



HAL
open science

Bases génétiques de la réponse aux contraintes de l'agroécosystème chez les plantes adventices (“mauvaises herbes”): Niveau d'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress herbicide

Assia Sadaoui

► To cite this version:

Assia Sadaoui. Bases génétiques de la réponse aux contraintes de l'agroécosystème chez les plantes adventices (“mauvaises herbes”): Niveau d'expression de gènes impliqués dans la réponse au stress herbicide. [Internship report] Université de Bourgogne (UB), FRA. 2013, 39 p. hal-02803847

HAL Id: hal-02803847

<https://hal.inrae.fr/hal-02803847>

Submitted on 5 Jun 2020

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.

Date de la soutenance : 27 juin 2013.

Par Assia SADAoui.

Mémoire de stage de Master deuxième année, année universitaire 2012-2013

Bases génétiques de la réponse aux contraintes de
l'agroécosystème chez les plantes adventices (« mauvaises
herbes »):

**Niveau d'expression de gènes impliqués dans la réponse
au stress herbicide.**

Réalisé sous la direction de Christophe DÉLYE chargé de recherches INRA, Jeanne
GARDIN et Arnaud DUHOUX, Doctorants.



UMR Agro-écologie

Équipe GEAPSI

(Déterminismes génétiques et environnementaux de l'adaptation des plantes à des systèmes de culture innovants)

INRA Dijon, bâtiment Coste, 17 rue de Sully, 21000 Dijon

SOMMAIRE

INTRODUCTION.....	1
1. Contexte général.....	1
2. La notion de résistance.....	2
3. Pourquoi la résistance non liée à la cible ?.....	3
4. Que savons-nous actuellement de la résistance non liée à la cible ?.....	3
5. Les herbicides étudiés.....	4
5.1) Les herbicides inhibiteurs de l'ACCCase.....	4
5.2) Les herbicides inhibiteurs de l'ALS.....	4
6. Le vulpin des champs et l'ivraie comme objet d'étude de génétique moléculaire.....	5
7. État de l'art de la recherche de gènes de RNLC.....	5
MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	6
1. Préparation des échantillons.....	6
2. Extraction des ARN totaux.....	7
3. Synthèse de l'ADNc (RT).....	7
4. Validation de l'expression.....	7
4.1) Choix des gènes-candidats.....	7
4.2) Protocole PCR.....	8
4-3) PCR quantitative.....	8
RÉSULTATS.....	10
1. Spécificité et efficacité des gènes candidats.....	10
2. La validation des niveaux d'expression des gènes candidats.....	13
2.1) Validation des résultats des RNAseqs.....	13
2-2) Variation inter-individuelle de la surexpression.....	14
2.3) Étude de l'expression des gènes candidats dans d'autres populations.....	19
DISCUSSION.....	20
1. Validation des niveaux d'expression des gènes candidats mesurés par RNA-seq.....	20
2. Variabilité de l'expression des gènes candidats chez l'ivraie et le vulpin.....	21
PERSPECTIVES.....	23
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	25
ABSTRACT.....	29

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figure 1 : Photographie d'un gel d'agarose sous U.V. après migration de produits PCR	8
Figure 2 : Test d'amorces en PCR classique pour 4 gènes candidats chez le vulpin	11
Figure 3: Exemple de courbe de fusion du gène VARC01 sur des échantillons de vulpin	11
Figure 4: Différence d'expression (Ct) de VABC 01 chez les résistantes et les sensibles avant traitement ((référence= mélange Sensibles Avant Traitement).	14
Figure 5: Différence d'expression (Ct) de VABC 01 chez les résistantes et les sensibles 12 heures après traitement (référence= mélange Sensibles Avant Traitement).....	15
Figure 6: Différence d'expression (Ct) de VBD 01 chez les résistantes et les sensibles avant traitement (référence=mélange Sensibles Avant Traitement).....	15
Figure 7 : Différence d'expression (Ct) de VBD 01 chez les résistantes et les sensibles 12 heures après traitement par rapport au mélange Sensibles Avant Traitement.	16
Figure 8 : Différence d'expression (Ct) de VOX01 chez les résistantes et les sensibles avant traitement par rapport au mélange Sensibles Avant Traitement.	16
Figure 9 : Différence d'expression (Ct) de VOX01 chez les résistantes et les sensibles 12 heures après traitement (référence= mélange Sensibles Avant Traitement).....	17
Figure 10 : Niveaux d'expression relatifs de RG1618A chez les plantes résistantes et sensibles avant traitement (référence= mélange Sensibles Avant Traitement).....	17
Figure 11 : Niveaux d'expression relatifs de RG1618A chez les plantes résistantes et sensibles 24 après traitement par rapport au mélange Sensibles Avant Traitement.	18
Figure 12 : Niveaux d'expression relatifs de RGCY92A chez les plantes résistantes et sensibles avant traitement par rapport au mélange Sensibles Avant Traitement.....	18
Figure 13 : Niveaux d'expression relatifs de RG GSTA chez les plantes résistantes et sensibles avant traitement par rapport au mélange Sensibles Avant Traitement.	19
Tableau 1: Gènes candidats validés chez l'ivraie (Duhoux & Délye, 2013) et le vulpin (Petit et al. 2012).....	10
Tableau 2: Liste des gènes candidats chez l'ivraie et le vulpin avec les efficacités qPCR associées. 12	
Tableau 3: Validation de surexpression par qPCR des gènes candidats de vulpin et d'ivraie candidats chez l'ivraie et le vulpin.....	13

LISTE DES ABRÉVIATIONS

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

ACCase: acétyl-coenzyme A carboxylase

ADN: acide désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

ALS : acétolactate Synthase

APPs: aryloxyphénoxy propionates (“fops”)

ARN: acide ribonucléique

ARNm: ARN messenger

PCR: polymerase chain reaction

RNAseq: RNA sequencing

RLC: résistance liée à la cible

RNLC: résistance non liée à la cible

qRT-PCR: quantitative reverse transcriptase PCR

INTRODUCTION

1. Contexte général

L'agriculture et l'industrie alimentaire représentent des secteurs caractérisés par un niveau élevé d'intégration: la production et la transformation des ressources agricoles primaires sont intrinsèquement liées (Nomisma, 2008).

La productivité des cultures agricoles est constamment menacée, en particulier par les mauvaises herbes: les pertes dues à ces organismes peuvent atteindre un tiers de la récolte. Ceci en fait la principale menace en agriculture, devant les ravageurs et les pathogènes (Oerke, 2006). Les technologies agricoles, tels les produits phytosanitaires, jouent dès lors un rôle essentiel dans le maintien de la productivité, profitabilité et compétitivité du secteur agroalimentaire européen avec tous les avantages qu'elles comportent pour la société à long terme (Nomisma, 2008). L'introduction des herbicides a aidé les agriculteurs à contrôler de manière simple, rapide et efficace de nombreux ennemis des cultures très nuisibles dont les mauvaises herbes constituent la menace la plus préjudiciable (Oerke, 2006). En effet, depuis la mise sur le marché dans les années 1945 de molécules herbicides, le temps passé dans la lutte contre les mauvaises herbes a pu se réduire (Boulaine, 1992). Cependant, l'utilisation accrue de ces molécules entraîne souvent des préjudices environnementaux dans les agro-écosystèmes. Des résistances aux herbicides chez les mauvaises herbes ont ainsi été sélectionnées dans certaines espèces, et constituent désormais un problème majeur de l'agriculture conventionnelle (Délye, 2005; Powles & Yu 2010).

Les herbicides sont actuellement le moyen le plus utilisé et le plus efficace pour contrôler les populations d'adventices, mais ils sont confrontés à deux difficultés majeures.

La première est la sélection de mécanismes de résistances aux herbicides dans des populations de bon nombre d'espèces adventices, dont certaines figurent parmi les plus préjudiciables en France. La deuxième difficulté est d'ordre économique et politique : de moins en moins d'herbicides sont et seront disponibles. Créer de nouvelles substances herbicides et aller jusqu'à homologuer un produit demandent un investissement conséquent aux industries phytopharmaceutiques ainsi que du temps.

L'apparition de mauvaises herbes résistantes aux herbicides était inévitable, elle fut même prédite peu de temps après l'arrivée des premiers produits. Les premiers cas de résistances aux herbicides ont été observés en 1957 à Hawaï et contre le 2-4D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique). Depuis, le nombre de cas de résistance aux herbicides n'a cessé d'augmenter dans le monde et en 2013, 400 populations d'adventices contenant au moins un individu résistant ont été signalées chez 217 espèces monocotylédones et dicotylédones d'adventices (Heap, 2013).

Les mécanismes de résistance font partie de la réponse adaptative des adventices au stress exercé par les herbicides. Ils sont sélectionnés par l'application des herbicides, qui vont favoriser la reproduction et le développement des plantes résistantes, initialement présentes en très faible proportion (Duke, 2001). La réglementation en matière de commercialisation de ces molécules est devenue de plus en plus contraignante en Europe (Directive Européenne 2009/414/CE) et un programme de réévaluation des substances actives existantes a conduit au retrait des molécules

jugées nocives pour la santé humaine ou animale en général et pour la qualité des eaux souterraines en particulier. 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 donc ainsi de diminuer (Decoin, 2008). Mais, malgré les cas toujours plus nombreux de résistances et la législation qui se durcit, les herbicides restent le moyen le plus efficace, et le plus utilisé pour désherber. La faisabilité, la fiabilité et l'efficacité de la plupart des autres mesures n'est que modérée, et par conséquent, peu d'agriculteurs abandonnent totalement la lutte chimique. La France est de surcroît une grande consommatrice d'herbicide, même si les quantités appliquées ont largement diminué ces dernières décennies grâce aux nouvelles matières actives, plus efficaces en plus petites quantités (Marash *et al.* 2004).

L'évolution de la résistance dépend bien entendu de l'adventice concernée (système de reproduction) et des mécanismes de la résistance. Le développement de la résistance à un herbicide est ensuite fonction de la pression de sélection (efficacité de l'herbicide, fréquence d'utilisation, activité résiduelle), de la fréquence initiale des gènes impliqués dans cette résistance, des flux de gènes et de la valeur adaptative du génotype résistant sélectionné par l'herbicide.

Comprendre la résistance au niveau génétique, c'est comprendre comment celle-ci fonctionne. Pour cela, l'identification de gènes impliqués dans la résistance et qui seront transmis aux futures générations, nous permettra de savoir par quels biais la plante arrive à survivre aux herbicides. En connaissant comment la plante devient résistante, nous pourrions trouver les moyens pour contourner cette résistance et éviter que les substances herbicides ne deviennent toutes inefficaces. L'étude de résistances, qui réduisent l'efficacité des herbicides, présente un intérêt appliqué pour l'optimisation de leur emploi. Elle possède également un intérêt fondamental puisqu'il s'agit d'un trait fonctionnel évoluant en réponse à une pression de sélection extrêmement puissante d'origine anthropique.

2. La notion de résistance

En France, l'agriculture doit répondre à des contraintes environnementales et écologiques qui s'inscrivent dans le plan «Ecophyto » et qui a pour finalité de diminuer progressivement l'usage des pesticides à -30%. Or, la réduction de la diversité des molécules herbicides disponibles, et éventuellement l'application de doses d'herbicides inférieures à celles recommandées augmentent le risque de sélectionner des résistances (Rüegg *et al.* 2007; Busi *et al.* 2009; Coehelo, 2009).

