



DIY-LOL - Prototypage d'un outil de diagnostic moléculaire démocratisable pour une gestion durable des adventices

F Mohamadi, R Valade, L Bonin, M Fournier, F Moreau, P Ougen, J Cohan, Christophe Délye

► To cite this version:

F Mohamadi, R Valade, L Bonin, M Fournier, F Moreau, et al.. DIY-LOL - Prototypage d'un outil de diagnostic moléculaire démocratisable pour une gestion durable des adventices. *Innovations Agronomiques*, 2022, 85, pp.121-129. 10.17180/ciag-2022-vol85-art10 . hal-03647366

HAL Id: hal-03647366

<https://hal.inrae.fr/hal-03647366>

Submitted on 17 Jun 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

DIY-LOL - Prototypage d'un outil de diagnostic moléculaire démocratisable pour une gestion durable des adventices

Mohamadi F.¹, Valade R.¹, Bonin L.², Fournier M.⁴, Moreau F.⁵, Ougen P.⁶, Cohan J.³, Délye C.⁷

¹ Arvalis Institut du Végétal, F-91720 Boigneville

² Arvalis Institut du Végétal, F-69330 Pusignan

³ Arvalis Institut du Végétal, F-44370 La Jaillière

⁴ La Paillasse, F-75002 Paris

⁵ ADNid, F-34980 Montferrier-sur-Lez

⁶ SupBiotech, F-94800 Villejuif

⁷ INRAE, UMR1347 Agroécologie, F-21065 Dijon

Correspondance : f.mohamadi@arvalis.fr

Résumé

La gestion des adventices est aujourd'hui devenue la difficulté majeure de nombreux systèmes de grande culture, en particulier à cause de l'extension de populations d'adventices résistantes aux herbicides. Les changements radicaux de système de culture nécessaires pour sortir de ces impasses sont difficiles à impulser. Le parti pris de ce projet est que des outils de diagnostic personnalisés contribueraient aux changements. Nous prenons l'exemple de la résistance des ivraies aux sulfonylurées pour mettre en place une démarche d'innovation ouverte visant à développer les outils et créer une communauté de diagnostic la plus vaste possible. Le projet DIY-LOL, « Diagnostic-It-Yourself-LOLium », constitue la première étape de cette ambition. Il propose de mobiliser une approche de « Do-It-Yourself-Biology » pour réaliser et valider un prototype d'outil de diagnostic utilisable au champ par des agriculteurs ou techniciens du développement. Le projet permettra également d'avancer dans la mise au point de protocoles de diagnostic en laboratoire et créera une dynamique originale de collaboration entre monde agricole et communauté « DIY ».

Mots-clés : Do-It-Yourself, diagnostic moléculaire, ivraie, résistance herbicides, ALS

Abstract : Diagnostic-It-Yourself-LOLium (DIY-LOL) : prototyping of a democratizable molecular diagnostic tool for sustainable weed management

Weed management has become a major challenge in many field cropping systems today, particularly with the spread of herbicide resistant weed populations. The radical changes in the cropping system necessary to break these dead ends are difficult to bring about. The aim of this project is that personalized diagnostic tools would contribute to the changes. We take the example of the resistance of weeds to sulfonyleureas to set up an open innovation process aimed at developing tools and creating the largest possible diagnostic community. The DIY-LOL project, « Diagnostic-It-Yourself-LOLium », is the first step in this ambition. It proposes to mobilize a "Do-It-Yourself-Biology" approach to produce and validate a prototype diagnostic tool that can be used in the field by farmers or development technicians. The project will also make it possible to advance in the development of laboratory diagnostic protocols and will create an original dynamic of collaboration between the agricultural world and the "DIY" community.

Keywords: Do-It-Yourself, molecular diagnosis, ryegrass, ALS, herbicide resistance

Introduction

La présence d'adventices dans les cultures, induit des pertes de rendement qui peuvent être très importantes et *in fine* préjudiciables pour la production alimentaire. Dans la plupart des cultures, les adventices induisent le plus grand risque de perte parmi les organismes nuisibles et elles seraient responsables de 7% de pertes de rendement dans le blé, au niveau mondial. L'utilisation généralisée du désherbage chimique est largement remise en cause depuis plusieurs années. La réduction de leur usage est nécessaire à la réussite du Plan Ecophyto, ceux-ci représentant entre le tiers et la moitié de l'Indicateur de Fréquence de Traitement (IFT) en culture de blé.

