement à l'aide d'inhibiteurs de l'ALS anti-graminées. Ceci suggère que l'utilisation sans précaution de ces herbicides peut rapidement entraîner la sélection de plantes résistantes.

**Forces du test...**

**Déceler d'un coup toutes les mutations à une position**

Les tests ADN développés avant ce travail étaient très spécifiques : chacun ne permettait de détecter qu'une seule mutation à une position donnée (exemple : Délye *et al.*, 2002).

Grâce à une technologie différente, les tests présentés ici permettent de détecter toutes les mutations possibles à une position donnée. Ceci est un gros avantage pour les positions où plusieurs mutations peuvent exister, notamment la position 197 pour laquelle 8 mutations sont connues.

**Autres atouts du test ADN**

- Le test ADN possède d'autres atouts :
- Souplesse vis-à-vis du matériel végétal analysé : le diagnostic peut être effectué à partir de petits fragments de feuilles récoltés sur le terrain, conservés « à sec » entre deux feuilles de papier. Il n'est pas nécessaire de disposer de matériel vivant.
  - Rapidité : le temps requis entre la réception de l'échantillon et la lecture du diagnostic est de l'ordre de 48 heures. Ceci permet de savoir très rapidement si des mutations de l'ALS sont présentes sur une parcelle. Sous réserve de la mise au point d'un protocole d'échantillonnage adapté, il est donc possible d'avoir un diagnostic avant d'effectuer le traitement.
  - Possibilité de réutiliser les échantillons pour d'autres tests ADN. Ainsi, des mutations conférant une résistance à des « fops » ont été



Inflorescences d'ivraie (à gauche) et de vulpin (à droite). Le travail rapporté ici concerne 10 échantillons d'ivraie et 12 de vulpin. Il a permis de tester un outil pour détecter rapidement la résistance aux ALS. Et aussi de confirmer la présence de cette résistance en France – mais pas d'en évaluer l'importance.

identifiées par d'autres tests ADN (Délye *et al.*, 2002) dans 32 % des plantes de l'échantillon de vulpin V12. 100 % des plantes de cet échantillon contiennent une mutation de l'ALS (Tableau 2), ce qui signifie que 32 % des plantes de cet échantillon sont résistantes aux inhibiteurs de l'ALS et aux « fops ».

- « Portabilité » : ces tests sont spécifiques d'une espèce mais pas la méthodologie utili-

sée. Il est donc assez aisé de développer des tests ADN pour le diagnostic des mutations de l'ALS chez d'autres espèces d'adventices.

**... et ses faiblesses**

Outre la nécessité de disposer d'un équipement de biologie moléculaire, les tests ADN ont l'inconvénient d'être spécifiques d'un mécanisme de résistance. Les cinq tests permettent de dé-

Tableau 2 - Échantillons de vulpin et d'ivraies étudiés. Les numéros d'échantillons sont les mêmes que figure 2. Le test biologique classe les échantillons en trois classes selon la proportion de plantes résistantes (survivantes au test) : moins de 20 %, de 21 à 50 %, plus de 50 %.				
Échantillon	Nombre d'applications d'inhibiteurs de l'ALS :		% de plantes mutantes (test ADN)	% de plantes résistantes (test biologique)
	Sur la dernière campagne	Sur les 4 dernières campagnes		
Vulpin				
V1	1	4	100%	> 50 %
V2	2	5	100%	Non testé
V3	2	4	85%	> 50 %
V4	2	3	43%	> 50 %
V5	3	6	100%	> 50 %
V6	2	5	95%	Non testé
V7	1	5	38%	> 50 %
V8	1	3	0%	< 20 %
V9	1	5	0%	< 20 %
V10	1	1	0%	< 20 %
V11	1	3	0%	< 20 %
V12	2	5	100%	> 50 %
Ivraies				
I1	2	5	0%	< 20 %
I2	1	2	0%	< 20 %
I3	2	4	75%	> 50 %
I4	1	2	0%	< 20 %
I5	1	3	0%	Non testé
I6	1	1	0%	< 20 %
I7	1	1	0%	< 20 %
I8	1	1	0%	< 20 %
I9	1	2	0%	< 20 %
I10	1	2	0%	< 20 %