On parle de résistance aux herbicides si l'adventice est capable, grâce à un trait héritable, de ne pas être tuée par un herbicide et de produire une descendance viable (Gressel, 1990). La résistance n'est pas due à des mutations causées par les herbicides, elle découle de la sélection par les herbicides de mutations naturellement présentes en faibles fréquences (Duke *et al.* 2011). Actuellement, les trois groupes d'herbicides rencontrant le plus de cas de résistance sont respectivement les inhibiteurs de l'ALS, ou acétolactate synthase, du photosystème II et de l'ACCcase, ou Acétyl coenzyme A carboxylase. 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 groupes d'herbicides : les inhibiteurs de l'ACCcase et les inhibiteurs de l'ALS. Les inhibiteurs de l'ALS

sont utilisés sur dicotylédones et monocotylédones (Gasquez *et al.* 2007) alors que les inhibiteurs de l'ACCCase sont uniquement utilisés sur graminées.

Deux types de mécanismes de résistance existent (Délye, 2005; Powles & Yu, 2010; Délye 2013): la résistance liée à la cible (RLC) qui résulte d'un changement de la cible de l'herbicide, généralement une enzyme, et la résistance non liée à la cible (RNLC) due à d'autres mécanismes comme la diminution de la pénétration de l'herbicide dans la plante, la réduction de la translocation de l'herbicide et la séquestration ou augmentation de la métabolisation de l'herbicide (Délye, 2013). Une même plante résistante peut avoir ces deux types de résistance, mais contrairement à la résistance liée à la cible qui est relativement bien connue, les bases moléculaires et génétiques de la résistance non liée à la cible (RNLC) doivent être élucidées. Le choix des agriculteurs est donc de plus en plus limité à une gamme de molécules et de modes d'action d'herbicides pour contrôler les mauvaises herbes. La grande majorité de ces herbicides agissent sur une seule cible enzymatique, qui est généralement impliquée dans un processus métabolique vital chez la mauvaise herbe (Délye, 2013).

3. Pourquoi la résistance non liée à la cible ?

Une étude conduite en France a montré que 80% des plantes résistantes aux « fops » ne possédaient pas de mutations sur le gène codant pour l'ACCCase (Délye *et al.* 2007). Pour ces herbicides, la RNLC est donc prédominante. Or cette dernière n'a pratiquement jamais été étudiée au niveau génétique. La plupart des mécanismes de la RNLC sont dus à la surexpression de gènes chez les individus résistants par rapport aux individus sensibles (Yuan *et al.* 2007, Délye *et al.* 2013). Cette hypothèse est la plus partagée. L'enjeu majeur est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus de RNLC afin de disposer à terme d'outils de diagnostic pouvant aider dans la préconisation de substances herbicides, et de développer de nouvelles stratégies agronomiques pour la contrecarrer.

4. Que savons-nous actuellement de la résistance non liée à la cible ?

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 *et al.* 2013 non publié). 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 basés sur une surexpression de gènes chez les plantes résistantes par rapport aux plantes sensibles (Yuan *et al.* 2007, Délye, 2013). Toute technique permettant de mettre en évidence une différence d'expression de gènes est donc pertinente pour ces études. Quelques gènes intervenant potentiellement dans les mécanismes de RNLC ont déjà été identifiés, chez le vulpin (Cummins, 1997, 1999, 2004, 2009) et l'ivraie.

5. Les herbicides étudiés

5.1) Les herbicides inhibiteurs de l'ACCCase

Trois familles chimiques font partie de cette classe d'herbicides : les Aryloxyphénoxypropionates (fops), les Cyclohexanediones (dime) et les Phenylpyrazoline (dens). Ces herbicides ont une pénétration foliaire et sont donc utilisés en traitement de post-levée pour contrôler les graminées adventices dans les cultures de dicotylédones ou de certaines graminées (Gauvrit, 1996). Ces herbicides inhibent l'acétyl coenzyme A carboxylase des graminées, une enzyme nécessaire à la biosynthèse des acides gras. À la dose au champ, les herbicides inhibiteurs de l'ACCCase tuent 95% à 97% des plantes sensibles (Foster *et al.* 1993). L'application répétée de ces substances sur des effectifs très élevés de graminées adventices a abouti à la sélection de résistances dans de nombreuses populations des adventices (Délye *et al.* 2007; Moss *et al.* 2007). L'apparition de résistances aux inhibiteurs de l'ACCCase a été observée en France chez deux graminées adventices des céréales d'hiver ayant un fort impact économique et agronomique, le Vulpin des champs (*Alopecurus myosuroides* Huds.) et les Ivraies (*Lolium spp.*) dès 1993 (Gasquez *et al.* 2007; Délye & Boucansaud, 2008). La sélection des plantes survivantes, résistantes ou ayant échappé au traitement, se fait rapidement. Cette résistance est due principalement à de la RNLC et un peu de la RNL. En ce qui concerne la RLC, huit mutations de l'ACCCase ont été identifiées chez les graminées, conférant une résistance aux herbicides inhibiteurs de l'ACCCase (Beckie *et al.* 2012) et la RNLC est le mécanisme de résistance de loin le plus important avec plus de 80% des plantes résistantes aux inhibiteurs de l'ACCCase (Délye *et al.* 2007). En effet, une réponse aux nouveaux critères légaux et aux contraintes économiques pourrait être l'augmentation, dans les programmes de traitements, de la proportion des herbicides combinant forte efficacité, faible dose d'emploi, et large spectre d'action. Les substances actuellement disponibles répondant à ces critères sont essentiellement les inhibiteurs de l'acétolactate-synthase (ALS), qui sont appliquées à des doses allant de quelques grammes à quelques dizaines de grammes à l'hectare (Délye *et al.* 2008).

5.2) Les herbicides inhibiteurs de l'ALS

L'Acétolactate synthase (ALS), aussi appelée l'acétohydroxy acide synthase (AHAS), est une enzyme dimérique que l'on trouve chez les plantes et les microorganismes. Les inhibiteurs de l'ALS inhibent l'acétolactate synthase qui catalyse la première étape de la biosynthèse de certains acides aminés (Tranel & Wright, 2002). Ce sont également des herbicides à pénétration foliaire, utilisés en post-levée contre les adventices monocotylédones et dicotylédones. Leur sélectivité est basée sur la capacité de certaines cultures à métaboliser les herbicides (Petit, 2009). La résistance aux inhibiteurs de l'ALS est en partie de la RLC. Des études conduites sur plus de 30 espèces d'adventices ont bien caractérisé les mutations de l'ALS en cause (Heap, 2013). En France, les espèces d'adventices pour lesquelles les problèmes de résistance aux inhibiteurs de l'ALS sont les plus importants sont le Vulpin et les Ivraies. Cependant, une part importante de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS chez ces deux espèces est de la RNLC (Duhoux & Délye 2013). La résistance est également présente chez quelques espèces dicotylédones, et en particulier le Coquelicot (*Papaver rhoeas*) (Délye *et al.* 2011). D'une manière générale, l'importance des herbicides inhibiteurs de l'ALS est appelée à croître dans

l'Union européenne pour deux raisons. La première est que ces molécules sont actives à faibles doses, et répondent donc aux préoccupations de réduction des quantités de produits phytosanitaires. La seconde est l'absence croissante d'autres solutions, due à la réduction de la panoplie d'herbicides disponibles. Cependant, la tendance à une extension de l'emploi des inhibiteurs de l'ALS crée une situation très précaire, car ceux-ci sont la classe d'herbicides contre laquelle des résistances sont le plus facilement sélectionnées (Tranel & Wright 2002; Powles & Yu 2010; Heap, 2013).

6. Le vulpin des champs et l'ivraie comme objet d'étude de génétique moléculaire

Alopecurus myosuroides (Vulpin, Poaceae) est une mauvaise herbe d'importance économique majeure dans les cultures d'hiver en Europe. Le vulpin des champs est une graminée annuelle de la famille des Poacées. La plante adulte mesure de 20 à 70 cm avec des tiges glabres et genouillées à la base. L'espèce est présente partout en France surtout dans les régions tempérées nordiques et continentales froides et suffisamment humides (Mamarot, 2002).

L'ivraie (*Lolium ssp*) une plante herbacée annuelle de la famille des Poacées, qui réclame en général un climat doux, ensoleillé et relativement humide. Elle mesure 50 cm à 1m. C'est une espèce annuelle, sub-méditerranéenne. Elle est fréquente et souvent abondante dans les vignes, les vergers et les céréales d'hiver du sud de la France. Sa nuisibilité est redoutée des céréaliers (Mamarot, 2002). En France, ces deux espèces ont développé des résistances envers les herbicides inhibiteurs de l'ACCCase dès 1993 et les herbicides inhibiteurs de l'ALS dès 2006. Cette résistance est en grande partie due à des mécanismes de RNLC.

7. État de l'art de la recherche de gènes de RNLC

Ce type de résistance est une menace majeure pour la protection des cultures, car elle peut conférer une résistance imprévisible aux herbicides, y compris à des herbicides avec des modes d'action différents (Petit *et al.* 2010).

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.

- 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).

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.

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 détoxification sont plus activés suite au traitement herbicide chez les sensibles que chez les résistants. 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).

La présente étude constitue une contribution à la détermination des bases génétiques de la réponse adaptative des plantes adventices aux contraintes de l'agroécosystème. Nous considérerons une contrainte anthropique majeure : l'application d'herbicides. Nous tenterons d'identifier des gènes impliqués dans l'adaptation aux herbicides que représente la résistance non liée à la cible chez le Vulpin (*Alopecurus myosuroides*) et l'Ivraie (*Lolium ssp.*). Cette étude décrira l'expression de gènes potentiellement à la base de la RNLC chez ces deux espèces. L'objectif de ce stage sera de vérifier les différences d'expression de gènes-candidats chez des individus résistants à deux types d'herbicides (les inhibiteurs de l'ACCase et de l'ALS) par rapport à des individus sensibles à ces mêmes herbicides, qui sont les deux familles d'herbicides les plus utilisées à l'heure actuelle en France.

MATÉRIEL ET MÉTHODES

L'identification de gènes impliqués dans la RNLC peut être basée sur une stratégie visant à séquencer le transcriptome de quelques plantes résistantes et sensibles.

Pour chaque modalité, deux types de mélanges ont été constitués, un avec des plantes résistantes, l'autre avec des plantes sensibles. La comparaison des plantes résistantes avec les plantes sensibles pour chaque modalité, devrait permettre d'identifier des gènes différentiellement exprimés dans ces populations. La qRT-PCR permettra ensuite de vérifier cette différence d'expression. Cette technique permettra également d'élargir l'observation de ces différences d'expression à un grand nombre de plantes et de populations. Cette dernière étape doit permettre de valider l'implication des gènes-candidats dans la RNLC (surexpression de manière induite ou constitutive). Une durée de six mois est trop courte pour mener ces expérimentations de la caractérisation phénotypique à la validation de gènes de RNLC. Les tests de sensibilité aux herbicides et le séquençage des transcriptomes étaient réalisés avant mon arrivée au laboratoire.

Mon travail a consisté à tester des gènes-candidats, sur différentes F1 ou populations d'adventices, des tests d'amorces aux tests de PCR quantitative.

1. Préparation des échantillons

Pour le vulpin, les tests ont été réalisés sur des plantes deux populations de F1 (CY46H et CY101D) traitées aux inhibiteurs de l'ACCase (CELIO). Ces F1 sont issues du croisement d'une plante mère résistante avec une plante sensible.

Les populations (0882-994), (RG08-068) et (0846-914) étudiées chez l'ivraie sont traités avec un herbicide inhibiteur des ALS (ARCHIPEL).

2. Extraction des ARN totaux

L'extraction est réalisée sur la base des tiges des vulpins et des ivraies (au niveau des méristèmes) avec le RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). Un traitement DNAase est effectué durant l'extraction avec le kit « RNase Free DNase Set» (Qiagen, Courtaboeuf, France). On choisit de prélever au niveau des méristèmes car les ARN totaux sont présents en plus grande quantité à cet endroit. De plus, les enzymes cibles de ces herbicides sont aussi majoritairement exprimées dans les tissus en croissance. Les ARN totaux extraits sont quantifiés à l'aide d'un NanoDrop 2000. L'absence de contaminations en protéines et en sels de nos échantillons est également vérifiée grâce aux ratios A260/A280 et A260/A230.