Parallèlement, la réglementation en vigueur au regard des critères toxicologiques et écotoxicologiques est devenue plus stricte, de nombreuses substances herbicides ont notamment été retirées du marché en France et en Europe. En conséquence, la gamme des substances herbicides disponibles a globalement diminué depuis les années. La diminution des solutions disponibles, couplée à une utilisation répétée des mêmes substances, a conduit à la sélection de populations d'adventices résistantes aux herbicides. Parmi ces herbicides, les inhibiteurs de l'acétolactate synthase (ALS), essentiellement utilisés sur céréales, sont les plus concernés par les problèmes de résistance. La présence de populations résistantes dans une parcelle est généralement corrélée à une perte d'efficacité visible des traitements herbicides, induisant souvent à court terme un recours à des désherbages chimiques de rattrapage, mettant ainsi en péril la trajectoire de réduction des usages visée par le Plan Ecophyto. Des changements des pratiques sont donc à impulser rapidement avant que les populations d'adventices dans les parcelles ne deviennent pléthoriques et problématiques. Un outil personnalisé de diagnostic des résistances au champ contribuerait à impulser le changement des pratiques.

L'objectif du projet est de mettre à disposition les moyens de diagnostic moléculaire pour une gestion améliorée de la santé des cultures. Il intègre des approches connaissant un fort développement dans le domaine de la santé humaine, qui voit l'émergence d'outils de diagnostic *in situ*, conçus de manière ouverte dans des approches « Do It Yourself » (DIY), aussi appelées « biologie de garage » (Biohacking). Ce projet prend le parti de réaliser une démarche de prototypage d'un diagnostic moléculaire à bas coût, pouvant être mis en œuvre dans le contexte agricole, en choisissant comme cas d'étude un enjeu agricole majeur en grandes cultures : la gestion des adventices résistantes aux traitements herbicides. En prenant le cas précis l'ivraie (genre *Lolium*) résistante aux sulfonilurées, inhibiteurs de l'acétolactate synthase (ALS), notre projet aura pour objectif de :

- Prototyper et valider sur la Digiferm de Boigneville un outil de diagnostic moléculaire pouvant être construit et mis en œuvre de manière autonome par des techniciens agricoles et agriculteurs
- Créer une dynamique de partage des problématiques agricoles entre le monde du Biohacking et le monde agricole, en s'appuyant sur les initiatives en place en Région Ile de France, en particulier La Paillasse et la Digiferm de Boigneville
- Valider les protocoles existants de diagnostic de la résistance (liée à la cible) de l'ivraie aux inhibiteurs de l'ALS au système prototype mis en place
- Améliorer et valider des protocoles de laboratoire pouvant apporter une plus-value par rapport aux protocoles existants (résistance non liée à la cible, Next Generation Sequencing, NGS).

Le projet repose sur un partenariat entre Arvalis institut du végétal, l'Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et l'environnement (INRAE), La Paillasse, ADNid-Qualtech et SupBiotech.

1. Prototypage d'un système de diagnostic moléculaire applicable au champ

Le gène de l'Acétoacétate synthase (ALS) est sujet à des mutations chez l'ivraie et chez de nombreuses adventices, qui peuvent conduire à des résistances à certaines familles d'inhibiteurs. Des techniques de diagnostic moléculaire décrites dans la littérature sont disponibles mais restent adaptées pour des

analyses en laboratoire. Le développement d'un outil pour faire des analyses de diagnostic moléculaire direct au champ sur des adventices permettrait d'identifier rapidement la présence de résistance liée à la cible ALS.

1.1 Technique de diagnostic moléculaire rapide des mutations à l'ALS chez l'ivraie

Des analyses de génotypage par séquençage ont été menées sur des échantillons d'ivraie prélevés sur des parcelles agricoles dont la résistance aux traitements herbicide a été suspectée. Les mutations observées sur près de 500 échantillons génotypés par séquençage et pouvant conduire à de la résistance, concernées les codons en position 197 qui code pour une proline (P197) et en position 574 qui code pour un tryptophane (W574) du gène ALS, dont 90% sont relatives au premier (données Arvalis, non publiées). D'autres mutations ont été observées sur d'autres codons du gène ALS mais n'aboutissent pas à une modification de la protéine finale (mutation silencieuse). Le développement de la technique de diagnostic moléculaire concernera donc les deux codons P197 et W574 sujets à des mutations pouvant conduire à des résistances aux traitements herbicides.

