



HAL
open science

Évolution de la résistance aux herbicides chez l'Ambroisie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia*): recherche des déterminismes génétiques et application au diagnostic moléculaire.

Ingvild Loubet

► **To cite this version:**

Ingvild Loubet. Évolution de la résistance aux herbicides chez l'Ambroisie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia*): recherche des déterminismes génétiques et application au diagnostic moléculaire.. Autre. Université Bourgogne Franche-Comté, 2022. Français. NNT: 2022UBFCK029 . tel-04086730

HAL Id: tel-04086730

<https://theses.hal.science/tel-04086730v1>

Submitted on 2 May 2023

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.

UBFC

UNIVERSITÉ
BOURGOGNE FRANCHE-COMTÉ



INRAE

THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE

PREPAREE A Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'alimentation et
l'environnement (INRAE) – UMR1347 Agroécologie

Ecole doctorale n°554

Environnement-Santé

Doctorat de Sciences agronomiques

Par

Mlle Loubet Ingvild

Évolution de la résistance aux herbicides chez l'Ambrosie à feuilles d'armoise (*Ambrosia
artemisiifolia* L.) : recherche des déterminismes génétiques et application au diagnostic
moléculaire

Thèse présentée et soutenue à Dijon, le 19 mai 2022

Composition du Jury :

M., Champion, Antony	Directeur de recherche, IRD Montpellier	Rapporteur
M., Laforest, Martin	Chargé de recherche, CRD St Jean sur Richelieu	Rapporteur
M., Guillemin, Jean-Philippe	Professeur, Institut Agro Dijon	Examinateur
Mlle, Meyer, Lucie	Cheffe de projet mondial résistance aux herbicides, BASF	Examinatrice
Mme, Fillinger, Sabine	Directrice de recherche, INRAE Versailles-Grignon	Examinatrice
M., Délye, Christophe	Chargé de recherche, INRAE Dijon	Directeur de thèse
M., Rodriguez, Alain	Ingénieur, ACTA	Invité

Titre : Évolution de la résistance aux herbicides chez l'Ambroisie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia* L.) : recherche des déterminismes génétiques et application au diagnostic moléculaire.

Mots clés : Ambroisie, séquençage à très haut débit, diagnostic, transcriptomique, résistance aux herbicides, acétolactate-synthase (ALS)

Résumé : L'ambroisie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia* L.) est une adventice nuisible et allergisante, principalement contrôlée en milieu agricole par des herbicides de la famille des inhibiteurs de l'acétolactate synthase (ALS). L'efficacité de cette gestion chimique a récemment été confrontée à l'apparition de cas de résistance impliquant les deux grandes catégories de mécanismes : la résistance liée à la cible (RLC, mutations structurales dans le gène de l'ALS) et la résistance non liée à la cible (RNLC, mutation régulatrices et/ou structurales du métabolisme secondaire). L'objectif fondamental de ce travail était d'identifier des déterminismes génétiques de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS ayant évolué chez l'ambroisie en France. D'un point de vue appliqué, ce travail visait également à préparer le développement d'un outil de diagnostic moléculaire « à haut débit » destiné à assurer un diagnostic rapide de la résistance.

Dans une première partie, nous avons évalué la situation de la résistance de l'ambroisie en France, caractérisé les mécanismes en cause et leurs modalités d'évolution. À l'aide de tests biologiques couplés au séquençage du gène de l'ALS, nous avons montré que la résistance de l'ambroisie à deux substances actives, l'imazamox et le tribénuron, est émergente en France, et principalement due à des mécanismes de RNLC. Les profils de résistance observés suggèrent qu'il existe une diversité de mécanismes de RNLC. Concernant la RLC, nous avons montré qu'elle évolue localement, par l'apparition multiple et indépendante d'allèles mutants de l'ALS. L'application innovante du séquençage à haut débit pour le diagnostic de la RLC à l'échelle nationale a permis d'identifier plusieurs foyers émergents de RLC, ainsi qu'une diversité insoupçonnée de mutations dans le gène de l'ALS. Dans une seconde partie, nous nous sommes concentrés sur la recherche de déterminismes génétiques de la RNLC. Une approche transcriptomique (RNASeq) associée à la recherche de polymorphismes nucléotidiques a été conduite,

sur l'hypothèse que des gènes et/ou des marqueurs de la RNLC peuvent être identifiés sur la base de leur niveau d'expression et/ou de polymorphismes de séquence caractéristiques des plantes résistantes aux inhibiteurs de l'ALS. Pour la première fois, cette approche a été conduite directement sur du matériel végétal du champ, à savoir : six populations possédant des origines géographiques et/ou des profils de résistance distincts. Des différences d'expression constitutives entre plantes résistantes et sensibles ont été identifiées. Elles concernaient notamment des familles de gènes dont l'implication dans la métabolisation des herbicides est connue (cytochromes à P450, enzymes à activité transférase, transporteurs...), ainsi que des gènes pouvant intervenir dans des cascades de régulation activées par l'herbicide. La validation du niveau d'expression relatif et de la capacité des candidats à prédire la RNLC a été effectuée à partir d'un échantillonnage massif de plantes. L'ensemble des résultats indique qu'une très grande diversité de mécanismes est impliquée dans la RNLC au sein et entre chacune des populations, soulignant le caractère hautement polygénique de la RNLC chez l'ambroisie. En outre, l'analyse de la réponse précoce des plantes au traitement a montré que des gènes impliqués dans le métabolisme secondaire des plantes sont spécifiquement induits par le traitement chez les plantes résistantes des différentes populations. Enfin, des polymorphismes potentiellement corrélés à la RNLC ont été identifiés. Leur validité en tant que marqueurs de résistance reste à vérifier.

La diversité des mécanismes identifiés au sein de chacune des populations rend le développement d'un outil de diagnostic moléculaire complexe, mais ouvre des perspectives passionnantes quant à l'étude de la dynamique évolutive de l'adaptation d'une espèce envahissante soumise à une pression de sélection anthropique particulièrement intense.

Title: Evolution of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L) resistance to herbicides : identification of genetic determinisms and application to molecular diagnosis

Keywords: common ragweed, high throughput sequencing, diagnosis, RNA sequencing, herbicide resistance, acetolactate synthase (ALS)

Abstract: Common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.), a particularly troublesome and allergenic weed, is mainly controlled in agricultural fields using ALS inhibitor herbicides. Recent cases of herbicide resistance have been reported in France and are jeopardising the efficacy of this mode of action. Both target site resistance (TSR, structural mutation in ALS gene) and non target site resistance (NTSR, regulatory and/or structural mutations in secondary metabolism) are involved. The fundamental aim of this work was to identify the genetic determinisms of resistance to ALS inhibitors that have evolved in common ragweed populations in France. As an applied objective, this work also aimed to prepare the development of a high-throughput molecular diagnostic tool that would ensure a rapid detection of resistance.