3. Synthèse de l'ADNc (RT)

Cette étape consiste à transformer l'ARN simple en ADN complémentaire double brin ; c'est la reverse transcription (RT). L'ADNc a été synthétisé à partir de 5µg d'ARN total en utilisant le protocole de RT-PCR Masterscript (5 PRIME, Hambourg, Allemagne). Pour chaque échantillon d'ARN utilisé deux réactions de reverse transcription (RT) indépendantes ont été réalisées pour obtenir des réplicats techniques, tel que recommandé (Bustin 2009, Bustin 2010). Les échantillons ont été immédiatement stockés à -20°C jusqu'à l'utilisation.

4. Validation de l'expression

4.1) Choix des gènes-candidats

RNA-seq

Le RNA-seq est basé sur le séquençage du transcriptome. Cette technique permet donc de comparer à l'échelle du transcriptome entier deux modalités. Les résultats sont d'une part qualitatifs, puisque nous avons la séquence des ARNm ainsi que les potentielles mutations qui peuvent exister, et d'autre part quantitatifs car nous connaissons le nombre exact d'ARNm identiques (et donc le niveau d'expression du gène concerné) (Wilhelm *et al.* 2009).

Un séquençage du transcriptome de 4 plantes résistantes et de quatre plantes sensibles prélevées avant traitement (AT), 2 heures après traitement (2HAT), 6HAT, 12HAT, 24HAT, 36HAT et 48HAT a été effectué par la société Fasteris (Plan-lés-Ouate, Suisse) par la méthode Illumina. Après assemblage du transcriptome et mappage des reads sur les transcrits identifiés par la plateforme LIPM de l'INRA de Toulouse, le profil de chaque transcrit prédit était disponible.

Après la création des profils d'expression, la sélection des gènes candidats a été basée sur les critères suivants :

- ✓ Extraction des clusters (gènes prédits) les plus surexprimés chez les résistants dans une modalité (Avant traitement par exemple).
- ✓ Vérification des profils d'expression (pas surexprimé chez les sensibles uniquement dans cette modalité mais dans toutes). Si possible, induction de l'expression suite au traitement herbicide + surexpression constitutive chez les résistants (avant traitement)
- ✓ Sélection des gènes assez exprimés pour pouvoir mesurer l'expression par qPCR.

- ✓ Intérêt particulier pour les gènes appartenant aux familles telles que les P450, GST, GT, oxydase, transporteurs ABC.
- ✓ Construction d'une liste de 50 gènes candidats en suivant ces conditions.

4.2) Protocole PCR

- **Test des amorces sur ADNg et ADNc**

Nous avons cherché à amplifier des fragments de chaque gène candidat par PCR sur de l'ADNc (ADN complémentaire rétro-transcrit) et de l'ADNg (ADN génomique extrait par la méthode Brutus) chez le vulpin et l'ivraie pour ensuite les faire séquencer par une société spécialisée (Cogenics). La technique consiste à dessiner des amorces sur les séquences les plus conservées du gène, en se basant sur un alignement des séquences connues. En effet, deux amorces Forward et Reverse ont été utilisées pour amplifier des fragments d'ADN compris entre 100pb et 150pb, qui est la taille d'amplicon la plus adaptée au bon fonctionnement de la qRT-PCR.

Pour chaque PCR, un mix de 20 μ l est déposé dans un puits de plaque PCR ou dans un tube PCR 0,5 ml. Les ADN sont ajoutés au mix par la technique de tremper de cône qui consiste à attirer un faible volume d'échantillon (< 1 μ l) 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 initiale à 95°C suivies de 37 cycles de 5 secondes de dénaturation à 95°C, puis de 10 secondes d'hybridation des amorces à une température d'hybridation comprise entre 55°C et 65°C et enfin de 30 secondes d'élongation finale à 72°C. Les amplicons sont visualisés par révélation UV après électrophorèse sur un gel d'agarose à 1.5% ensuite baigné dans du bromure d'éthidium (BET). On obtient alors des photographies de ce type (Figure1).

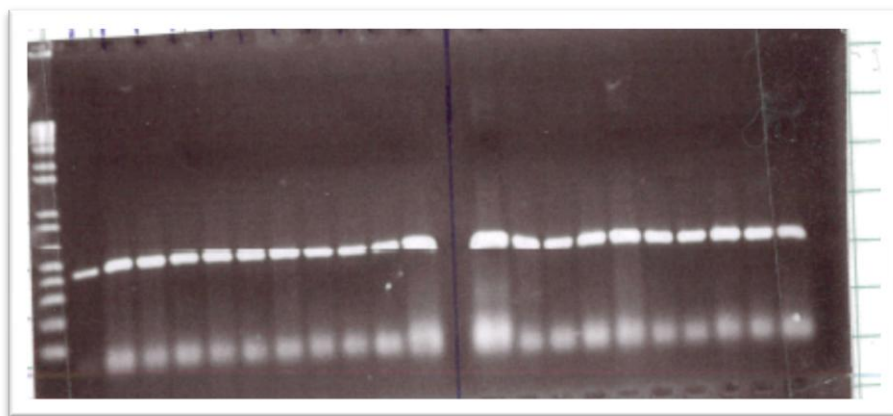


Figure 1 : Photographie d'un gel d'agarose sous U.V. après migration de produits PCR

4-3) PCR quantitative

- **Principe de la PCR quantitative**

La technologie de PCR en temps réel devient de plus en plus populaire dans différents secteurs d'activité. Cette technologie est basée sur la détection et la quantification du « Syber Green » fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant

la réaction de PCR. Le processus complet est automatisé du début à la fin rendant cette technologie très performante pour des applications d'analyses à grande échelle (Poitras & Houde, 2002).

Le développement de la PCR quantitative en temps réel a éliminé les variabilités associées à la PCR quantitative et permet la quantification du produit de la PCR de façon fiable. Afin de recueillir des données quantitatives avec précision, chacun des échantillons doit être analysé dans sa phase exponentielle d'amplification qui est la phase la plus reproductible de la réaction de PCR. La PCR en temps réel fait donc le suivi de la fluorescence émise pendant la réaction avec un indicateur de la production des amplicons durant chaque cycle, à l'opposé de la PCR quantitative conventionnelle où les amplicons ne sont détectés qu'à la toute fin du processus.

Le principe de la PCR en temps réel consiste à obtenir des courbes d'amplification contenant au moins une partie de la phase exponentielle.

- **Avantages et inconvénients**

La technologie basée sur le SYBR Green ne nécessite aucune sonde fluorescente mais sa spécificité repose entièrement sur ses amorces (Bustin, 2000). Elle ne requiert donc aucune expertise particulière pour le design des sondes fluorescentes et n'est pas affectée par des mutations dans l'ADN cible qui influencent l'hybridation des sondes spécifiques (Mackay et al, 2002). Étant donné que le SYBR Green se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin, cette technologie présente une certaine versatilité puisque le même agent peut être utilisé pour détecter plus d'un produit d'amplification dans la même séquence réactionnelle.

Cette technologie présente aussi certains désavantages: 1) étant donné que l'ADN double brin total émet des signaux, il devient impossible en cours de réaction de s'assurer de la spécificité des amplicons ou de discriminer les différents amplicons dans le cas de multiplexage; 2) le mauvais appariement (mis-priming), qui peut générer des bandes d'ADN superflues observables sur gel d'électrophorèse, peut conduire à des faux positifs ou une surestimation de la quantification; 3) l'émission de fluorescence peut être biaisée par la masse moléculaire de l'ADN amplifié : un amplicon plus long fixera davantage de molécules fluorescentes par rapport à un amplicon plus court dans la même réaction (Bustin, 2000).

- **Protocole**

La qPCR a été réalisée en utilisant le système de PCR StepOnePlus™ (Applied Biosystems Foster City, USA).

Pour évaluer l'efficacité de l'amplification de chaque gène candidat, des volumes identiques de tous les échantillons (1µl) d'ADNc des deux RT ont été regroupés. L'efficacité de la PCR a été vérifiée en utilisant une gamme de dilution de cinq points de la gamme de dilution (d1, d2, d3, d4, d5) d'ADNc dilués respectivement au 1/5, 1/25, 1/125, 1/625 et 1/3125. Le volume réactionnel de 20µl contenait 2µl d'ADNc, 10µl de Syber Green, 6µl d'H₂O et 1µl de chaque amorce à 10µM spécifique du gène. L'activation de la polymérase (95 °C pendant 15 min) a été suivie par 40 cycles de quantification (95 °C pendant 15s, T_m correspondante et 72 °C pour 30s).

Une fois que les couples d'amorces choisis pour un gène cible pour comparer l'expression du gène cible entre les résistants et les sensibles, on a utilisé les échantillons d'ADNc dilués 125 fois. Chaque

échantillon d'ADNc dilué a été utilisé pour détecter la fluorescence. Les niveaux d'expression des gènes de référence (Tableau 1) ont été aussi mesurés dans tous les échantillons et utilisés pour normaliser les données d'expression chez les gènes-candidats.

- **Analyse des données**

Les résultats de qPCR ont été analysés en utilisant REST 2009 qui permet de comparer le niveau d'expression d'un gène cible en se basant sur la comparaison entre les Ct. Trois gènes de référence ont été utilisés dans chacun des cas, vulpin et ivraie : respectivement TUB, GAPDH et UBQ, et CAP, GAPDH, et UBQ dont l'expression est stable sous diverses contraintes (Tableau 1).

	Gène de référence ¹	Séquence Primer (5'-3') ²	Longueur d'amplicon (pb)	Tm (C°)	Efficacité qPCR (%)	Coefficient de régression (R ²)
VULPIN	GAPDH (JN599100)	(F)GTATTGTTGAGGGACTGATGACC (R)AGTAAGCTTGCCATTGAACTCAG	182	57	92	0.999
	TUB (JN599101)	(F)TACTGTGGTTGAGCCATACAATG (R)GCAGAGATCAAATGGTTCAAATC	162	60	98	0.993
	UBQ (JN599096)	(F)GCAAGAAGAAGACCTACACCAAG (R)CCTTCTGGTTGTAGACGTAGGTG	199	60	100	0.991
IVRAIE	CAP (AY742902)	(F) ATACAATGCCACTCTCTCAGTC (R) GAGATGAGATGGTTCAAATCAC	95	57	79	0.992
	GAPDH (EU328533)	(F) AGGTTATCAATGACAAGTTTGG (R) ATCAACAGTCTTCTGGGTAGC	83	60	94	0.999
	UBQ (EF470423)	(F) CAAGAAGAAGACGTACACCAAG (R) GACCTTGTAGAACTGGAGGAG	85	57	100	0.998

1. GAPDH glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, TUB beta-tubulin, CAP, Capsine phosphatase, UBQ, ubiquitine.

2. F: forward primer and R: reverse primer.

Tableau 1: Gènes candidats validés chez l'ivraie (Duhoux & Délye, 2013) et le vulpin (Petit et al. 2012)

RÉSULTATS

1. Spécificité et efficacité des gènes candidats

Nous avons testés plusieurs couples d'amorces pour chaque gène candidat, pour vérifier qu'ils marchent en PCR classique et pour ensuite les tester en qPCR. Comme en témoignent les gels d'agarose (Figure2), le nombre de fragments d'ADN détectés grâce à la technique de PCR est variable entre les gènes. Nous recherchons l'amplification forte d'un seul fragment. Certains fragments de gènes sont pratiquement toujours amplifiés (même intensité ou intensité différente selon le Tm choisi), c'est le cas par exemple du fragment d'ADN situé entre 200 et 300 pb pour le VEF 1-2R, et entre 400 et 500 pb pour le VEST01 1-2R. D'autres couples d'amorces ne permettent aucune amplification, c'est le cas du VARC01 1-1R. Chez le VMC1 1-1R, nous constatons un cas d'amplification aspécifique (deux fragments).