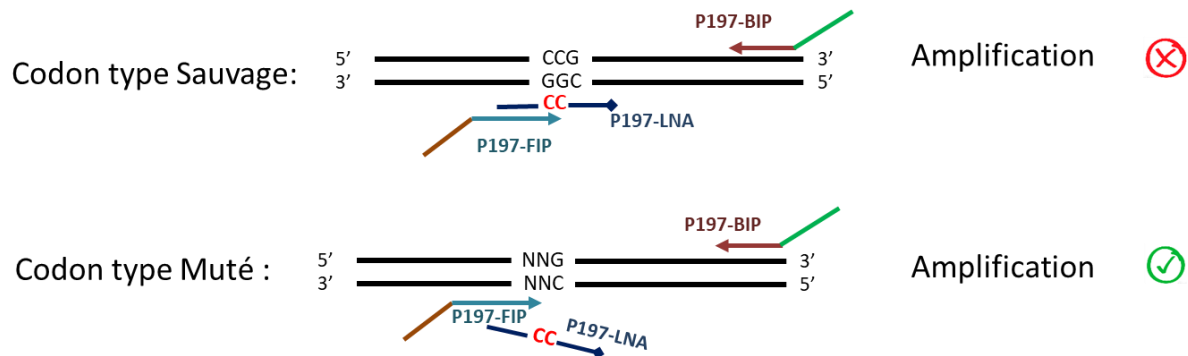
1.1.1 Matériel végétal utilisé

Les analyses de génotypage par séquençage ont permis de choisir 7 échantillons d'ivraie possédant des mutations sur le codon en position 197 (P197) ou 574 (W574) de l'ALS. Ces échantillons ont servi pour les différentes étapes de développement d'une technique de diagnostic moléculaire.

Les feuilles de chaque échantillon ont été broyées avec un broyeur à bille MM400. 50mg du broyat ont été utilisés pour l'extraction des ADN à partir du kit commercial NucleoSpin 96 Plant II (Macherey-Nagel). La quantité et la qualité des ADN ont été vérifiées au spectrophotomètre NanoDropOne, puis les solutions ont été diluées à environ 5ng/μl pour constituer les solutions de travail.

1.1.2 Techniques d'amplification PCR

Afin de vérifier la présence effective de mutations au codon P197 et W574, les échantillons tests ont été génotypés en utilisant la technique dCAPS (Derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequences) (Délye *et al.*, 2008 ; 2009), les résultats servant de comparatifs. Pour amplifier spécifiquement et rapidement par PCR les deux codons P197 et W574 de l'ALS, la technique LAMP a été choisie avec des amorces allèles spécifiques (AS-LAMP), déjà décrite dans certain cas d'étude pour détecter du polymorphisme à un nucléotide (Zang *et al.*, 2015 ; Athanase *et al.*, 2012). Cette technique d'AS-LAMP sera associée à des amorces bloqueurs LNA (Locked Nucleic Acid) pour amplifier spécifiquement les mutants et bloquer les sauvages (Itonaga *et al.*, 2016). Les acides nucléiques bloqués, ou LNA, sont structurellement comparables aux acides nucléiques naturels à la différence qu'un pont méthylène supplémentaire a été ajouté sur le ribose, reliant l'oxygène 2' et le carbone 4' (Paterson *et al.*, 2000). L'ajout d'une base modifiée LNA, augmente d'un côté l'affinité de l'amorce à se fixer sur le fragment de l'ADN cible et de l'autre côté, une grande sensibilité à l'hybridation de l'amorce (Vester et Wengel, 2004). En effet toute modification de l'ADN cible où l'amorce doit se fixer va empêcher l'hybridation de celle-ci et donc empêcher la réaction de PCR. La capacité des amorces à se fixer à l'ADN avec des bases modifiées LNA a été exploitée, tout en modifiant l'extrémité 3' pour que l'amorce devient bloqueur de la PCR (Figure 1). En absence de modification de la cible, l'amorce LNA bloqueur aura une plus grande affinité à s'hybrider empêchant ainsi les amorces PCR de se fixer à leur tour. Alors qu'en présence de modification du cible, l'amorce LNA bloqueur va perdre son affinité à s'hybrider et laisser ainsi les amorces PCR se fixer pour initier la réaction d'amplification PCR.