We first assessed the situation of common ragweed resistance in France and identified the mechanisms involved and their modalities of evolution. Using herbicide sensitivity bioassays coupled with ALS gene sequencing, we showed that ragweed resistance to two active substances, imazamox and tribenuron, is emerging in France and is mainly due to NTSR mechanisms. The observed resistance patterns suggest that a diversity of NTSR mechanisms are evolving in France. Furthermore, we demonstrated that TSR evolved locally, through multiple and independent appearance of mutations in the ALS gene. Thanks to the innovative application of high-throughput sequencing for the diagnosis of TSR on a national scale, we identified several foci of TSR emergence, as well as an unsuspected diversity of mutations in the ALS gene. We then studied the genetic determinisms of NTSR. A transcriptomic approach (RNASeq) associated with an analysis of nucleotide polymorphisms was conducted, based on the hypothesis that genes and/or markers of NTSR differed by their expression level and/or by sequence polymorphisms between plants resistant or sensitive to ALS inhibitors.

For the first time, this approach was conducted directly on field plant material, i.e. six populations with distinct geographical origins and/or resistance profiles. Constitutive expression differences between resistant and sensitive plants were identified, especially in genes from families known to be involved in herbicide metabolism (cytochromes P450, transferase enzymes, transporters, etc.), but also in genes that may be involved in regulatory cascades activated by the herbicide. Validation of their relative expression levels and their ability to predict NTSR was performed on a massive sampling of plants. Taken together, the results indicate that a very high diversity of mechanisms is involved in RNLC within and between populations, highlighting the highly polygenic nature of RNLC in ragweed. In addition, assessment of the early response of plants to herbicide application showed that genes involved in secondary plant metabolism are specifically induced by treatment in resistant plants from different populations. Finally, sequence variants potentially correlated with NTSR were identified. Their validity as resistance markers remains to be confirmed.

The diversity of resistance mechanisms identified within each population renders the development of a molecular diagnosis tool complex. On the other hand, it opens exciting perspectives for the study of the evolutionary dynamics of the adaptation of an invasive species subjected to a particularly intense anthropogenic selection pressure.

Remerciements

Une théorie est née dans mon esprit embrumé par quelques mois de réflexion et de rédaction intense. Allez, je me lance. C'est bien le seul endroit où ma crédibilité scientifique ne sera pas remise en cause. Finalement, ne peut-on pas faire le parallèle entre l'évolution d'un trait complexe et polygénique tel que la résistance non liée à la cible et le passage du grade de doctorant à celui de docteur ? Je m'explique : à la fin de sa thèse, le doctorant, à force d'avoir subi une pression de sélection très intense (anthropique, mais pas que !), aboutit à l'expression d'un phénotype très résistant, celui du docteur. L'évolution vers ce phénotype complexe est, selon moi, liée à la sélection, au cours des années, d'allèles à effets mineurs dont l'accumulation aboutit à l'expression finale de ce phénotype. **Mais quels sont les allèles qui ont conduit à l'expression de ce trait ?**

Au cours de cette dernière réflexion, je liste tous ces allèles que j'ai pu identifier. L'ordre de citation n'a pas d'importance, je tiens à le préciser, vous êtes tous statistiquement corrélés à ce que je suis devenue.

Avant de subir cette pression de sélection, j'ai développé un terrain génétique favorable à mon évolution en tant que, tout d'abord doctorante.

Les tous premiers allèles sélectionnés sont :

L'équipe CASPER à l'ANSES. Cette toute première expérience dans la recherche est clairement l'élément déclencheur de mon envie de poursuivre dans cette voie. Merci à **Annie, Benoit, Claire et Christine** qui m'ont accompagnée lors de mes premiers gazouillis et m'ont encouragée à poursuivre. **Benoit**, la suite est plus loin.

Émile et Sophie, les profs de PROTEC à l'ENSAIA. Merci à tous les deux. J'ai, grâce à vous, acquis un bon nombre de connaissances de base qui m'ont été très utiles pendant cette thèse et qui le seront encore probablement dans la suite de ma carrière. Merci de m'avoir encouragé à poursuivre dans cette voie.

Yves Le Roux, le prof de stat : c'est pendant vos cours et grâce à votre dynamisme que j'ai commencé à développer un fort attrait pour les stats et... ce logiciel obscure... « R » !

Virginie, Marie, Mickael et Pauline de Biogemma. Vous avez été de véritables coachs dans ma recherche de thèse ! Merci pour vos précieux conseils qui ont porté leurs fruits !

Ma famille. Merci de m'avoir soutenue lors de toutes ces longues années d'études et merci pour les moments conviviaux que nous avons pu partager. Je les espère encore plus nombreux à l'avenir !

Puis sont venus :

Les financeurs de ce projet qui ont permis de débiter ce processus de sélection : l'ACTA et l'INRAE. Merci à **Alain Rodriguez** d'avoir suivi mon travail.

Christophe, Benoit et Valérie, le trio d'encadrant ! Merci à tous les trois pour votre patience. Je sais que je me pose toujours 10 000 questions et que cela n'a pas toujours été facile à gérer pour vous. Merci pour la qualité indiscutable de votre encadrement scientifique, d'avoir trouvé les moyens pour ma prolongation et aussi pour le temps supplémentaire que vous m'avez consacré pour la préparation de la suite. Merci aussi de m'avoir laissée travailler en autonomie, tout en pouvant me laisser l'opportunité de m'appuyer sur vous en cas de difficultés.

Benoit, j'ai beaucoup apprécié ton positivisme, même dans les situations les plus chaotiques ! Merci pour ton aide, tes retours positifs et encouragements !

Christophe, un mélange complexe entre maître Yoda et Dark Vador. Merci pour tes riches conseils, tes critiques constructives qui m'ont fait râler mais surtout progresser ! J'ai bien cru que j'y laisserai la peau quelques fois (RIP les petites plantes mutantes que j'ai joyeusement décapitées et mises à la poubelle), merci pour ton indulgence.

Valérie, merci pour ton aide sur les analyses de données. J'espère que nous pourrons continuer à travailler ensemble sur des données encore plus corsées, mais je suis sûre, qui t'intéresseront autant que moi !