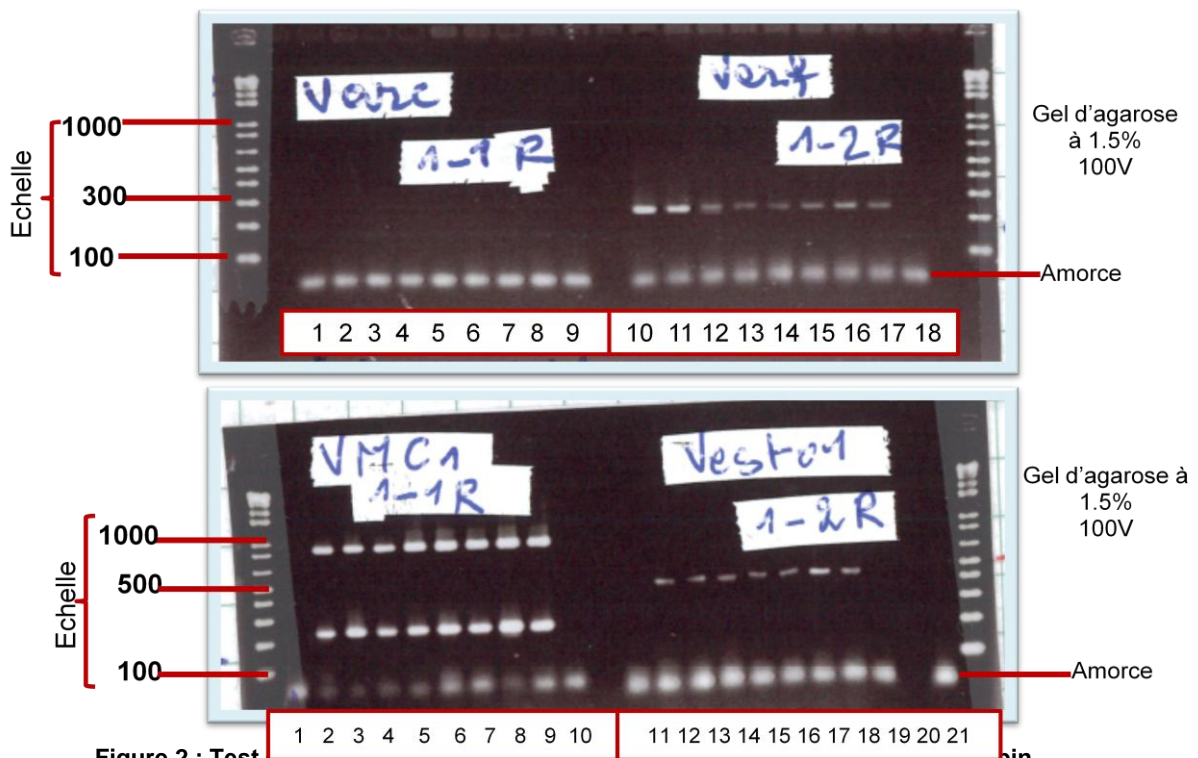


Figure 2 : Test d'amorces en PCR classique pour 4 gènes candidats chez le vulpin

Figure 2 : Test d'amorces en PCR classique pour 4 gènes candidats chez le vulpin

Une fois qu'un couple d'amorces pour un gène candidat est validé par PCR classique, nous l'avons passé en qPCR pour suivre son expression en temps réel.

Les profils de courbes de fusion obtenues pour les amorces sélectionnées pour chaque gène candidat ont confirmé l'absence de dimères d'amorces et d'amplicons non spécifiques, et on observe seule courbe de fusion propre à la température correspondante (Figure 3).

Les résultats présentés dans le Tableau 2 montrent la spécificité de l'amplification chez l'ensemble des gènes candidats. Avec les couples d'amorces que nous avons mis au point, les valeurs d'efficacité de la qPCR variant de 80% (RGCanHA) à 113% (RG58710) ont été jugées acceptables. L'amplification spécifique des amplicons cibles a été confirmée par séquençage. Les coefficients de corrélation de la gamme de dilutions sont également présentés dans le Tableau 2.

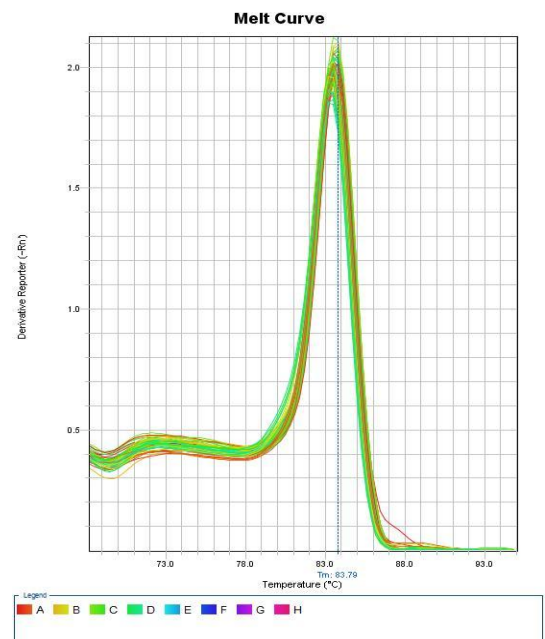


Figure 3: Exemple de courbe de fusion du gène VARC01 sur des échantillons de

	Gènes candidats	Fonction principale	Longueur d'amplicon (pb)	Tm (C°)	Efficacité qPCR (%)	Coefficient de régression (R ²)
VULPIN	VCYP71B01	Cytochrome P450	276	65	82	0.984
	VCYP73	Cytochrome P450	437	69	102	0.992
	VABC02	ABC transporteur	196	68	82	0.965
	VOX01	Oxydase	178	63	102	0.987
	VGT02	Glycosyl transférase	136	67	82	0.984
	VEST02	carboxyestérase	129	68	98	0.991
	VARC01	Résistance maladie (domaine NB arc)	282	68	86	0.996
	VPEROX	Plant peroxydase	390	70	96	0.997
	VERF1	Facteur de transcription (lié à pathogène)	242	65	84	0.987
	VCYP71B2	Cytochrome P450	166	61	90	0.996
	VBD01	NAD(P) binding domain	143	70	116	0.984
	VI02	Inconnue	298	68	98	0.993
	VI03	Inconnue	464	68	86	0.87
	VI04	Inconnue	152	68.5	104	0.993
IVRAIE	RG1677A	Inconnue	143	60	86	0.998
	RG1618A	Inconnue	166	60	88	0.977
	RGGSTA	Glutathione S-transferase	100	60	94	0.989
	RG22792	Inconnue	107	60	92	0.975
	RG58710	Inconnue	127	60	113	0.986
	RGGSTB	Glutathione S-transferase	138	60	87	0.989
	RG14150	Inconnue	125	60	87	0.989
	RG18973	Inconnue	139	60	88	0.965
	RG48902	Inconnue	114	60	92	0.997
	RG32962	Inconnue	141	60	82	0.999
	RG35237	Inconnue	105	60	111	0.985
	RG37066	Inconnue	121	60	81	0.999
	RGCanHa	Inconnue	121	60	80	0.984
	RGCYP92A	Cytochrome P450	270	60	94	0.986
	RG295A	Inconnue	150	60	97	0.864
	RGUroMAT	Inconnue	137	60	87	0.986
	RGPLECA	Inconnue	150	60	80	0.999
	RG28897	Inconnue	11	60	80	0.976

Tableau 2: Liste des gènes candidats chez l'ivraie et le vulpin avec les efficacités qPCR associées.

Pour des raisons de confidentialité, la séquence des amorces sélectionnées n'est pas donnée dans le rapport.

2. La validation des niveaux d'expression des gènes candidats

Après avoir vérifié l'efficacité et la spécificité de l'amplification de nos 14 et 18 gènes candidats de vulpin et d'ivraie, respectivement. On s'est ensuite focalisé sur la quantification de l'expression de ces derniers chez les plantes sensibles et résistantes de notre échantillon qPCR, en prenant pour exemple les modalités suivantes: avant traitement (AT) et 12 heures après traitement (12 HAT), pour le vulpin et AT et 24HAT pour l'ivraie.

2.1) Validation des résultats des RNAseqs

Le RNAseq a permis d'établir des différences d'expression globales entre un pool de plantes résistantes et un pool de plates sensibles, chez le vulpin comme chez l'ivraie.

Gènes candidats	Fonction principale	R/S AT		R/S 12HAT	
		RNAseq	qPCR	RNAseq	qPCR
VCYP73	Cytochrome P450	180,50	82,03	14,27	54,64
VABC02	ABC transporteur	30,00	4,45	3,10	2,04
VOX01	Oxydase	2,16	2,11	2,45	3,82
VGT02	Glycosyl transférase	6,17	7,14	2,43	7,44
VEST02	carboxyestérase	15,65	2,98	1,86	2,69
VARC01	Résistance maladie (domaine NB arc)	1,16	0,80	2,44	6,29
VPEROX	Plant peroxydase	5,17	4,80	2,80	3,00
VERF1	Facteur de transcription (lié à pathogène)	3,99	46,86	2,79	34,18
VCYP71B2	Cytochrome P450	0,77	1,15	1,80	1,13
VBD01	NAD(P) binding domain	9,07	4,64	4,78	5,92

Gènes candidats	Fonction principale	R/S AT		R/S 24HAT	
		RNAseq	qPCR	RNAseq	qPCR
GSTA	Glutathione S transferase	3,44	7,14	9,68	8,47
CYP92A	Cytochrome p450	2,95	5,63	5,97	3,85
1618A	Inconnue	111,43	158,12	555,56	263,13
GSTB	Glutathione S transferase	11,84	3,00	6,30	1,12

Pour les autres gènes, pas de données quantitatives car il n'y a pas d'expression chez les sensibles

Tableau 3: Validation de surexpression par qPCR des gènes candidats de vulpin et d'ivraie candidats chez l'ivraie et le vulpin.

La comparaison globale entre plantes sensibles et résistantes avant traitement, nous permet de valider la surexpression consécutive chez les individus résistants par rapport aux sensibles. Le 12HAT pour le vulpin et 24 HAT pour l'ivraie sont les modalités où l'on a observé les plus fortes inductions

d'expression des gènes candidats chez les individus résistants par le traitement herbicide sur la base des données du RNAseq.

Le VBD01 par exemple, présente une surexpression significative (REST, p-value=0,0001) chez les résistants même, à la modalité avant traitement. C'est le cas aussi pour le RGGSTA, ou nous avons constaté une faible expression chez les individus sensibles (REST, p-value= 0,0005) par rapport aux résistants pour les deux modalités de prélèvement (AT et 24HAT).

2-2) Variation inter-individuelle de la surexpression

Sur l'ensemble des gènes candidats étudiés, nous allons nous focaliser sur une étude détaillée de six parmi l'ensemble (trois pour le vulpin et trois pour l'ivraie), puis faire une synthèse globale, par catégorie des profils d'expression.