Figures 1 : Schéma explicatif de l'utilisation de bloqueur LNA en PCR pour le codon P197 chez l'ivraie

Les amorces LAMP ont été définies en utilisant le logiciel PrimerExplorer et les amorces LNA-bloqueur en utilisant Primer3. Ces dernières ont été synthétisées par la société TIP Mol Biol en modifiant l'extrémité 3' de l'amorce pour qu'elle soit bloquante pour la PCR.

Dans un premier temps, les amplifications PCR se font en conditions de laboratoire en utilisant le kit PCR HotStarTaq de chez Qiagen dans un volume réactionnel de 20µL en respectant les proportions (Tableau 1). Seules les amorces FIP et BIP nécessaires pour l'amplification PCR AS-LAMP ont été utilisées pour optimiser la PCR en présence de bloqueur LNA. Les produits d'amplification PCR ont été révélés sous lampe UV après électrophorèse d'agarose (2.5%) et coloration au BET.

Tableau 1 : Mélange réactionnel pour la PCR LNA-bloqueur pour le codon P197

	Ci	Quantité	1 volume (µl)
Tampon	10	1 x	2
MgCl	25	0.625 mM	0.5
dNTP 10mM	10	0.2 mM	0.4
P197-FIP	10	0.1µM	0.2
P197-BIP	10	0.15 µM	0.3
P197-LNA	10	1.5 µM	3
Taq HotStar (5U/µl)	5	0.025 U	0.1
Eau		qsp 20µl	9.5
ADN 5ng/µl		20ng	4
Total			20

1.1.3 Résultats et discussion

Le génotype aux codons P197 et W574 du gène ALS de chaque échantillon a été vérifié à l'aide de la technique dCAPS. Cette analyse avait pour but de contrôler systématiquement la présence ou non de mutation sur les échantillons choisis pour les analyses. Les résultats obtenus pour les 7 échantillons test (Tableau 2) sont en accord avec les résultats qui étaient obtenus lors du génotypage par séquençage. Aucun échantillon ne présente à la fois une mutation sur les deux codons P197 et W574. Ce résultat a été observé aussi sur près de 500 échantillons d'ivraie analysés précédemment par séquençage du gène ALS. Chaque codon peut donc être travaillé indépendamment pour le développement d'une méthode de diagnostic moléculaire.

Tableau 2 : Résultats de génotypage par séquençage et dCAPS aux codons P197 et W574 pour les 7 échantillons test.

Sample	Codon 197			Codon W574		
	Codon	Digestion <i>Apal</i>	Expertise	Codon	Digestion <i>BstXI</i>	Expertise
SER26	GCG	O	M	TGG	X	S
MER6	ND	X	S	TTG	O	M
MER10	CCG	X	S	TKG	XO	Het
SER16	YCG	XO	Het	TGG	X	S
SER44	YCG	XO	Het	TGG	X	S
MER12	CCG	X	S	TKG	O	M
MER15	CCG	X	S	TTG	O	M
X : coupure enzymatique, O : pas de coupure enzymatique, S : sauvage, M: mutant, Het : hétérozygote						

Pour le développement technique PCR-LNA, nous nous sommes donc focalisés surtout sur le codon P197 qui est majoritairement touché par des mutations. En variant les concentrations des amorces PCR et du bloqueur LNA nous avons pu trouver des conditions optimales d'amplifications où les échantillons identifiés comme « sauvage » ont été bloqués lors de la PCR comme attendu en Figure 1.