Anne-Sophie Walker et Nicolas Langlade, les membres de mon comité de suivi scientifique de thèse. Merci pour vos supers conseils que j'ai mis en application au cours de ma thèse avec beaucoup d'intérêt. Merci Nicolas pour la découverte du Fluidigm qui a considérablement augmenté le débit des manip ! Merci Anne-Sophie pour ton écoute bienveillante.

Les membres du jury : merci d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Votre décision finale sera celle qui déterminera l'expression de mon phénotype complet !

Sébastien Carrere de l'équipe LIPME à Toulouse : merci pour ta réactivité, pour toutes les nombreuses analyses que tu as faites pour moi et d'avoir répondu à mes très nombreuses questions !

Bruno et Isabelle : Merci pour les moments conviviaux organisés autour d'un bon barbecue, d'une bonne bière (faite maison !) et d'un jardin orné de magnifiques ambroisies ! Merci Bruno pour ton écoute et tes conseils tout au long de cette thèse !

L'équipe serre : merci à tous pour les arrosages et la veille sanitaire au sein des serres ! Merci Karine et Damien pour le sauvetage de Simba, à l'époque où, à l'INRAE, les chats étaient considérés comme des animaux de compagnie et non comme des nuisibles.

Les copines : **Jeanne et Victoire**. Entre Paris, Dubaï et Dijon, puis la Covid, Paris et Dijon et enfin la rédaction... on aura quand même toujours réussi à se retrouver ! Merci à toutes les deux pour ces supers week-end qui ont été une véritable ressource, entre la découverte des fausses crevettes au goût de crevette (étrange !), le TER entre Paris et Dijon qui finalement, ne va pas à Dijon, oups, Paris à vélo, le marathon des grands crus (on remet ça l'an prochain ?). Merci pour votre soutien infini depuis toutes ces années !

Virginie (Kwanya) : tu te rappelles cette promesse faite en amphi en 1A ? Et bien voilà, promesse tenue, tu es dans les remerciements de ma thèse !

Kevin et Dïnia : merci pour les pauses potins-salade de riz passées à midi, la découverte du passage secret entre les bâtiments qui mène... à la machine à gâteaux ! Votre talent à trouver des événements sur le campus où on pouvait manger à l'œil, les soirées à Dijon. Bon courage pour la fin Dïnia, tu y es presque !

L'équipe du beer-time, **Damien et Séverin**. Merci pour l'organisation de ces retrouvailles hebdomadaires vraiment sympas, même quand on était que trois !

Les copains : **Aux, Gwladys, Lucie**. Merci pour les soirées vin et fromage, crêpes, poke bowl (il y a eu une prise de conscience là, non ?), la mémorable et unique nuit de camping, les randos, et nos retrouvailles régulières (qui le seront davantage maintenant, les ours sont bientôt de sortie !).

La famille Derrouch. Merci à tous pour votre accueil en Aveyron, le pays où les gens ont vraiment un drôle d'accent (qu'est-ce qu'il a dit ?), le whisky est servi pur à 11h et pour tous les moments conviviaux passés, à Noël, en vacances, au mariage de Lu et tous ceux qui sont déjà planifiés et auxquels j'ai hâte de participer. Merci pour votre soutien !

Damien. S'il y avait un unique allèle à effet fort, ce serait toi : disons-le, sans toi, je n'y serai pas arrivée. T'imagines un peu si je t'avais donné 1 euro à chaque fois que tu m'as entendu râler ? Tu aurais déjà de quoi te l'acheter cet établi ! Merci 1000 fois de m'avoir supportée, dans tous les sens du terme, merci pour tes relectures de mon manuscrit, tes encouragements et ton aide dans les moments les plus difficiles. Merci pour les moments de joie tellement essentiels que tu as su apporter à notre quotidien un peu trop morose ces derniers mois ! « Travail, Famille, Patrie », « Il faut boire de l'eau avant d'avoir soif », « Il est où Simba ? », « Recette de gaufres ».

Bon alors, on les prend ces vacances ?

Table des matières

REMERCIEMENTS.....	4
TABLE DES MATIERES.....	9
LISTE DES TABLEAUX.....	12
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES ANNEXES	15
ABREVIATIONS	16
INTRODUCTION GENERALE	1
SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE.....	6
RESISTANCE AUX HERBICIDES : DEFINITION, MECANISMES ET EVOLUTION	7
<i>Définition</i>	7
<i>Mécanismes de résistance</i>	7
<i>La résistance aux herbicides : une évolution adaptative des adventices</i>	15
OUTILS DE DIAGNOSTIC DE LA RESISTANCE	20
<i>Tests biologiques : une étape nécessaire pour confirmer la résistance, indépendamment du mécanisme en cause</i>	20
<i>Outils de détection basés sur l'amplification de l'ADN</i>	21
<i>Diagnostic de la RNLC : recherche d'allèles ou de marqueurs grâce aux outils « omiques »</i>	22
LES INHIBITEURS DE L'ALS	25
<i>Mode d'action</i>	25
<i>Résistance aux inhibiteurs de l'ALS</i>	26
<i>Variétés rendues tolérantes aux inhibiteurs de l'ALS</i>	28
<i>AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA L., BIOLOGIE, IMPACT SANITAIRE ET AGRONOMIQUE</i>	30
<i>Taxonomie et morphologie</i>	30
<i>Cycle de développement</i>	31
<i>Espèce allergène</i>	32
<i>Une espèce à fort potentiel adaptatif</i>	32
<i>Espèce adventice</i>	34
<i>Résistance aux herbicides de l'ambrosie dans le monde et en France</i>	35
OBJECTIFS DE LA THESE	38
PREMIERE PARTIE : RESISTANCE DE L'AMBROISIE AUX INHIBITEURS DE L'ALS : MECANISMES EN CAUSE ET MODALITES D'EVOLUTION.....	40
CHAPITRE 1.....	41
RESULTS.....	44
DISCUSSION.....	51
CONCLUSIONS	54
MATERIALS AND METHODS	54
SUPPLEMENTARY INFORMATION 1	55
SUPPLEMENTARY INFORMATION 2	58
RESULTATS COMPLEMENTAIRES AU CHAPITRE 1 : ÉVALUATION DE L'EFFICACITE DE DIFFERENTS MODES D'ACTION SUR UNE POPULATION PRESENTANT DES MECANISMES DE RNLC AU TRIBENURON	65
POINTS CLES ET TRANSITION	71
DEUXIEME PARTIE : RECHERCHE DES DETERMINISMES GENETIQUES DE LA RESISTANCE NON LIEE A LA CIBLE AUX INHIBITEURS DE L'ALS CHEZ <i>AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA L.</i> PAR UNE APPROCHE TRANSCRIPTOMIQUE 72	
CHAPITRE 2 : DETERMINISMES GENETIQUES DE LA RESISTANCE NON LIEE A LA CIBLE AUX INHIBITEURS DE L'ALS CHEZ <i>AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA L.</i> : UNE ANALYSE TRANSCRIPTOMIQUE REVELE L'EVOLUTION D'UNE DIVERSITE DE MECANISMES AU SEIN DE MULTIPLES POPULATIONS EN FRANCE	73