- *Vulpin*

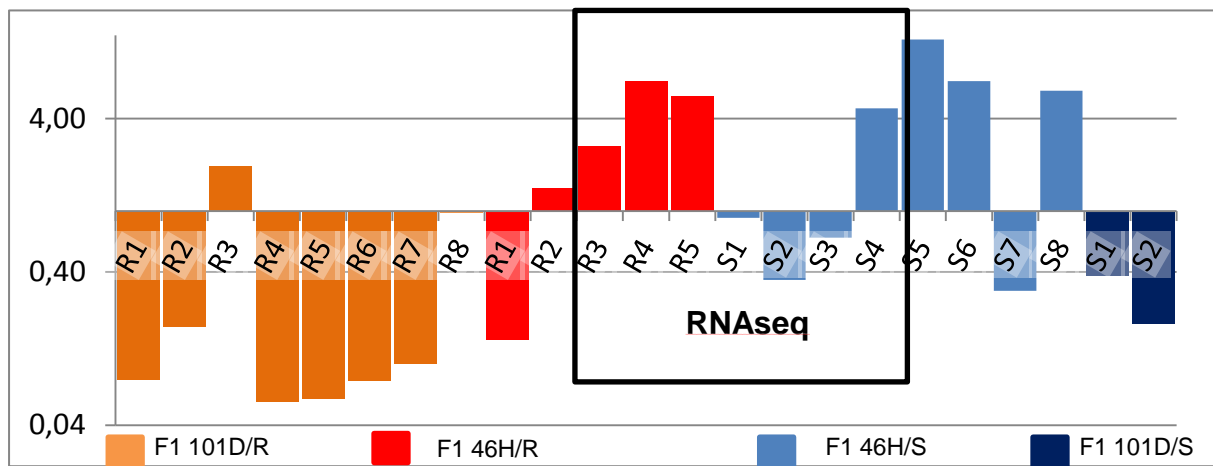


Figure 4: Différence d'expression (Ct) de VABC 01 chez les résistantes et les sensibles avant traitement (référence= mélange Sensibles Avant Traitement).

Concernant les résultats du RNAseq pour le gène VABC01, les individus résistants le surexpriment globalement par rapport aux individus sensibles, avant traitement (Figure 4) et à 12 heures après traitement (Figure 5). En revanche, en regardant individu par individu, ce gène est surexprimé chez les trois individus résistants et un individu sensible, et sous exprimé chez trois autres individus sensibles pour la modalité (AT) de la population CY46H (individus de du RNAseq « R3, R4, R5, S1, S2, S3 et S4 ») (Figure 4). Cependant, pour la modalité 12HAT (Figure5), le gène est exprimé chez trois plantes résistantes de du RNAseq, et sous-exprimé chez l'ensemble des plantes sensibles.

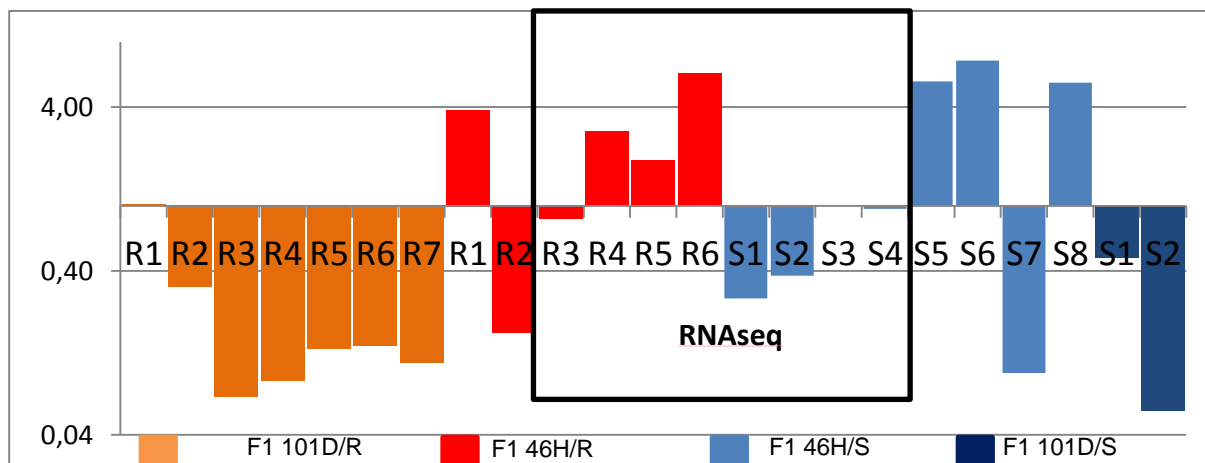


Figure 5: Différence d'expression (Ct) de VABC 01 chez les résistantes et les sensibles 12 heures après traitement (référence= mélange Sensibles Avant Traitement).

Les résultats du RNAseq sont également confirmés pour le gène VBD01: de manière globale, ce gène est surexprimé chez les résistantes par rapport aux sensibles. En considérant les plantes individuellement, le gène VBD01 est surexprimé chez deux plantes résistantes de la population CY46H et chez une plante sensible de cette population à la modalité (AT) (Figure 6). 12heures après traitement, ce gène est surexprimé chez une seule plante résistante et sous exprimé chez les quatre plantes sensibles (Figure 7).

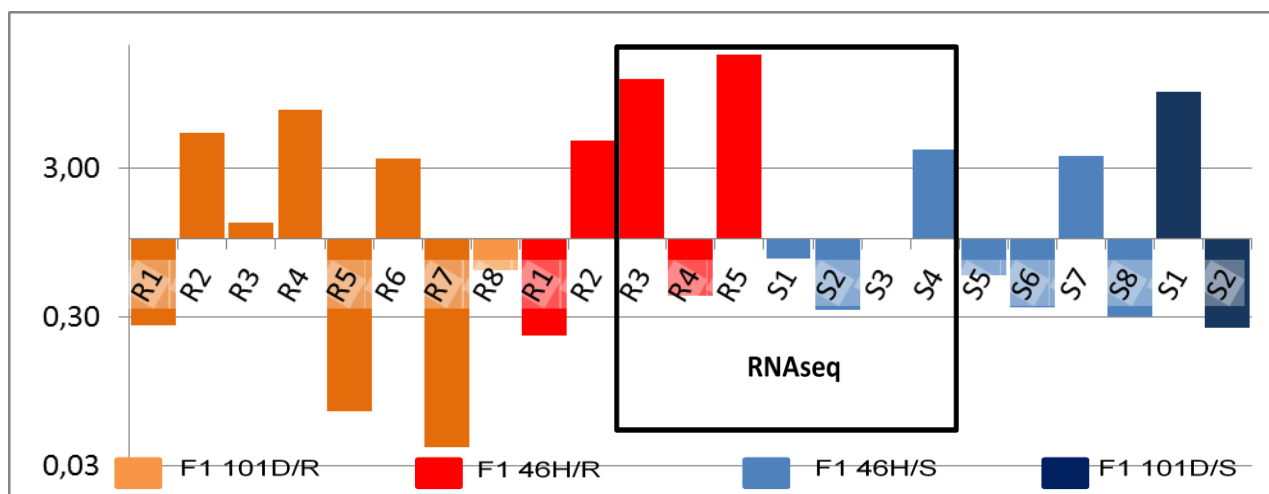


Figure 6: Différence d'expression (Ct) de VBD 01 chez les résistantes et les sensibles avant traitement (référence=mélange Sensibles Avant Traitement).

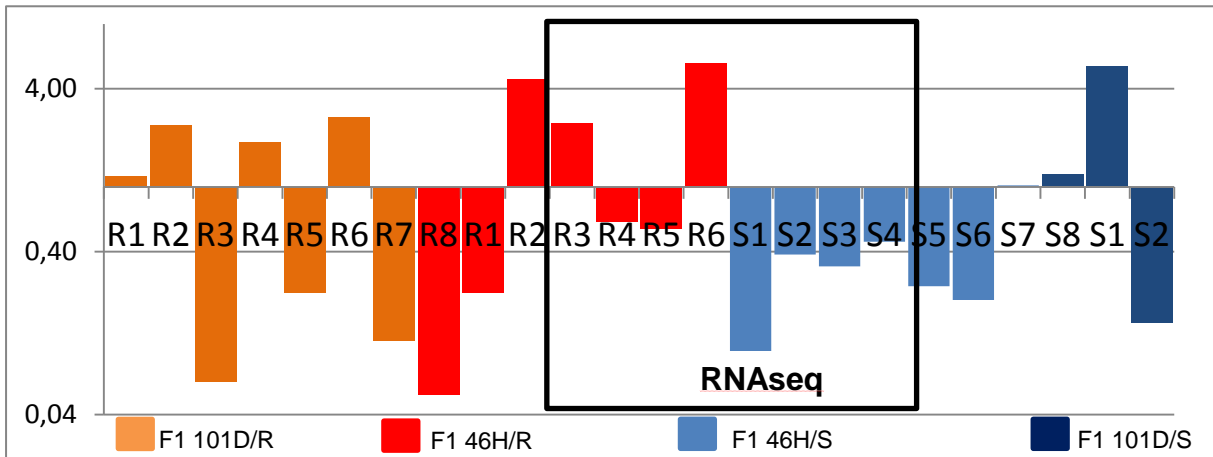


Figure 7 : Différence d'expression (Ct) de VBD 01 chez les résistantes et les sensibles 12 heures après traitement par rapport au mélange Sensibles Avant Traitement.

Globalement, le gène VOX01 est surexprimé chez les résistants par rapport aux sensibles, que ce soit AT et 12 HAT (Figures 8 et 9).

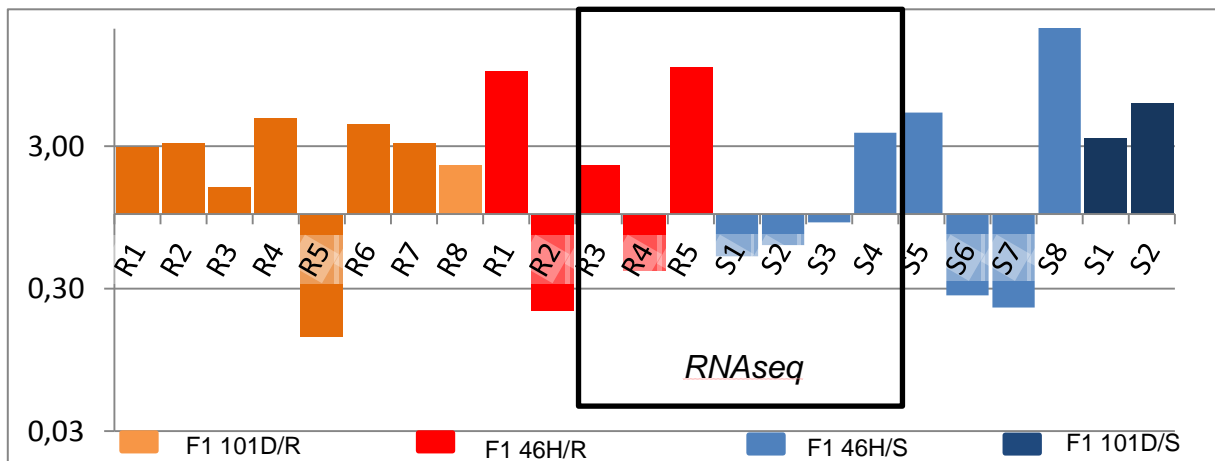


Figure 8 : Différence d'expression (Ct) de VOX01 chez les résistantes et les sensibles avant traitement par rapport au mélange Sensibles Avant Traitement.

En comparant plante par plante, nous constatons que le VOX01 est surexprimé juste chez une seule plante résistante de l'RNAseq. 12 heures après traitement, ce gène est sous-exprimé chez les plantes sensibles.