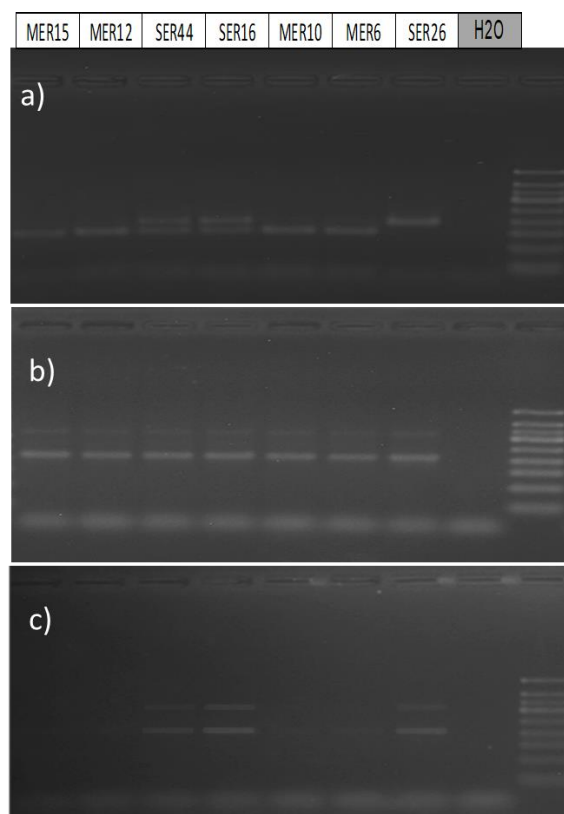


Figure 2 : Résultats PCR pour les 7 échantillons test pour le codon P197. (a) Génotypage par technique dCAPS donnant les résultats du Tableau 2. (b) PCR avec les amorces P197-FIP/BIP sans le bloqueur LNA P197-LNA. (c) PCR avec le bloqueur P197-LNA.

Les échantillons MER15, MER12, MER10 et MER6 ont été génotypés « sauvage » pour le codon P197 par la technique dCAPS (Figure 2a), ils ne donnent pas d'amplification en présence du bloqueur LNA (Figure 2c). Au contraire, en absence du bloqueur LNA, des amplifications de ces derniers sont observées

(Figure 2b). Les échantillons SER44 et SER16, génotypés hétérozygotes avec la technique dCAPS, montrent le même profil que le mutant homozygote SER26 en PCR-LNA bloqueur. Ce résultat était plutôt attendu puisque la bande « sauvage » a probablement été bloquée alors que la bande « mutée » a quant à elle été amplifiée.

Ces résultats montrent donc qu'il est possible de réaliser une amplification PCR spécifique pour discriminer les échantillons ayant ou pas des mutations sur le codon P197 de l'ALS chez l'ivraie. L'utilisation d'amorces LNA-bloqueur permet d'augmenter la spécificité et l'hybridation de celles-ci sur le codon cible lors de l'amplification PCR. La présence de mutation sur une des 3 bases du codon fait perdre à l'amorce bloqueur LNA sa spécificité à s'hybrider, permettant ainsi l'amplification PCR par les amorces FIP et BIP. La modification d'une base nucléonique par une base LNA fait augmenter la température d'hybridation de l'amorce par rapport à une amorce normale de PCR. De ce fait, pour que l'amorce LNA bloque spécifiquement les échantillons « sauvage » au codon P197, température d'hybridation (T_m) de 70°C a dû être utilisée. Cette température très élevée explique la perte de spécificité des amorces FIP et BIP se traduisant par l'apparition d'une bande supérieure parasite. Toutefois cette bande parasite n'est pas observée chez les échantillons sauvages bloqués. Par ailleurs la température de 70°C est proche de la température optimale de la Taq Polymérase, ce qui peut donner la possibilité de tester la technique en PCR isothermale type LAMP par la suite pour une application hors laboratoire.

La technique PCR-LNA bloqueur a l'avantage d'être rapide puisque l'analyse, composée d'une amplification PCR et d'une électrophorèse, dure moins de 24 heures. Toutefois comme pour tous les tests de type absence/présence de signal, il existe un risque d'erreur de faux négatifs qui peut être dû à un biais technique.

Dans cette étude, une technique PCR a pu être développée pour détecter la présence de mutation sur le codon P197 de l'ALS en utilisant des amorces bloquées LNA. La même technique a été tentée sur le codon W574 mais reste à optimiser.

2. Amélioration des techniques de diagnostic moléculaire des résistances chez l'ivraie

2.1 Mise au point de techniques de diagnostic moléculaire de résistance non liée à la cible (RNLC)

Les objectifs de cette sous-action étaient de creuser deux pistes pouvant permettre de diagnostiquer la résistance non liée à la cible (RNLC) aux inhibiteurs de l'ALS : (i) la quantification d'expression ou (ii) la détermination du nombre de copies de gènes-marqueurs de RNLC identifiés au cours d'un travail de thèse précédent.