INTRODUCTION.....	74
MATERIEL ET METHODES	81
<i>Assemblage d'un transcriptome de référence pour l'ambrosie : l'AMBELbase</i>	81
<i>Matériel végétal</i>	82
<i>Analyses</i>	85
<i>Bilan méthodologique</i>	88
RESULTATS	90
<i>Assemblage d'un transcriptome de référence pour l'ambrosie : AMBELbase</i>	90
<i>Sélection de gènes candidats à la RNLC exprimés de manière constitutive au sein de six populations résistantes à l'imazamox ou au tribénuron</i>	90
<i>Validation des niveaux d'expression en qPCR fluidigm</i>	94
<i>Évaluation de la capacité du niveau d'expression des gènes candidats à prédire le phénotype</i>	96
<i>Évaluation de la capacité du niveau d'expression des gènes candidats à prédire le phénotype sur un échantillonnage indépendant</i>	98
<i>Évaluation du niveau d'expression des gènes candidats validés sur un nouvel échantillonnage indépendant</i>	98
<i>Comparaison de l'expression relative des gènes entre plantes résistantes et sensibles avant et deux heures après traitement</i>	103
<i>Caractérisation de l'effet du traitement sur l'expression des gènes des individus résistants et sensibles de chaque population</i>	106
DISCUSSION	109
<i>Une grande diversité de mécanismes a évolué entre les différentes populations d'ambrosie de cette étude</i>	109
<i>Une grande diversité de mécanismes a évolué au sein de chacune des populations</i>	116
<i>Une grande diversité de familles de gènes a été identifiée</i>	117
<i>Réponse des plantes au traitement</i>	119
CONCLUSION.....	120
INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES	122
POINTS CLES ET TRANSITION	143
CHAPITRE 3 : IDENTIFICATION DE VARIANTES DE SEQUENCES CORRELES A LA RESISTANCE NON LIEE A LA CIBLE DE MULTIPLES POPULATIONS D'AMBROSIA ARTEMISIIFOLIA L. AUX INHIBITEURS DE L'ALS PAR UNE APPROCHE DE RECHERCHE DE VARIANTES A L'ECHELLE DU TRANSCRIPTOME.....	144
INTRODUCTION.....	145
MATERIEL ET METHODES	147
<i>Évaluation de la pertinence de la méthode de recherche de variants sur les données RNASeq</i>	147
<i>Extension de la méthode de recherche de variants à l'ensemble des données RNASeq</i>	148
RESULTATS	150
<i>Évaluation de la pertinence de la méthode sur les données de RNASeq</i>	150
<i>Recherche de variants de séquences associés à la RNLC au sein de six populations d'ambrosie</i>	153
<i>Test d'association cas/contrôle</i>	153
DISCUSSION	158
INFORMATIONS SUPPLEMENTAIRES	161
DISCUSSION GENERALE.....	165
APPORT DE NOS TRAVAUX SUR LA COMPREHENSION DE L'ÉVOLUTION DE LA RESISTANCE AUX HERBICIDES COMME PHENOMENE ADAPTATIF FACE A UNE TRÈS FORTE PRESSION DE SÉLECTION	166
<i>Les adaptations sont-elles le résultat de nombreuses mutations à faible effet, ou sont-elles principalement dues à des mutations à fort effet phénotypique ?</i>	167
<i>Les mêmes phénotypes adaptatifs dans des populations distinctes ont-ils les mêmes bases génétiques ?</i>	169
L'IDENTIFICATION DES DETERMINISMES GENETIQUES DE LA RNLC POURRA-T-ELLE PERMETTRE DE DEVELOPPER UN OUTIL DE DIAGNOSTIC DE CETTE RESISTANCE POLYGENIQUE ?.....	171
LIMITES DES APPROCHES TRANSCRIPTOMIQUES POUR IDENTIFIER DES DETERMINISMES GENETIQUES D'UN TRAIT POLYGENIQUE QUANTITATIF TEL QUE LA RNLC ET LE DEVELOPPEMENT D'UN OUTIL DE DIAGNOSTIC MOLECULAIRE	172
PERSPECTIVES DE NOTRE TRAVAIL	174

<i>Valider et cartographier les marqueurs identifiés dans le Chapitre 3.....</i>	<i>174</i>
<i>Explorer la piste de la sélection de mécanismes induits au-delà des deux heures après traitement.....</i>	<i>174</i>
<i>Étudier des populations dans lesquelles la résistance est plus évoluée.....</i>	<i>175</i>
<i>Explorer la piste des réseaux de gènes co-régulés avec les données transcriptomiques.....</i>	<i>175</i>
REFERENCES	177
ANNEXES	214
ANNEXE 1 : CLASSIFICATIONS DES HERBICIDES (HRAC ET R4P).....	215
ANNEXE 2 : ARTICLES DE VULGARISATION	216

Liste des tableaux

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

TABLEAU 1 : MECANISMES DE RESISTANCE DETECTES POUR LES DIFFERENTS MODES D'ACTION HERBICIDE ET NOMBRE DE CAS CORRESPONDANTS	13
TABLEAU 2 : LES QUATRE TECHNIQUES "OMIQUES" ET LEUR APPLICATION POUR LE DIAGNOSTIC DE LA RNLC	23

CHAPITRE 1 (LOUBET ET AL., 2021)

TABLE 1: MUTANT ALS ALLELES DETECTED BY ILLUMINA POOL-SEQ AND THEIR ESTIMATED WITHIN-POPULATION FREQUENCIES IN A RANDOM SAMPLING OF 213 POPULATIONS.....	45
TABLE 2: OCCURRENCE AND FREQUENCIES OF IMAZAMOX-RESISTANT PLANTS AND OF TRIBENURON-RESISTANT PLANTS IN THE 31 POPULATIONS FROM THE TARGETED SAMPLING (43 POPULATIONS IN TOTAL) WHERE AT LEAST ONE RESISTANT PLANT WAS DETECTED BY HERBICIDE SENSITIVITY BIOASSAYS.....	46
TABLE 3: GENOTYPE AT ALS CODON 205 AND SENSITIVITY TO IMAZAMOX OR TRIBENURON OF COMMON RAGWEED.....	51