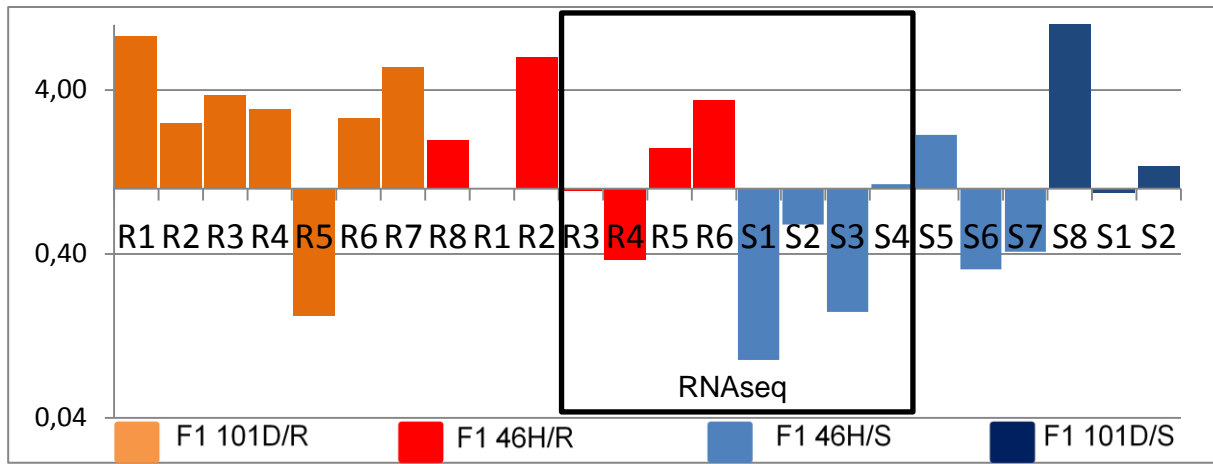


Figure 9 : Différence d'expression (Ct) de VOX01 chez les résistantes et les sensibles 12 heures après traitement (référence= mélange Sensibles Avant Traitement).

• *Ivraie*

La Figure 10 illustre le niveau d'expression du gène RG 1618A par chaque plante. Ce dernier est vachement exprimé chez les trois plantes résistantes du RNAseq (Figure 10). L'expression chez les sensibles n'est exprimé que par une seule plante. Si nous regardons la modalité (24HAT) (Figure 11), nous nous apercevons que l'expression ne change pas, par rapport à la modalité avant traitement (Figure 12).

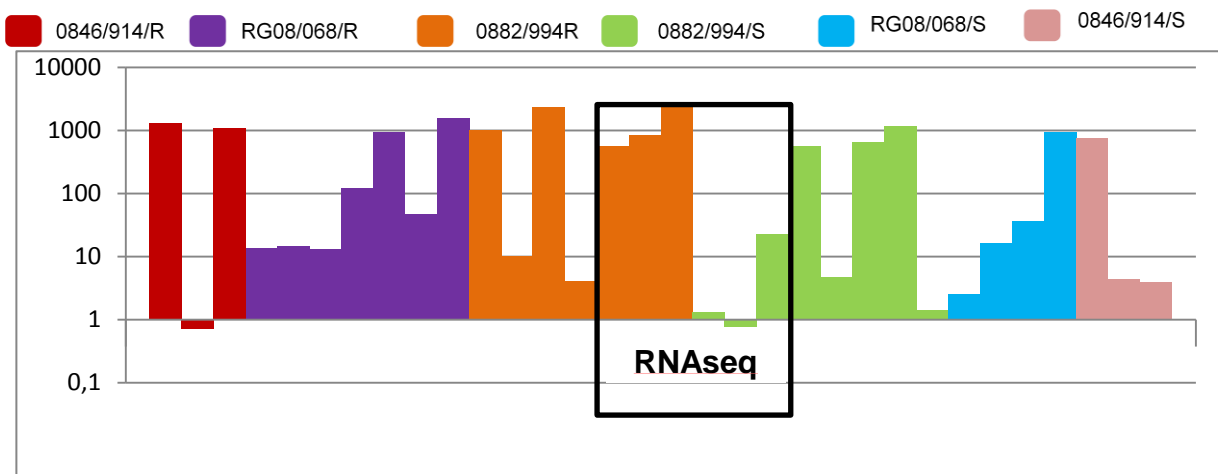


Figure 10 : Niveaux d'expression relatifs de RG1618A chez les plantes résistantes et sensibles avant traitement (référence= mélange Sensibles Avant Traitement).

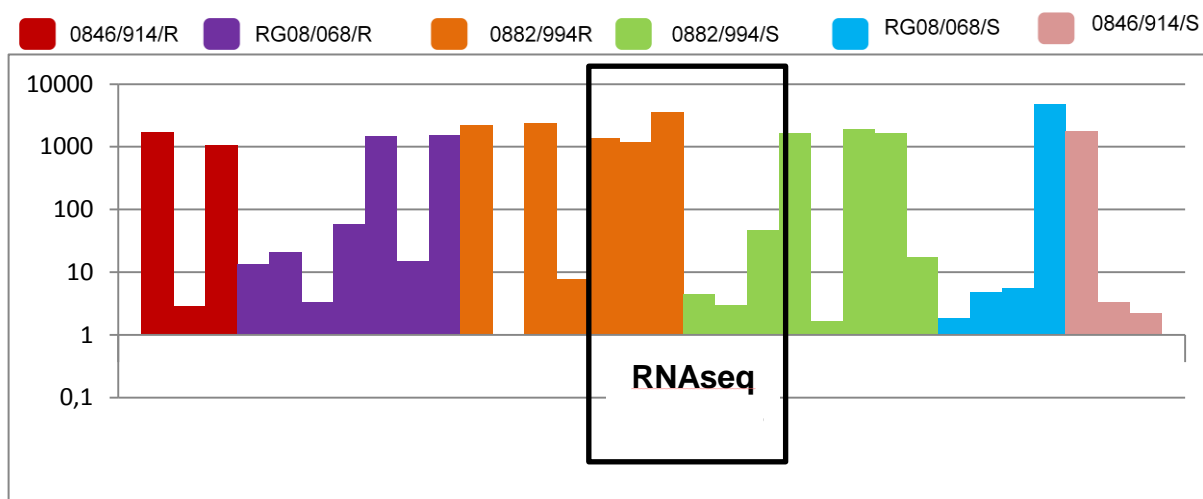


Figure 11 : Niveaux d'expression relatifs de RG1618A chez les plantes résistantes et sensibles 24 après traitement par rapport au mélange Sensibles Avant Traitement.

Au cours de notre étude, on s'est intéressée à l'expression de la résistance par le RGCYP92A. Les résultats après passage de ce gène candidat sur les échantillons du RNaseq en qPCR ont montré qu'à la modalité avant traitement, le gène n'était pas du tout exprimé chez les plantes du RNaseq, ni sensibles, ni résistantes (Figure 12).

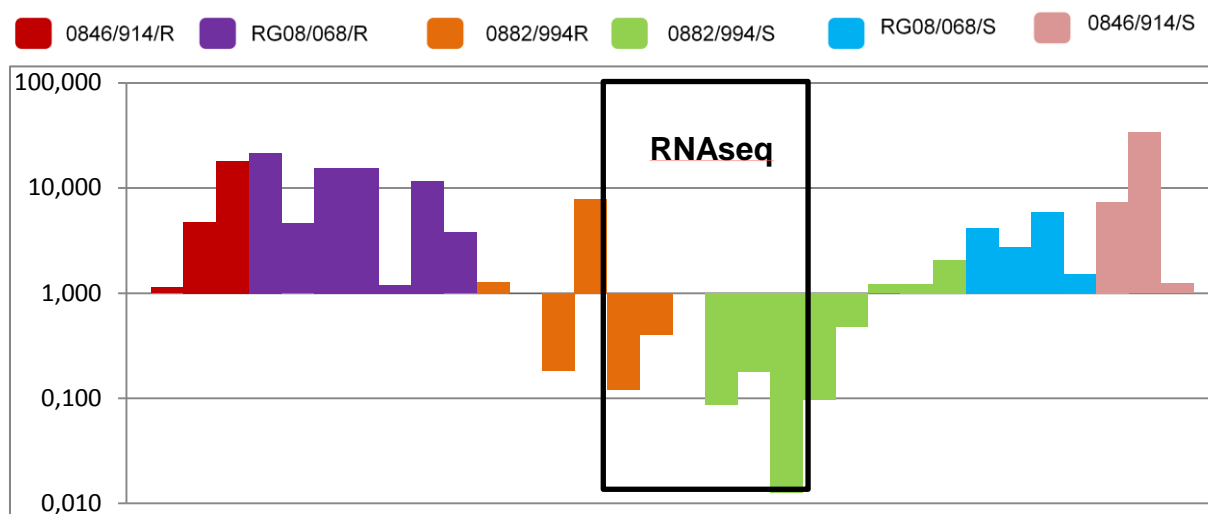


Figure 12 : Niveaux d'expression relatifs de RGCYP92A chez les plantes résistantes et sensibles avant traitement par rapport au mélange Sensibles Avant Traitement.

Et pour le RG GSTA, une surexpression est confirmée chez les individus résistants par rapport aux sensibles. Elle est due principalement à son expression chez les trois plantes résistantes. Ce gène est peu exprimé chez les plantes sensibles du RNaseq à la modalité avant traitement (Figure 13).

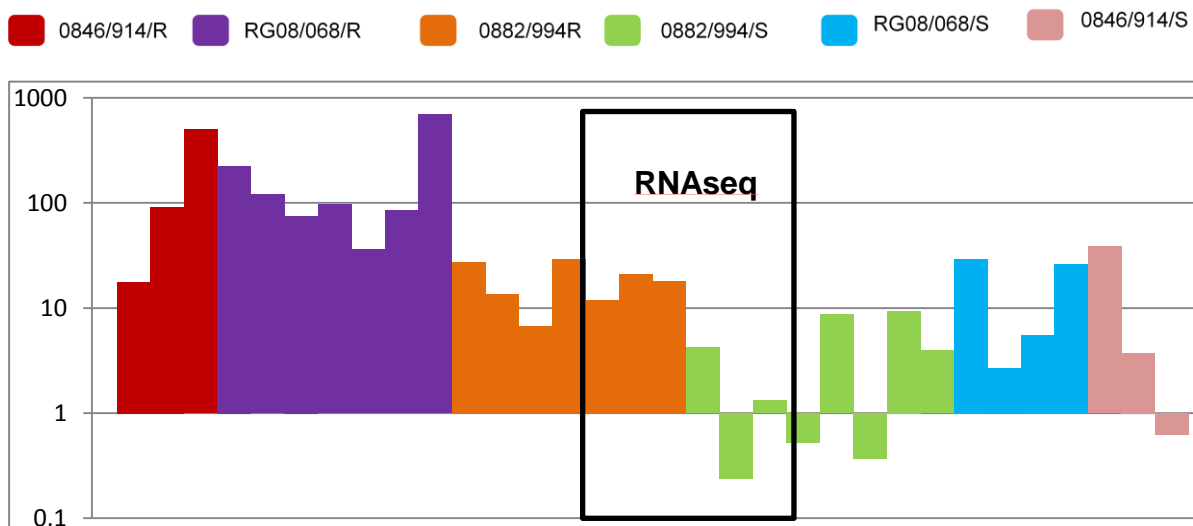


Figure 13 : Niveaux d'expression relatifs de RG GSTA chez les plantes résistantes et sensibles avant traitement par rapport au mélange Sensibles Avant Traitement.

Synthèse

- ✓ Surexpression globale confirmé chez les résistants par rapport aux sensibles.
- ✓ Au cours de cette analyse que sur l'ensemble des 32 gènes candidats étudiés, aucun n'a été surexprimé chez tous / certains R et chez aucun S. En revanche, plusieurs gènes candidats chez l'ivraie et chez le vulpin étaient surexprimés chez certains R, mais avec une surexpression au moins chez un individu sensible. C'est le cas par exemple VARC01, VERF02, RG18973, RG48902, RG32902. D'autres étaient surexprimés chez au moins un individu sensible avec une sous-expression chez les individus résistants.