2.1.1 Matériels et méthodes

Deux analyses ont été menées en parallèle pour essayer d'identifier des marqueurs de la résistance non liée à la cible chez l'ivraie :

- Mesurer par RT-qPCR sur ARNm l'expression de gènes-marqueurs,
- Mesurer par qPCR sur ADN génomique le nombre de copies de gènes-marqueurs de la résistance non liée à la cible (RNLC) dans un grand nombre de plantes d'ivraie de phénotype préalablement caractérisé résistant ou sensible.

Les expérimentations ont été réalisées sur des plantes représentant la diversité géographique de l'ivraie en France. L'expression de 19 gènes-marqueurs de la RNLC identifiés dans des travaux précédents a été mesurée sur des populations d'ivraie géographiquement réparties sur toute la France. Les données d'expression ont ensuite été utilisées pour tenter de prédire le phénotype individuel de chaque plante par une approche de LDA (Linear Discriminant Analysis).

2.1.2 Résultats et discussion

Les données d'expression de 7 des 19 marqueurs permettaient de prédire le phénotype d'une plante avec une exactitude de 77,5%. Une analyse plus poussée, effectuée sur 400 plantes de phénotype non caractérisé mais provenant de 20 nouvelles populations où les fréquences de plantes mutantes ont été déterminées préalablement par des tests biologiques a permis de montrer que les fréquences de plantes résistantes prédites à partir des données d'expression de 5 des 19 marqueurs étaient très fortement corrélées aux fréquences observées ($R > 0,89$).

Ces résultats montrent donc la possibilité de prédire le phénotype d'une plante (résistant ou sensible) à partir des données d'expression de 7 gènes-marqueurs de RNLC. La fréquence de plantes résistantes dans une population peut également être prédite à partir des données d'expression de 5 gènes-marqueurs de RNLC.

Toutefois, la prédiction de la RNLC n'est pas fiable à 100%, probablement que les gènes-marqueurs connus ne représentent pas toutes les voies existantes de la RNLC. En effet, la résistance non liée à la cible peut être la conséquence de l'altération d'un ou plusieurs processus physiologiques, y compris l'absorption, la translocation, la séquestration et le métabolisme de l'agent actif de l'herbicide (Jugulam *et al.*, 2019). Ainsi plusieurs gènes impliqués dans ces différentes phases physiologiques peuvent être mobilisés par la plante pour contourner l'action de l'herbicide. La fiabilité de diagnostic de la résistance non liée à la cible pourrait s'améliorer en identifiant d'autres gènes-marqueurs impliqués.

Par ailleurs, la mesure de l'expression de gènes, implique de travailler sur de l'ARNm (messager) non dégradé. Cette contrainte est incompatible avec l'analyse d'échantillons sur le terrain. En effet, les quantités et la qualité de l'ARN sont extrêmement dépendantes de la façon dont les plantes sont collectées, et les analyses sont longues, lourdes et chères. Cette méthode n'est donc pas exploitable pour diagnostiquer la résistance non liée à la cible en conditions au champ.

L'analyse de variation de nombre de copies (CNV) des 19 gènes-marqueurs de RNLC a été déterminée par qPCR sur de l'ADN génomique de 68 des 299 plantes déjà utilisées pour la mesure d'expression génique. Une corrélation significative a pu être établie entre le nombre de copies et le niveau d'expression d'un gène-marqueur pour 4 des 19 gènes testés. Ce travail doit être poursuivi pour analyser l'ensemble des 19 gènes.

2.2 Mise au point de techniques de suivi des mutations des gènes cibles par NGS

Les objectifs attachés à cette sous action étaient (i) de mettre au point des protocoles de séquençage optimisés pour les gènes ALS et Acétyl-CoA carboxylase (ACCCase) par les techniques de séquençage dites de nouvelle génération (NGS), (ii) de tester les limites de détection des mutations aux deux gènes cibles à partir de pools d'ADN d'individus mutés et sauvages et ainsi pouvoir quantifier la fréquence des plantes résistantes (mutées) et sensibles (sauvages) dans une population d'ivraie à partir de mélange de fragments de feuilles.