RESULTATS COMPLEMENTAIRES AU CHAPITRE 1

TABLEAU 3 : EFFICACITE DE QUATRE INHIBITEURS DE L'ALS (TRIBENURON, IMAZAMOX, FLORASULAME ET METSULFURON), UN INHIBITEUR DE L'EPSP SYNTHASE (GLYPHOSATE) ET UN MELANGE D'HERBICIDE AUXINIQUE (HALAUXIFEN/AMYNOPYRALIDE) SUR UNE POPULATION D'AMBOISIE (NAQ8) PRESENTANT UNE FORTE FREQUENCE DE RESISTANCE AU TRIBENURON EN RAISON DE MECANISMES DE RNLC.....	73
---	----

CHAPITRE 2

TABLEAU 4 : ÉTUDES TRANSCRIPTOMIQUES CONDUITES A CE JOUR VISANT A IDENTIFIER LES DETERMINISMES GENETIQUES DE LA RNLC CHEZ DIFFERENTES ESPECES ADVENTICES POUR DIFFERENTS MODES D'ACTION HERBICIDE	82
TABLEAU 5 : EFFECTIFS DE PLANTES PRODUITES POUR CHACUNE DES SIX POPULATIONS ET EXPERIENCE CORRESPONDANTE	89
TABLEAU 6 : DESIGN EXPERIMENTAL APPLIQUE POUR LES TROIS EXPERIENCES DE RNASEQ	90
TABLEAU 7 : NIVEAU D'EXPRESSION DES GENES DE VALIDES EN qPCR FLUIDIGM ET LEUR NIVEAU D'EXPRESSION CORRESPONDANT EN qPCR « CLASSIQUE » SUR L'ÉCHANTILLONNAGE 4.....	106
TABLEAU 8 : COMPARAISON DU NOMBRE DE GENES DE ENTRE PHENOTYPE RESISTANT ET SENSIBLE AVANT ET APRES TRAITEMENT POUR CHACUNE DES POPULATIONS DE L'ÉTUDE	110
TABLEAU 9 : ÉVOLUTION DE L'EXPRESSION RELATIVE DES GENES CANDIDATS CONSTITUTIFS SELECTIONNES POUR LEUR DE AVANT TRAITEMENT ET EGALEMENT DE APRES TRAITEMENT EN RNASEQ	111
TABLEAU 10 : COMPARAISON DU NOMBRE DE GENES DE ENTRE LES DEUX MODALITES DE TRAITEMENT POUR CHAQUE PHENOTYPE ET POPULATION DE L'ÉTUDE	112
TABLEAU 11 : DIVERSITE DES GENES POSSIBLEMENT IMPLIQUES DANS LA RNLC IDENTIFIES CHEZ DIFFERENTES ADVENTICES POUR DIFFERENTS HERBICIDES	117

CHAPITRE 3

TABLEAU 12 : COMPARAISON DES FREQUENCES DE SNP MESUREES SUR LES DONNEES DE RNASEQ ET EN SEQUENÇAGE SANGER DE PLANTES INDIVIDUELLES	157
TABLEAU 13 : EFFECTIFS DE PLANTES DANS CHAQUE POOL ET NOMBRE DE SNPs IDENTIFIES AVANT ET APRES FILTRATION DES DONNEES POUR LES POPULATIONS ARA2, ARA8, CVL5, NAQ8, NAQ9 ET OCC13.....	159
TABLEAU 14 : SNPs SIGNIFICATIVEMENT ASSOCIES AUX ECHANTILLONS RESISTANTS OU SENSIBLES DE LA POPULATION NAQ8	160

Liste des figures

INTRODUCTION GENERALE

FIGURE 1 : EVOLUTION DU NOMBRE D'INGREDIENTS ACTIFS (TRAIT PLEIN) ET DE COMBINAISONS ACTIVES D'HERBICIDES DE SYNTHESE (POINTILLES) EN FRANCE DEPUIS LEUR APPARITION	3
---	---

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

FIGURE 2 : D'APRES R4P NETWORK (2016); LES DIFFERENTS MECANISMES DE RESISTANCE AUX PESTICIDES DEVELOPPES PAR LES ORGANISMES NUISIBLES.	8
FIGURE 3 : METABOLISME DES HERBICIDES DANS UNE CELLULE VEGETALE	10
FIGURE 4 : METABOLISATION D'UN PESTICIDE PAR LES PLANTES DURANT LA PHASE 1 ; (A) LES FAMILLES DE P450 QUI CATALYSENT DES REACTIONS DE COMPOSES XENOBIOTIQUES DANS LES PLANTES ; (B) DIFFERENTES REACTIONS QUE PEUVENT CATALYSER LES ENZYMES AU COURS DE LA PHASE 1	11
FIGURE 5 : MODELE D'EVOLUTION DE LA RNLC PAR ACCUMULATION D'ALLELES PROPOSE PAR DELYE (2013)	18
FIGURE 6 : COMPARAISON DES TECHNIQUES DE SEQUENÇAGE "BAS" ET "HAUT" DEBIT	22
FIGURE 7 : FAMILLES CHIMIQUES DES INHIBITEURS DE L'ALS (GROUPE HRAC 2/B).....	25
FIGURE 8 : ÉVOLUTION DU NOMBRE D'ESPECES RESISTANTES AUX GROUPES HRAC 1 A 5, 9 ET 22 DEPUIS 1955.	26
FIGURE 9 : MUTATIONS DANS LE GENE DE L'ALS QUI CONFERENT (EN ROUGE) OU PEUVENT CONFERER (EN BLEU) DE LA RESISTANCE .	27
FIGURE 10 : (A) PLANTULE D'AMBROISIE ; (B) ET (C) STADE VEGETATIF, FEUILLES DECOUPEES ET PORT BUISSONNANT ; (D) INFLORESCENCES MALES EN EPIS ET FLEURS FEMELLES A LEUR BASE ; (E) ZOOM SUR LES FLEURS FEMELLES.....	31
FIGURE 11 : CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE L'AMBROISIE EN FRANCE	32
FIGURE 12 : REPARTITION DE L'AMBROISIE EN FRANCE EN 2020	34

CHAPITRE 1 (LOUBET ET AL., 2021)

FIGURE 1: GEOGRAPHICAL DISTRIBUTION OF THE NINE MUTANT ALS ALLELES IDENTIFIED IN THIS STUDY AMONG COMMON RAGWEED POPULATIONS.....	46
FIGURE 2: HAPLOTYPE NETWORK OF THE ALS HAPLOTYPES CARRYING A MUTATION AT CODON 205, 574 OR 578.....	48
FIGURE 3: OCCURRENCE OF RESISTANCE TO IMAZAMOX, TRIBENURON AND BOTH HERBICIDES IN THE TARGETED SAMPLING OF 43 COMMON RAGWEED POPULATIONS.....	50