2.3) Étude de l'expression des gènes candidats dans d'autres populations

• *Vulpin*

Pour élargir notre étude, nous avons passé nos gènes candidats sur une autre F1, la CY101D, et sur d'autres individus de la Cy46H. Le VABC01 est sous exprimé chez les sensibles mais aussi chez les résistants, ce qui n'est pas comparable aux résultats obtenus avec la population CY46H Cf. Figures 4, 5). Le simple élargissement à d'autres individus de la F1 CY46H (Avant traitement) nous porte à croire que le VBD01 gène n'est pas surexprimé chez les résistants (Cf. Figure 6). En effet, il l'est chez 3 résistants (R2, R3 et R5) contre 2 sensibles (S4 et S7). Si l'on regarde la Cy101D, c'est le même résultat: 4 individus résistants surexpriment le gène, et 4 le sous-exprime. Il en va de même pour les sensibles. Aucune tendance générale ne semble donc se dessiner. Il en va de même pour la modalité 12 HAT (Cf. Figure 7).

La comparaison des niveaux d'expression du VOX01 chez les résistants et les sensibles des deux populations (CY46H et CY101D), montre que ce gène est surexprimé chez les résistants par rapport aux sensibles pour les deux modalités (AT, 12HAT) (Cf. Figures 8, 9). Si l'on regarde au cas par cas,

certaines sensibles surexpriment le gène au même niveau que les résistants, voire plus (S8 de la CY46H, Figures 9 et 10).

- **Ivraie**

L'expression de chacun des 18 gènes a été mesurée dans trois autres populations. La comparaison de l'expression le RG1618A par les individus des trois populations, autres que celle du RNAseq, montre une ressemblance d'expression chez les résistants et chez les sensibles (Cf. Figure 10). Chez la population 0846/914, deux résistants expriment pas mal le RGCYP92A, les sensibles aussi l'exprime mais à niveau faible comparativement aux individus résistants. Les niveaux d'expression sont relatifs à ceux des trois plantes sensibles non traitées (Cf. Figure 12). Le gène RGCYP92A présente des niveaux d'expression moyens dans les plantes résistantes dans la population RG08-068 4 des 5 plantes résistantes de cette population surexpriment le gène AT et 24HAT par rapport à 4 des 5 plantes sensibles. Ceci n'est pas observable dans les autres populations, où le gène est fortement exprimé chez des plantes sensibles 24HAT principalement. Le gène RGGSTA présente des niveaux d'expression moyens dans les plantes résistantes (0846 914) et (0882-994) à la fois significativement plus élevés que dans les plantes sensibles AT, et 2,3 à 3 fois plus élevés (non significatif) à 24HAT. Individuellement, les plantes résistantes ne surexpriment pas systématiquement le gène par rapport aux plantes sensibles. Les résultats d'analyse à la modalité 24 heures après traitement de ces deux gènes (RGGSTA et RGCY92A) seront présentés prochainement à l'oral.

Conclusion

D'après cette analyse, nous constatons que l'expression des ces gènes candidats chez le vulpin et l'ivraie est totalement dissociable de la sensibilité de la plante au traitement herbicide, des plantes sensibles comme résistantes exprimant ou surexprimant ou non ces gène et donc aucun gène candidat ne semble impliqué réellement dans la RNLC. Cette expression de résistance est loin d'être comparable entre des individus le la même F1, ou des populations de la même descendance. Pour résumer, que ce soit chez l'ivraie ou le vulpin, aucun gène candidat ne semble impliqué réellement dans la RNLC.

DISCUSSION

1. Validation des niveaux d'expression des gènes candidats mesurés par RNA-seq

- **VULPIN**

Les résultats précédemment obtenus par RNAseq, ont été confirmés par PCR quantitative. Pour les gènes étudiés lors de ce stage.

Pour le gène VERF02 par exemple, nous remarquons une surexpression significative pour les modalités (AT, 12HAT). Dans ce cas précis, les sensibles ne l'expriment quasiment pas.

Pour le VARC, le pic est atteint au même moment à 12HAT, donc la qPCR valide les données du RNA-seq. Chez le BD01, le niveau d'expression est important chez les résistants par rapport aux sensibles même avant traitement, cela est en accord avec les données de RNA-seq.

- **IVRAIE**

Nos résultats montrent une très bonne corrélation entre les profils d'expression qPCR et du RNAseq. Pour les gènes, RG1618A, RG22792, RG18973 et RG 48902 par exemple, les profils d'expression sont similaires à ceux du RNAseq et les niveaux d'expression observés par RNAseq sont validés, et nous pouvons utiliser la base de données comme souhaité.

Conclusion

Globalement, que ce soit chez le vulpin ou l'ivraie, nous avons pu valider par qPCR les données du séquençage par RNAseq. Les deux bases de données de RNAseq ont été construites avec des mélanges d'individus. La technique de qPCR fournit des mesures fiables de différences d'expression, du moment elle fournit une étude individu par individu. La deuxième partie de discussion aura donc comme objectif de confirmer une corrélation entre expression du gène candidat et résistance/sensibilité au traitement herbicide.

2. Variabilité de l'expression des gènes candidats chez l'ivraie et le vulpin

Malgré que les résultats de qPCR ont confirmé les données du RNAseq, chez les gènes candidats, on ne retrouve pas de corrélation entre niveau d'expression des gènes et résistance/sensibilité.

Une surexpression est exprimée par des plantes sensibles et résistantes, pour certains gènes candidats. La comparaison individu par individu, montre une forte variabilité dans le niveau d'expression. Les comparaisons entre populations donnent également le même résultat.

Donc globalement, une forte variabilité génétique dans l'expression de nombreux gènes allant d'une forte expression à pas du tout d'expression selon plantes est constatée. Une bonne partie des différences d'expression observée entre plantes sensibles et résistantes n'est dans RNAseq n'est pas liée à la résistance, mais à la variabilité génétique. Donc, le fait que l'on est ressorti certains gènes sur leur profil d'expression RNAseq est juste dû en gros au hasard de trouver ce gène exprimé dans les plantes résistantes et pas dans les plantes sensibles. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Duhoux et Délye (2013) où l'expression de cinq CYP variait d'une plante à l'autre, ou aucune surexpression n'était spécifique aux plantes résistantes. Il se peut que les gènes étudiés ici ne soient pas les vrais homologues des gènes d'intérêt, et que la RNLC réagisse sous l'ensemble de gènes présents dans les plantes résistantes.

Dans la littérature, jusqu'à aujourd'hui, deux types de gènes ont été identifiés pour leur rôle dans la RNLC : des GST, chez le vulpin, et des P450 chez l'ivraie.

Les GST impliquée dans le mécanisme de détoxification, le vulpin les surexprime dans les plantes résistantes par rapport aux plantes sensibles avant traitement de manière constitutive. Ceci a été

démontré pour un gène codant pour une protéine de la famille des GST chez le vulpin (Cummins *et al.* 1999, 2009).

Chez l'ivraie, le rôle des P450 dans la résistance a été montré, mais aucun gène n'a été identifié (Powles *et al.* 2010).

Le but de cette étude était de valider un profil d'expression comme présenté dans la figure en face (surexpression uniquement chez des résistants et jamais chez les sensibles).

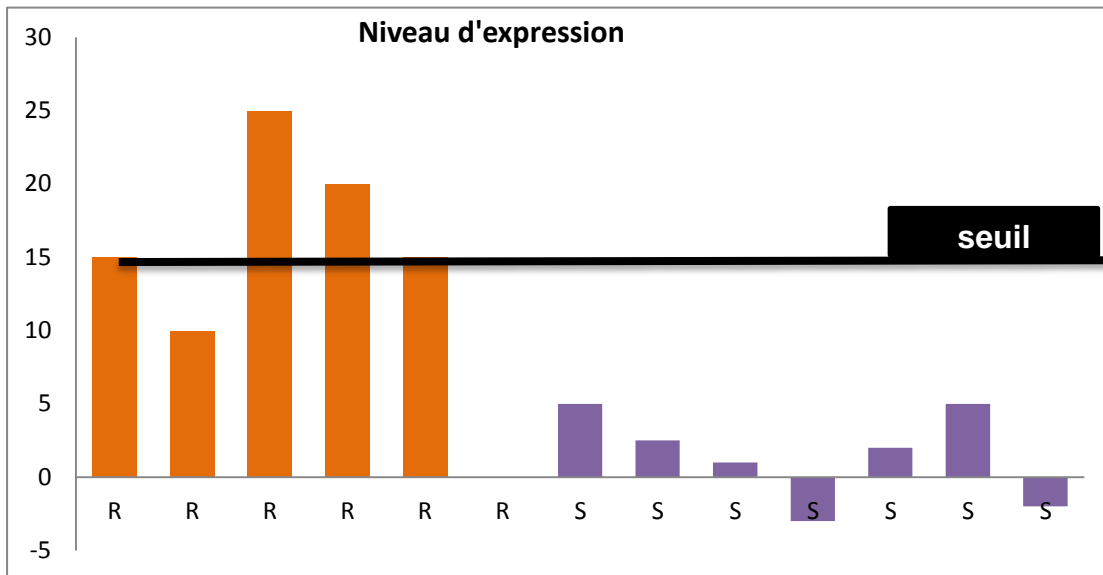


Figure 14: Profil d'expression de résistance souhaité.

En comparaison avec nos résultats, nous constatons qu'aucun de nos gènes candidats ne correspond au profil recherché. Plusieurs gènes peuvent être impliqués dans la résistance, il sera donc intéressant de tester d'autres gènes candidats, et se focaliser sur le niveau d'expression seuil de chacun d'eux, pour établir des liaisons, entre les mécanismes d'intervention de l'ensemble des ces gènes. Egalement, une possibilité de tester l'effet des différences d'expression, après combinaison des gènes candidats est envisageable.

Les difficultés de notre étude de type «gènes candidats» résultent probablement de plusieurs facteurs comme la faible différentiel d'expression, la présence de mutations et aussi le fait que les gènes candidats testés dans mon travail reste un petit échantillon parmi le nombre important sélectionné à la bases. Pour cela, tester des gènes candidats sur plusieurs échantillons composés de la population mère et des descendants de F1 et F2, sera donc intéressant tout en se focalisant sur des gènes candidats de fonction connue et d'être capable de lier ces fonctions entre différents gènes (liaison fonctionnelle entre les gènes candidats).

PERSPECTIVES

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 chez la plante existe. Nous avons pu nous rendre compte que la RNLC est un trait adaptatif difficile à étudier car elle est imprévisible et complexe.

Une fois des gènes identifiés, des outils basés sur la PCR (détection de mutations), la RT-PCR quantitative et d'immunologie (tests de type ELISA) ou toute autre technique pertinente en fonction de la nature des gènes ou des mutations identifiés comme étant en cause dans la RNLC pourront être mis en place.

Et si le génome du vulpin et l'ivraie sont séquencés, ce qui est probable, nous pourrions alors développer des puces à ADN. Cette technique, peu intéressante avec des puces créées pour le blé, pourrait devenir une voie à explorer. Elle permet en plus de quantifier l'expression des gènes. Nous pouvons donc imaginer la création de puces à ADN nous permettant de détecter rapidement la surexpression des gènes candidats chez les individus résistants par rapport aux individus sensibles. Ces puces seraient ensuite utilisées comme outils de détection des résistances dans une population adventice au champ, et donc comme un outil de diagnostic.

La forte expression de tels gènes peut aussi être due à une mutation dans la séquence du promoteur de ces gènes, ou à la présence d'un gène activateur de cette surexpression. Il serait donc intéressant de chercher la séquence entière du gène codant pour identifier son promoteur. Les outils de diagnostic seront basés sur des tests enzymologiques pour identification de métabolites d'herbicides avec une insertion de gène dans l'enzyme (expression hétérologue).