2.2.1 Méthode de travail

Les travaux ont été menés sur 96 populations d'ivraie issus de parcelles où une résistance aux herbicides est suspectée. Des extractions d'ADN ont été réalisées par pool de plantes, un pool est constitué de 50 plantes d'une population. Elles sont suivies d'une amplification PCR des fragments de deux gènes-cibles l'ALS et l'ACCCase portant tous les codons connus pour avoir un rôle dans la résistance liée à la cible (RLC). Les amplicons ont été par la suite « taggés », un tag représentant une population, puis un run de séquençage à très haut débit sur les 96 populations a été réalisé. Et enfin une analyse bio-informatique a été faite des « reads » de séquences.

En parallèle des travaux ont été conduits pour développer la technique de suivi des mutations au gène ALS par séquençage NGS, basés sur les connaissances acquis dans les différents travaux menés sur le gène ALS en amont de ce projet, notamment sur les codons en position P197 et W574. Ces travaux ont consisté (i) à optimiser des protocoles d'extraction d'ADN de qualité suffisante pour des analyses NGS ; (ii) à optimiser les conditions PCR pour la production des amplicons aux deux codons cibles ; (iii) à développer une méthode d'analyse bio-informatique des données de séquençage permettant d'identifier et quantifier la présence de mutation des codons ciblés du gène ALS chez l'ivraie.

Pour le développement de la méthode, 40 plantes issues de populations d'ivraie, et dont une analyse de génotypage par technique dCAPS a révélé la présence ou non de mutation du gène ALS, ont été utilisées. Une extraction ADN a été réalisée à partir de feuilles broyées de ces échantillons en testant deux types de protocole : un kit commercial (Wizard) et un protocole maison à base de SDS (sodium dodecyl sulfate) pour évaluer le meilleur protocole adapté pour l'obtention d'ADN de qualité à haut poids moléculaire pour les analyses NGS.

Plusieurs couples d'amorces pour amplifier les codons P197, W574 et l'ensemble du gène, ont été testés pour produire les amplicons. Ceci a nécessité plusieurs étapes d'optimisation des conditions PCR pour obtenir les amplicons aux tailles attendues correspondant aux fragments ciblés. Les produits d'amplification PCR ont été ensuite purifiés avec des billes AMPure permettant de supprimer les amorces non incorporées et les fragments d'ADN trop courts. Les échantillons sont ensuite indexés, par ajout d'index couplés aux amorces de séquençage, et une seconde PCR est réalisée pour la production de bibliothèques d'amplicons. Celles-ci sont ensuite quantifiées pour estimer les concentrations des amplicons indexés.

Le séquençage a été effectué en Paired end sur un séquenceur Illumina de type MiSeq avec le kit reagent V2 (2 x 250pb) pouvant produire des séquences de 250 à 500 bases de longueur. Après contrôle de la qualité, les séquences ont été analysées en utilisant deux approches bio-informatiques. La première approche consiste à faire un alignement sur une séquence de référence du gène ALS (AF310684.2, EF411171.1) et la seconde approche consiste à utiliser les amorces de PCR comme régions de référence. Deux pipelines bio-informatiques ont ainsi été testés pour l'alignement des séquences.

2.2.2 Résultats et discussion

La technique de suivi des mutations au gène ALS par séquençage n'a pas donné les résultats attendus. Toutefois, des amplicons aux deux codons P197 et W574 peuvent être produits par la technologie NGS utilisée dans cette étude. Malgré les différentes approches testées, la méthode par alignement à une séquence de référence et la méthode par détection d'amorces n'ont pas permis d'obtenir de résultats concluants. Continuer d'approfondir les données de séquences et leur analyse en changeant d'approche à fin d'obtenir des meilleurs résultats est donc nécessaire.

Pour ce qui est du développement de méthodes de séquençage des gènes ALS et ACCase, un test de diagnostic a été mis au point et validé, permettant l'analyse simultanée d'une centaine de populations d'ivraie en mélange (50 plantes par population) avec un seuil de détection d'une mutation d'environ 1%, soit une plante hétérozygote mutante parmi 50.