RESULTATS COMPLEMENTAIRES AU CHAPITRE 1

FIGURE 13 : PHOTOS DES TESTS D'EFFICACITE DE QUATRE INHIBITEURS DE L'ALS (TRIBENURON, IMAZAMOX, FLORASULAME ET METSULFURON), UN INHIBITEUR DE L'EPSP SYNTHASE (GLYPHOSATE) ET UN MELANGE D'HERBICIDES AUXINIQUES (HALAUXIFEN+AMINOPYRALIDE) SUR UNE POPULATION D'AMBROISIE (NAQ8) PRESENTANT UNE FORTE FREQUENCE DE RESISTANCE AU TRIBENURON EN RAISON DE MECANISMES DE RNLC.....	76
---	----

CHAPITRE 2

FIGURE 14 : SCHEMA BILAN METHODOLOGIQUE	95
FIGURE 15 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE QUE L'ENSEMBLE DES GENES EXPRIMES PAR LES POPULATIONS ARA2, ARA8, NAQ8, NAQ9, OCC13 ET CVL5	97
FIGURE 16 : DIAGRAMME DE VENN REPRESENTANT LES GENES DIFFEREMMENT EXPRIMES AU SEIN DES CINQ POPULATIONS REGROUPANT DES PLANTES RESISTANTES AU TRIBENURON.....	98
FIGURE 17 : NIVEAUX D'EXPRESSION MOYENS OBSERVES CHEZ LES PLANTES RESISTANTES (ROUGE) ET CHEZ LES PLANTES SENSIBLES (BLEU) A L'IMAZAMOX OU AU TRIBENURON DANS LES POPULATIONS (A) ARA2 POUR LES 15 GENES PRESENTANT UNE DE SIGNIFICATIVE, (B) ARA POUR LES 8 GENES PRESENTANT UNE DE SIGNIFICATIVE, (C) NAQ8 TRIBENURON POUR LES 7 GENES PRESENTANT UNE DE SIGNIFICATIVE	101
FIGURE 18 : VARIATION DU TAUX DE PREDICTION CORRECT DU PHENOTYPE (ACCURACY), DE LA SENSIBILITE (SENSITIVITY) ET DE LA SPECIFICITE (SPECIFICITY) POUR LES HUIT MODELES TESTES DANS LES POPULATIONS ARA2, ARA8 ET NAQ8	103

FIGURE 19 : ANALYSE EN COMPOSANTE PRINCIPALE DES NIVEAUX D'EXPRESSION OBTENUS POUR LES GENES DE VALIDES EN QPCR FLUDIGM SUR L'ECHANTILLONNAGE 4	108
FIGURE 20 : RESULTAT DE L'ANALYSE D'ENRICHISSEMENT GO POUR LES GENES DE IDENTIFIES ENTRE ECHANTILLONS PRELEVES APRES ET AVANT TRAITEMENT (R2HAT/RAT ET S2HAT/SAT) POUR CHACUNE DES SIX POPULATIONS.....	114

CHAPITRE 3

FIGURE 21 : DISTRIBUTION DES -LOG10 P-VALUES OBSERVEES POUR LES TESTS D'ASSOCIATION DE FISHER POUR LES POPULATIONS ARA2, ARA8, CVL5, NAQ8, NAQ9 ET OCC13 PAR RAPPORT A LA DISTRIBUTION DES -LOG10 P-VALUES ATTENDUES.....	163
--	-----

Liste des annexes

ANNEXE 1 : CLASSIFICATIONS DES HERBICIDES (HRAC ET R4P)

ANNEXE 2 : ARTICLES DE VULGARISATION

Abréviations

ALS	Acétolactate synthase
2HAT	Deux heures après traitement
ABC transporteurs	ATP binding cassette transporter
ACCase	Acétyl-CoA carboxylase
ACP	Analyse en composante principale
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	ADN complémentaire
AHAS	acétohydroxyacide synthase
Anses	Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN	Acide ribonucléique
ASE	Allele specific expression
AT	Avant traitement
BP	Procédé biologique
CYP	Cytochromes à P450
dCAPS	derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence
DE	différence d'expression/différentement exprimé
ENI-VTH	effets non-intentionnels associés à l'utilisation des variétés de tournesol tolérantes aux herbicides
EPSP synthase	5-énolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase
FC	Fold change
GO	Gene Ontology
GST	glutathion-S-transférases
GT	glucosyl ou glucosyl-transférases
GWAS	étude d'association pangénomique
HCPC	classification hiérarchique sur composante principale
HPPD	4-hydroxyphénylpyruvate dioxygénase
HRAC	Herbicide resistance action committee
Inhibiteurs de la DOXP synthase	Inhibiteurs de la 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase
Inhibiteurs de la PDS	inhibiteurs de la phytoène désaturase
Inhibiteurs de la PPO	Inhibiteurs de la protoporphyrinogène oxydase
Inhibiteurs du PSII	Inhibiteurs du photosystème II
LOOCV	Leave-One-Out Cross Validation
MF	Fonction moléculaire
nt	nucléotide
pb	paire de base
PCR	Polymerase chain reaction
qPCR	PCR quantitative
R4P	Réseau de Réflexion et de Recherches sur les Résistances aux Pesticides
RLC	Résistance liée à la cible
RNASeq	Séquençage de l'ARN

RNLC	Résistance non liée à la cible
SBT	surveillance biologique du territoire
SNP	single nucleotide polymorphisms
vcf	variant call format
VrTH	variétés rendues tolérantes aux herbicides
WSSA	Weed science society of america

« La théorie, c'est quand on sait tout et que rien ne fonctionne. La pratique, c'est quand tout fonctionne et que personne ne sait pourquoi. Ici nous avons réuni théorie et pratique : Rien ne fonctionne... et personne ne sait pourquoi ! »