Pour conclure, il faut rappeler que 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 le plus longtemps possible l'efficacité des substances disponibles, notamment des inhibiteurs de 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 et des méthodologies permettant un diagnostic rapide et précoce de la résistance. Nous n'en sommes qu'aux prémices de la validation de la surexpression des gènes candidats gouvernant la RNLC et de nouvelles questions se posent au fur et à mesure des découvertes que nous faisons la concernant : combien de gènes sont impliqués, comment, lesquels, et comment sont-ils distribués géographiquement. Afin de préserver l'efficacité des herbicides qui restent indispensables pour le désherbage, il faut continuer à chercher les mécanismes génétiques impliqués dans la RNLC, et pour ainsi pouvoir l'endiguer à l'avenir.

Pour le chercheur dans le domaine de l'agroécologie, l'enjeu majeur est de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans les processus physiologiques afin de disposer à terme de nouveaux outils diagnostiques, et de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques.

L'un des objectifs importants reste d'identifier les gènes dont l'expression est dérégulée au cours d'une résistance et participer au développement des solutions. L'identification de ces gènes de

résistance et leur mécanisme va permettre de limiter les dégâts provoqués par les mauvaises herbes dans les champs. Ceci contribuera à l'optimisation de l'utilisation du nombre restreint de substances herbicides actuellement disponibles, une préservation de leur efficacité est un grand secours pour la recherche agronomique. Pour boucler la boucle, activités et recherches scientifiques menées sur les différents laboratoires et centres de recherche sur la résistance aux herbicides devraient permettre de réduire le taux de l'utilisation des herbicides dans les champs et restaurer un certain nombre de paysages agricoles dégradés. Cela contribuera à préserver la biodiversité exceptionnelle et aura une influence bénéfique sur les sols et les ressources en eau. En effet, la mise en place des transferts de gestion des ressources naturelles aux communautés locales permettra de promouvoir des pratiques agricoles durables, génératrices d'emplois et de meilleurs revenus, ce qui améliorera les conditions de vie de ces communautés. Cela contribuera en définitive à faire reculer l'agriculture intensive.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Baerson S. R, Rodriguez D. J., Biest A., Tran M, You J., Kreuger R. W., Dill G. M., Pratley J. E., and Gruys K. J. 2002. Investigating the mechanism of glyphosate resistance in rigid ryegrass (*Lolium rigidum*), *Weed Sci.* pp.721-730.
- Beckie H. J. and Tardiff J. 2012. Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Prote.* 35 : 15-28.
- Boulaine J. 1992. Histoire de l'Agronomie en France. Lavoisier. Paris.
- Brazier M., Cole D.J. and Edwards R., 2002. O-Glucosyltransferase activities toward phenolic natural products and xenobiotics in wheat and herbicide-resistant and herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Phytochemistry.* 59: 149-156.
- Busi R. and Powles S.B. 2009. Evolution of glyphosate resistance in a *Lolium rigidum* population by glyphosate selection at sublethal doses, *Heredity.* 103: 318–325.
- Bustin S.A. 2002. Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *J Mol Endocrinol.* 29:23-39.
- Coehelo S. 2009. European Pesticide Rules Promote Resistance, Researchers Warn. www.sciencemag.org.
- Cole D.J. 1994. Detoxification and activation of agrochemicals in plants. *Pest. Sci.* 42: 209-222.
- Cummins I. and Edwards R. 2004. Purification and cloning of an esterase from the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*), which bioactivates aryloxyphenoxypropionate herbicides. *Plant J.* 39 :894-904.
- Cummins I., Bryant D. N. and Edwards R. 2009. Safener responsiveness and multiple herbicide resistance in the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Plant Physiol.* 7: 807-820.
- Cummins I., Cole D. J., and Edwards R. 1999. A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *Plant J.* 18:285-292.
- Cummins I., Moss S.R., Cole J.D. and Edwards R. 1997. Glutathione transferases in herbicide resistant and herbicide-susceptible black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Pestic. Sci.* 51:244-250.
- Decoin M. 2008. Réglementation demain, ce qui se prépare en! France. *Phytoma*, pp. 21-25.
- Délye C. 2005. Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors: an update. *Weed Sci.* 53:728–746.
- Délye C. 2013. Unravelling the genetic bases of non-target-site-based resistance (NTSR) to herbicides: a major challenge for weed science in the forthcoming decade. *Pest Manag Sci.* 69: 176–187.
- Délye C. and Boucansaud K. 2008. A molecular assay for the proactive detection of target site based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in *Alopecurus myosuroides*. *Weed Res.* 48: 97-101

- Délye C. and Causse R. 2012. Résistance aux inhibiteurs de l'ALS: gare au dicots! Après le coquelicot et les matricaires, la stellaire fait de la résistance. *PHYTOMA* N°657: 40-42.
- Délye C., Boucansaud K., Pernin F. and Bertin G. 2011. Résistance du coquelicot aux inhibiteurs de l'ALS: La mise au point d'Outils de diagnostic rapide à permis de révéler la présence de cette résistance en France. *PHYTOMA-La défense des végétaux* N°645: 47-50.
- Délye C., Gardin J.A.C., Boucansaud K., Chauvel B. and Petit C. 2011. Non-target-site-based resistance should be at the centre of herbicide resistance research attention: black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) as an illustration. *Weed Res.* 51: 433-437.
- Délye C., Jasieniuk M. and Le Corre V. 2013. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. Non publié.
- Délye C., Matějček A. and Gasquez J. 2002. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). *Pest Manag. Sci.* 58: 474-478.
- Délye C., Matějček A. and Michel S. 2008. Cross-resistance patterns to ACCase-inhibiting herbicides conferred by mutant ACCase isoforms in *Alopecurus myosuroides* Huds. (blackgrass) re-examined at the recommended herbicide field rate. *Pest Manag. Sci.* 64: 1179-1186.
- Délye C., Menchari Y., Guillemin J.P., Matejcek A., Michel S., Camilleri C. and Chauvel B. 2007. Status of black grass (*Alopecurus myosuroides*) resistance to acetylcoenzyme A carboxylase inhibitors in France. *Weed Res.* 47: 95–105.
- Délye C., Zhang X.Q., Chalopin C., Michel S and Powles S.B. 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 Physiol.* 132: 1716–1723.
- Diatchenko L., Lau YF., Campbell AP., Chenchik A., Moqadam F and Huang B. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 6025-6030.
- Duhoux A. and Délye C. 2013. Reference Genes to Study Herbicide Stress Response in *Lolium sp.*: Up-Regulation of P450 Genes in Plants Resistant to Acetolactate-Synthase Inhibitors. *Plos. Biol.* 8: 1-12.
- Duke S.O. 2011. Glyphosate degradation in glyphosate-resistant and-susceptible crops and weeds. *J. Agric. Food Chem.* 59: 5835-5841.
- Foster D. K., Ward P. and Hewson R.T.1993. Selective grass weed control in wheat and barley based on the safener fenchlorazole-ethyl. In: Proceedings of the 1993 Brighton crop protection conference weeds. Brighton, UK. pp. 1267-1272.
- Gaines T. A., Wenli Zhang W., Wang D., Bukun B., Chisholm S., T, Shaner D. L., Nissen S. J., Patzoldt W. L., Tranel P. J., Culpepper A. S., Grey T. L., Webster T. M., Vencill W. K., Sammons R. D., Jiang J., Preston C., Leach J. L. and Westra P. 2011. Gene amplification confers glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri*. *J. Agric. Food Chem.* 59: 5886–5889.
- Gasquez J. 1996. Etat de la résistance aux herbicides chez les adventices. Seizième conférence du COLUMA. Journées internationales sur la lutte contre les mauvaises herbes, Reims, France. pp. 201-210.

- Gasquez J., Bay G. and Boucansaud K. 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. Disponible sur : <http://www.quae.com/fr/r1185-efficacite-et-selectivite-des-herbicides.html>
- Gressel J. 1990. Need herbicide resistance have evolved? Generalizations from around the world. Proceedings of the 9th Australian Weeds Conference, Adelaide, South Australia: 173-184.
- Heap I.M. 2013. International survey of herbicide resistant weeds. Disponible sur: www.weedscience.org.
- Letouzé A. and Gasquez J. 2001. Inheritance of fenoxaprop-P-ethyl resistance in a blackgrass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) population. Theor. Appl. Genet. 103: 288-296.
- Mamarot J. 2002. Mauvaises herbes des cultures. Ed. Acta. Paris. 540 p.
- Marshall R. and Moss S. 2004. Resistance to acetolactate inhibiting herbicides in UK black-grass (*Alopecurus myosuroides*) populations. Weed Sci. Soc. Am. Abstr. 44-15.
- Moss S.R., Perryman S.A.M. and Tatnell L.V. 2007. Managing herbicide-resistant blackgrass (*Alopecurus myosuroides*): theory and practice. Weed Technol. 21: 300–309.
- Nomisma. 2008. The role of plant production products: Executive Summary. European Agriculture oh the Future: 1-8.
- Oerke E.C. 2006. Crop losses to pests. J. Agric. Sci. 144: n°1. p.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. Doctorat en sciences de la vie à l'Université de Bourgogne. PP 210.
- Petit C., Bay G., Pernin F and Délye C. 2010. Prevalence of cross- or multiple resistances to the acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors fenoxaprop, clodinafop and pinoxaden in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) in France. Pest Manag. Sci. 66: 168-177.
- Petit C., Bay G., Pernin F. and Délye C. 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 Manag Sci, 66:168-177.
- Petit C., Pernin F., Heydel J.M. and Délye C. 2012. Validation of a set of reference genes to study response to herbicide stress in grasses. BMC. Res. Notes 5:18.
- Poitras E. and Houde H. 2002. La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev. Biol. Technology*. 2-11.
- Powles S.B. and Yu Q. 2010. Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Ann. Rev. Plant. Biol.* 61:317–347.
- Rüegg W.T., Quadranti M. and Zoschke A. 2007. Herbicide research and development: challenges and opportunities. *Weed Res.* 47: 271-275.

- Tranel P.J. and Wright T.R. 2002. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed. Sci.* 50: 700-712.
- Wilhelm B.T and Landry J.R. 2009. RNA-Seq quantitative measurement of expression through massively parallel RNA-sequencing. *Methods.* 48: 249–257.
- Yu H.H., Chen C.H., Shi L., Huang Y. and Lee T. 2009. Twin-spot MARCM to reveal the developmental origin and identity of neurons. *Nat. Neuro. Sci.* 12: 947-953.
- Yuan J.S., Tranel P.J. and Stewart C.N. 2007. Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trend. Plant. Sci.* 12: 6-13.

ABSTRACT

Non-target-site based resistance to herbicides (NTSR) is complex, widespread, unpredictable and can confer resistance to a range of herbicides with different modes of action. Thus, it is the major threat to grass weed chemical control. NTSR to ACCase and to ALS inhibitors is widespread in France, especially among Poaceae as black-grass (*Alopecurus myosuroides*) and ray-grass (*Lolium ssp*). Variation in the expression of numerous genes is at the basis of plant response to environmental stresses. NTSR is endowed by a subset of the genes involved in herbicide stress response. Therefore, differences in gene expression between resistant and sensitive plants can be at the root of NTSR and a transcriptomics-based approach is expected to identify NTSR candidate genes. Currently, quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-qPCR) is the most accurate tool to determine differences in gene expression. Using this method, candidate genes identified by RNA sequencing in blackgrass and ray-grass sprayed with ACCase and ALS inhibitors were analysed, respectively. Expression profiles observed after RNA-sequencing and differences of expression between resistant and sensitive plants were confirmed by RT-qPCR for all genes studied. We enlarged results to other plants and populations of blackgrass and ray-grass, and noticed that the differences of expression observed in plants used for RNA-sequencing were generally not observed anymore. We concluded that no clear cut exists between the resistance and the expression of one unique gene, and that NTSR should be explained by the over-expression of several genes simultaneously.

Key words: Non-target-site based resistance, herbicide, poaceae, RT-qPCR, gene