## Bibliographie

- Decoin M., 2008 - Réglementation demain, ce qui se prépare en France. Phytoma-LdV, 616, pp. 21-25.
- Délye C., Boucansaud K., 2008 - A molecular assay for the proactive detection of target site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides*. Weed Research, 48, pp. 97-101.
- Délye C., Matějček A., Calmès É., Chauvel B., 2002 - Résistances aux herbicides chez le vulpin et le ray-grass : des marqueurs moléculaires pour un diagnostic rapide. Phytoma-LdV, 548, pp. 41-46.
- Délye C., Chauvel B., Guillemain J.-P., Menchari Y., Matějček A., Michel S., Camilleri C., Bérard A., Brunel D., Dessaint F., 2006 - La résistance du vulpin des champs aux anti-graminées dans les blés en France - La métabolisation : son importance crée une situation à risque. Phytoma-LdV, 598, pp. 12-16.
- Di Tullio E., Baldi S., Bono P., Culver J., Filippini R., Gentile E., Magnatti P., Pipia D., Spigola M., Zaghi A., 2007 - L'agriculture européenne du futur : le rôle des produits phytosanitaires. Institut Nomisma, Bologne, Italie, 50 pages. Sur demande à agri-food@nomisma.it, ou auprès des auteurs.
- Heap I.M., 2008 - Herbicide resistant weeds. <http://www.weedresearch.com>
- Tranel P.J., Wright T.R., Heap I.M., 2008 - Mutations from herbicide-resistant weeds. <http://www.weedscience.com>

p.h. MF Delannoy



Champ de blé lors de la moisson de 2008.

Le travail présenté ici a permis de valider un test rapide de détection de résistance. En revanche, ce n'est pas une enquête aux résultats représentatifs des résistances aux inhibiteurs de l'ALS en France.

tecter dans une espèce d'adventices toutes les résistances actuellement connues dues à des mutations de l'ALS. Ils sont en revanche « aveugles » aux autres gènes de résistance.

Ceci est bien illustré par la détection de quelques plantes résistantes par les tests biologiques dans des échantillons de vulpin ou d'ivraies où aucune mutation de l'ALS n'a été détectée par les tests ADN (Tableau 2).

De ce fait, les tests ADN sont idéals pour donner un premier diagnostic, très rapide, de la résis-

tance. Ce diagnostic doit ensuite idéalement être complété par des tests biologiques pour être complet.

## Conclusion

Les tests ADN ont permis d'effectuer un diagnostic rapide de la résistance due à des mutations dans l'ALS dans les échantillons d'ivraies et de vulpin analysés.

Deux points sont à retenir à l'issue de cette étude.

## Il faut alterner les modes d'action, pas seulement les familles chimiques

Les mutations identifiées dans les échantillons analysés ne concernent que deux positions : 197 et 574. Ceci est cohérent avec les données de la littérature, où des mutations à ces positions sont de loin les plus fréquemment observées (Tranel *et al.*, 2008).

Les positions 197 et 574 sont aussi actuellement les seules dont l'implication dans la résistance aux inhibiteurs de l'ALS ait été montrée chez des graminées adventices. Les mutations à ces deux positions semblent toutes conférer une résistance aux trois familles d'inhibiteurs de l'ALS utilisés sur blé (Tableau 1).

De ce fait, une rotation efficace des substances actives pour prévenir la résistance doit considérer des modes d'action différents, et pas seulement des familles chimiques différentes mais ayant un même mode d'action.

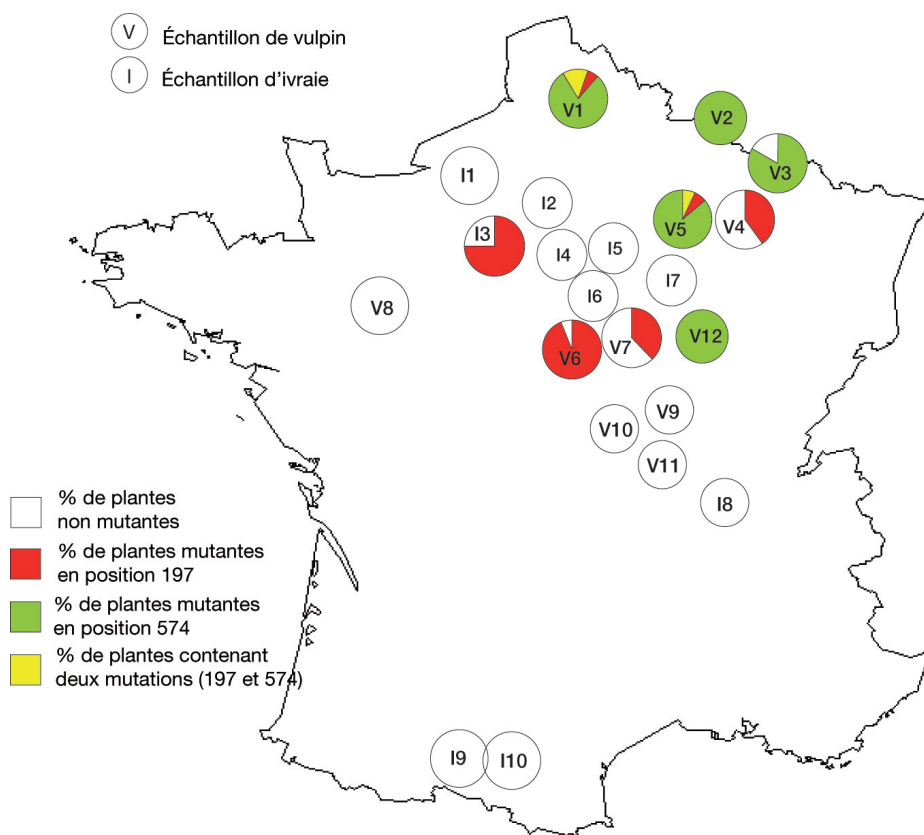
## Monoculture risquée

Les tests ADN ont indirectement permis de montrer que des programmes de désherbage basés exclusivement ou essentiellement sur des inhibiteurs de l'ALS peuvent dans certains cas aboutir rapidement à l'obtention de fréquences élevées de plantes mutantes (Tableau 2). La monoculture de blé est probablement un facteur facilitant la sélection de graminées adventices résistantes.