Albert Einstein



Introduction générale

Introduction générale

Le modèle agricole a connu un bouleversement majeur après la seconde guerre mondiale. Durant cette période d'après-guerre, de nombreuses innovations technologiques ont été développées dans le but de répondre à un objectif de productivité alimentaire croissant (Boulaïne 1992). Le succès de cette « révolution verte » découle de quatre avancées majeures : les avancées sur la compréhension de la fertilisation minérale, l'essor de la mécanisation de l'agriculture, la sélection de variétés plus productives grâce aux progrès dans le domaine de la génétique et le développement des produits de synthèse pour la fertilisation et la protection des cultures (Zimdahl 2018a). La protection des cultures, c'est-à-dire, la mise en place de moyens pour réduire les pressions biotiques des champignons phytopathogènes, des ravageurs et des adventices sur les cultures a joué un rôle central dans cette révolution et a contribué à l'augmentation des rendements. Sans protection des cultures, les pertes de rendements peuvent être considérables, de l'ordre de 50% pour le blé et de 80% pour le coton (Oerke 2006). Les adventices, définies comme des « plantes qui causent des dommages économiques ou écologiques, créent des problèmes de santé pour l'homme et/ou les animaux ou qui sont indésirables à l'endroit où elles poussent » (WSSA 2016), sont la cause des pertes de rendements les plus importantes. D'après Oerke (2006) et Fried et al. (2017), elles sont responsables d'une perte potentielle de 23 à 43,6 % du rendement réalisable, contre 8,7 à 36,8 % pour les ravageurs et 8,5 à 21,2 % pour les champignons phytopathogènes. Les adventices exercent une nuisibilité directe (nuisibilité primaire) ou indirecte (nuisibilité secondaire) sur la production. La nuisibilité primaire s'exprime par les pertes de rendements qu'elles causent en raison de la compétition qu'elles exercent pour les ressources sur les cultures (eau, lumière, nutriments) (Zimdahl 2018b), mais également par la présence de leurs graines qui peuvent contaminer la récolte et ainsi diminuer sa qualité. La nuisibilité secondaire s'exprime par les impacts environnementaux et sanitaires qu'elles peuvent engendrer. Elles peuvent par exemple, favoriser la prolifération de ravageurs (Altieri 1999) ou de maladies (exemple de l'ergot du seigle, Mantle et Shaw 1977). Egalement, leur pollen peut être la cause d'allergies (exemples des graminées et de l'ambrosie à feuilles d'armoise, Bassett et Crompton 1975). Aussi, elles peuvent être toxiques pour l'homme/les animaux (exemples de *Jacobaea vulgaris* ou de *Datura stramonium*, producteurs d'alcaloïdes toxiques pour l'homme et les animaux d'élevage (Freye 2010 ; Goeger et al. 1982)). La lutte contre les adventices, qu'elle soit d'intérêt agricole ou sanitaire représente donc un enjeu essentiel au maintien de la production.

L'innovation majeure concernant la protection des cultures vis-à-vis de la lutte contre les adventices concerne l'utilisation des herbicides de synthèse. Ces derniers, en raison de leur efficacité et de leur facilité d'utilisation, ont considérablement réduit le temps de travail en comparaison des méthodes de désherbage manuelles ou mécaniques. Leur utilisation n'a cessé d'augmenter depuis leur apparition, en 1944, lorsque le 2,4-D (acide 2,4-dichlorophénoxyacétique), un analogue synthétique

Introduction générale

de l'auxine, a été commercialisé. La recherche phytopharmaceutique durant la période d'après-guerre a permis le développement de nombreuses autres molécules jusque dans les années 90 dans le monde et en France (Figure 1). Cette diversification des modes d'action et des cibles a permis de répondre aux besoins de production toujours plus élevés. Les herbicides représentent aujourd'hui le moyen de lutte contre les adventices le plus utilisé au monde. Leur consommation a d'ailleurs doublé entre 1990 et 2018 à l'échelle mondiale bien que la surface de terre cultivée soit restée stable (« FAOSTAT »).

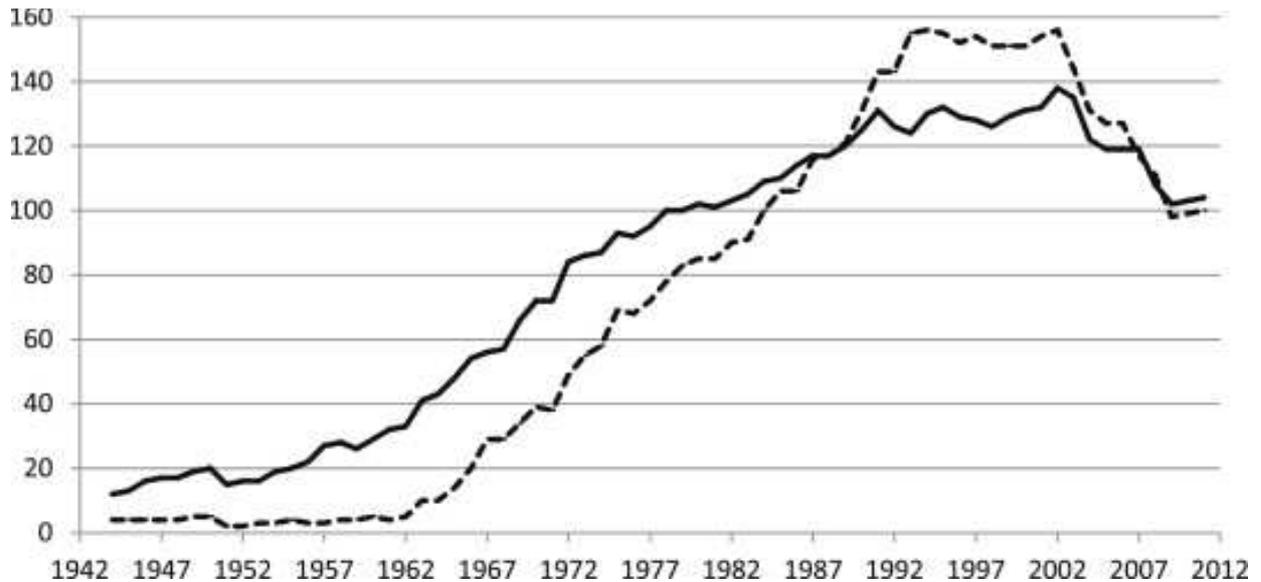


Figure 1 : évolution du nombre d'ingrédients actifs (trait plein) et de combinaisons actives d'herbicides de synthèse (pointillés) en France depuis leur apparition (Chauvel et al. 2012)

Cette augmentation de l'usage des herbicides n'est cependant pas sans conséquences, notamment sur l'environnement. Ils sont d'une part une source de pollution des sols et de l'eau (Schwarzenbach et al. 2010). Ces pollutions sont d'autant plus graves que certaines molécules sont très rémanentes dans l'environnement. Par exemple, en France, les métabolites de l'atrazine, un herbicide interdit en 2003, sont encore une des principales source de pollution pesticide dans l'eau (Ministère de la transition écologique 2020). D'autre part, ils entraînent une réduction de la biodiversité qui contribue à l'homogénéisation de l'agroécosystème (Altieri 1999) et menace sa durabilité (Fried et al. 2009), la biodiversité étant à l'origine de nombreux services écosystémiques essentiels notamment pour le maintien de la production.