Les deux approches pour séquencer et suivre les mutations pouvant toucher les gènes ALS et ACCase chez l'ivraie ont toutefois permis de développer les conditions d'amplification PCR qui ont donné 2 amplicons sur l'ACCase et 3 amplicons sur l'ALS portant un total de 15 codons en cause dans la résistance aux herbicides ciblant ces deux gènes. L'analyse sur des échantillons d'ivraie prélevés sur l'ensemble du territoire a ainsi permis d'obtenir une cartographie de la fréquence des mutations détectées en France qui pourrait permettre de mettre en place des plans de sensibilisation pour éviter le développement des résistances. Et enfin un pipeline bio-informatique a été développé dans le cadre de cette étude et est à disposition pour l'analyse des données de séquences sur les gènes ALS et ACCase chez l'ivraie.

Conclusion

Le projet DIY-LOL a permis de développer plusieurs approches de laboratoire permettant de suivre les mutations aux gènes ALS et ACCase à l'origine des résistantes aux herbicides ciblant ces deux gènes. Il a permis également à travailler sur la compréhension des mécanismes à l'origine de la résistance non liée à la cible en suivant l'expression génique et le nombre de copie de certains gènes corrélés à cette résistance. Alors que le projet avait comme ambition de développer des techniques de diagnostic rapide et accessible pour des utilisations en conditions au champ, les techniques développées dans ce projet restent encore applicables en laboratoire. Toutefois, elles ouvrent des pistes vers le développement de techniques de diagnostic moléculaires en condition agricole. Les analyses de séquençage ont permis d'identifier les différents codons de l'ALS et ACCase sujets à des mutations fréquentes observées et qui peuvent conduire à la résistance aux inhibiteurs. Et plusieurs gènes marqueurs de la résistance non liée à la cible ont été mis en évidence permettant d'expliquer en partie celle-ci.

Le développement de la méthode PCR en utilisation des amorces LNA-bloqueur, encore jamais faite chez les plantes adventices est une méthode alternative pour réaliser des tests de diagnostic moléculaire rapide pour la résistance aux inhibiteurs de l'ALS. Des perspectives d'amélioration de la méthode pourraient aboutir au développement d'une méthode PCR applicable directement au champ, telle que la PCR isothermale Allèle spécifique LAMP-LNA (AS-LAMP-LNA).

Références bibliographiques

- Athanase B., Kyioshi O., Wamdaogo M G., Hiroka A., Hironori B., Shinya F., N'Fale S., Hirotaka K., 2012. Development of an allele-specific, loop-mediated, isothermal amplification method (AS-LAMP) to detect the L1014F kdr-w mutation in *Anopheles gambiae* s. l. *Malaria Journal* 11: 227
- 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, 97–101
- Délye C., Boucansaud K., Pernin F., Le Corre V., 2009. Variation in the gene encoding acetolactate-synthase in *Lolium* species and proactive detection of mutant, herbicide-resistant alleles. *Weed Research* 49, 326–336
- Itonaga M, Matsuzaki I, Warigaya K, Tamura T, Shimizu Y, Fujimoto M, *et al.*, 2016. Novel Methodology for Rapid Detection of KRAS Mutation Using PNA-LNA Mediated Loop-Mediated Isothermal Amplification. *PLoS ONE* 11(3): e0151654
- Jugulam M., Shyam C., 2019. Non-Target-Site Resistance to Herbicides: Recent Developments. *Plants (Basel)*; 8 : 417
- Peterson M, Nielsen C.B., Nielsen K.E., Jensen G.A., Bondensgaard K., Singh S.K., Rajwanshi V.K., Koshkin A.A., Dahl B.M., Wengel J., Jacobsen J.P., 2000. The conformations of locked nucleic acids (LNA) *J. Mol. Recognit.*, 13: 44-53
- Vester B., Wengel J., 2004. LNA (Locked Nucleic Acid): High-Affinity Targeting of Complementary RNA and DNA. *the American Chemical Society*. Vol. 43, No. 42
- Zhang C., Zhu J., Yang J., Wan Y., Ma T., Cui Y., 2015. Determination of ABO blood group genotypes using the real-time loop-mediated isothermal amplification method. *Molecular Medicine Reports* 12 : 5963-5966

Cet article est publié sous la licence Creative Commons (CC BY-NC-ND 3.0)



<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>

Pour la citation et la reproduction de cet article, mentionner obligatoirement le titre de l'article, le nom de tous les auteurs, la mention de sa publication dans la revue « Innovations Agronomiques », la date de sa publication, et son URL)