## Attention, pas de généralisation hâtive !

Le mot de la fin : les cas étudiés ici ne sont certainement pas représentatifs de la situation générale en France. En effet, les échantillons analysés proviennent tous de parcelles où des problèmes de contrôle ont été signalés. Ils ont néanmoins valeur d'avertissement, en soulignant la nécessité de bien raisonner l'emploi des inhibiteurs de l'ALS dans leur ensemble, et de les inclure dans un ensemble diversifié de pratiques culturales.

**Figure 2** - Proportions de plantes contenant des mutations de l'ALS dans 12 échantillons de vulpin et 10 d'ivraies.





## Résumé

Les inhibiteurs de l'acétolactate-synthase (ALS) sont actuellement une classe majeure d'herbicides pour le désherbage des graminées dans le blé. La capacité de diagnostiquer rapidement la présence de plantes résistantes dans les parcelles contribue au maintien de leur efficacité. La plupart des cas de résistance à ces substances sont dus à des mutations dans le gène de l'ALS.

Des tests « ADN » ont été développés chez les principales graminées adventices du blé, le vulpin (*Alopecurus myosuroides*) et les ivraies (*Lolium* spp.). Ces tests permettent de détecter n'importe quelle mutation dans l'ALS connue pour conférer une résistance. Le diagnostic peut être obtenu 48 heures après l'arrivée des échantillons (feuilles, même sèches) au laboratoire.

Les tests ont servi à analyser des échantillons d'ivraies et de vulpin provenant de parcelles où des échecs de contrôle de ces adventices par des inhibiteurs de l'ALS ont été observés. Ils ont révélé la présence de mutations de l'ALS en fréquences élevées dans 9 des 22 échantillons étudiés. La résistance liée à l'ALS semble pouvoir évoluer rapidement dans certains cas, notamment si le programme de désherbage est basé essentiellement sur des inhibiteurs de l'ALS anti-graminées. Ceci souligne la nécessité de raisonner l'emploi de ces molécules et de les inclure dans un ensemble diversifié de pratiques culturales.

**Mots-clés :** vulpin, ivraie, ray-grass, *Lolium*, *Alopecurus*, ALS, résistance, diagnostic, blé.

## Summary

### DNA-BASED ASSAYS FOR RAPID DIAGNOSIS OF RESISTANCE TO ALS INHIBITORS IN BLACK-GRASS AND RYE-GRASS

Herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) are currently of major importance for grass weed control in wheat in France. Rapid resistance diagnosis can help upholding their efficacy. Most cases of resistance to ALS-inhibiting herbicides are due to mutations in the gene encoding ALS.

DNA-based assays were developed to detect any ALS mutation endowing resistance in black-grass (*Alopecurus myosuroides*) and ryegrasses (*Lolium* spp.). These tests enable resistance diagnosis from leaf fragments, even dried, within 48 hours.

They were used to analyse black-grasses and ryegrasses sampled in fields where ALS inhibitor application failures were reported. The tests detected high frequencies of ALS mutations in 9 out of the 22 samples analysed. ALS-based resistance can likely evolve rapidly in some cases, especially when herbicide spraying programs are mostly based upon ALS inhibitors targeting grass weeds. This emphasizes the need to ponder ALS inhibitor applications, and to use them in association with the highest possible diversity of cultural practices.

# Détection et piégeage des insectes ravageurs



## DE SANGOSSE et Agrisense

proposent plusieurs types de pièges où les insectes ravageurs sont attirés par un attractif sexuel (phéromone), alimentaire ou chromatique.

- **Simplicité** d'utilisation.
- **Rapidité** de l'identification des champs à risque.
- **Précision** sur la répartition des insectes dans un lieu donné sur une saison donnée.
- **Détermination** du calendrier optimal de traitement.
- **Protection** des insectes utiles en évitant des pulvérisations inutiles.
- **Évaluation** de l'efficacité des mesures de lutte.

## Avantages d'un suivi fiable des ravageurs

Les informations recueillies à partir des pièges à insectes servent à rendre la lutte contre les ravageurs :

- plus simple
- plus sûre
- plus efficace
- plus économique



Cécidomyie



Sésamie



Tordeuse



Pyrale