Une autre conséquence de l'utilisation des herbicides est qu'en réponse à la forte pression de sélection qu'ils exercent sur les adventices, des mécanismes de résistances ont rapidement évolué chez celles-ci, réduisant l'efficacité de ces produits. Cette évolution a également été favorisée par la simplification des systèmes de culture mis en place pour répondre aux objectifs de productivité. Les

Introduction générale

premiers cas de résistance aux herbicides sont apparus peu de temps après la commercialisation des premiers herbicides. La résistance au 2,4-D a été détectée pour la première fois en 1957 (Switzer 1957), suivi par un second cas en 1968 pour l'atrazine et la simazine (Ryan 1970). De nombreux cas ont ensuite évolué dès les années 80 pour les herbicides des familles des inhibiteurs de l'ALS et des inhibiteurs de l'ACCase. Aujourd'hui, la résistance concerne 21 des 31 modes d'action d'herbicides commercialisés et 266 espèces d'adventices (Heap 2022). De plus, le marché des herbicides est largement dominé par six modes d'action qui représentent à eux seuls 75% des parts du marché (Peters & Strek 2018). Parmi ces six modes d'action, quatre sont concernés par des problèmes de résistance (Peters & Strek 2018).

La résistance aux herbicides menace donc aujourd'hui l'efficacité de ces produits. En outre, depuis 35 ans, de nombreux produits ne répondant plus aux normes toxicologiques et écotoxicologiques ont été retirés du marché Français et Européen (Chauvel et al. 2012 ; Figure 1). À cela, s'ajoute le fait que la découverte de nouveaux modes d'action est bien plus lente que l'évolution des cas de résistance (Dayan 2019 ; Gaines, Busi, et Küpper 2021), le dernier commercialisé ayant été découvert il y a plus de 25 ans (Duke 2012). Le diagnostic préalable de la résistance est donc crucial pour limiter son évolution, assurer la durabilité des solutions encore disponibles et éviter des applications inefficaces qui contribueront tout de même à polluer l'environnement.

L'usage des herbicides a favorisé la création d'un environnement agricole homogène avec une très faible diversité d'espèces autres que la variété cultivée (Fried et al. 2009). Cet environnement est propice à l'établissement d'espèces envahissantes (Fried et al. 2017 ; Zimdahl & Brown 2018). C'est le cas de l'ambrosie à feuilles d'armoise, *Ambrosia artemisiifolia*, une espèce adventice envahissante à l'échelle mondiale, particulièrement difficile à gérer dans le tournesol puisqu'elle appartient à la même famille botanique que cette culture (Astéracées) et pour laquelle des cas de résistance aux herbicides ont déjà été signalés aux États-Unis et au Canada (Heap 2022). Les pertes moyennes de rendements en culture de tournesol liées à la présence de l'ambrosie en Europe sont chiffrées à 1,84 milliards d'euros par an (Fried et al. 2017). Afin de faciliter sa gestion dans cette culture, des variétés de tournesol tolérantes aux inhibiteurs de l'ALS ont été développées et adoptées notamment en France dans des régions subissant de fortes infestations d'ambrosie (Anses 2020). Ces variétés ont la capacité de survivre à l'application de ce groupe d'herbicides ce qui facilite les opérations de désherbage. Le recours à ce type de variété augmente cependant le risque de sélectionner de la résistance si les pratiques ne sont pas raisonnées (raccourcissement des rotations et/ou augmentation du nombre d'application d'herbicides) (Vencill et al. 2012). La gestion de l'ambrosie dans ce type de culture doit donc se réfléchir dans un programme de désherbage intégré à l'échelle de la rotation. Pour limiter la pression de sélection exercée par les inhibiteurs de l'ALS, des applications chimiques en pré-levée avec

d'autres modes d'actions herbicides (inhibiteurs de la synthèse des caroténoïdes ou du photosystème II) sont recommandées, ainsi qu'un désherbage mécanique en complément de l'utilisation des inhibiteurs de l'ALS en post-levée. Afin d'éviter que ses semences n'alimentent le stock semencier, il est recommandé d'introduire des cultures d'hiver dans la rotation et de la gérer lors de l'interculture estivale (Terre inovia 2019).

Malgré ces recommandations, le risque de voir évoluer au sein des populations d'ambrosie françaises de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS restait élevé et le premier cas a été détecté dès 2013, seulement 3 ans après la commercialisation de ces variétés (Meyer 2018). Le diagnostic de cette résistance est aujourd'hui un enjeu majeur afin de limiter sa propagation sur le territoire et de conserver des méthodes de lutte efficaces contre cette espèce.

C'est dans ce contexte d'émergence de la résistance de l'ambrosie aux inhibiteurs de l'ALS en France que s'est effectuée cette thèse. Lors de ce travail, nous avons entrepris d'**élucider les mécanismes de résistance et les déterminismes génétiques qui en sont la cause. A terme, cette avancée de connaissances devrait permettre le développement d'un outil de diagnostic moléculaire de la résistance dont l'utilisation sur le terrain permettrait d'améliorer la gestion de cette adventice.** Afin d'introduire ce travail, les connaissances essentielles à la compréhension de nos travaux sont présentées dans une synthèse bibliographique. Au travers de cette synthèse, dans une première partie, nous définissons la résistance aux herbicides et ses mécanismes d'une manière générale. Dans une seconde partie, nous détaillons ensuite les outils de diagnostic de la résistance existants à ce jour, ainsi que les méthodes permettant d'identifier ses déterminismes génétiques. Dans une troisième partie, nous présentons le groupe d'herbicides pour lequel nous avons étudié la résistance de l'ambrosie, les inhibiteurs de l'ALS. Finalement, nous présentons l'espèce que nous avons étudiée, l'ambrosie, pour laquelle nous détaillons notamment le contexte de résistance vis-à-vis des herbicides à l'échelle mondiale et française.

Synthèse bibliographique

Résistance aux herbicides : définition, mécanismes et évolution

Définition

Gressel (1990) a défini la résistance aux herbicides comme la capacité héritable d'une plante à survivre suite à l'application d'un herbicide appliqué selon les recommandations d'usage et à produire une descendance viable. La « Weed Science Society of America » (WSSA 2016) a complété cette définition en distinguant les mécanismes de résistance qui sont présents à l'état naturel dans des populations sauvages, et les mécanismes liés à l'introduction de gènes de résistance dans les variétés cultivées rendues résistantes aux herbicides.

Mécanismes de résistance

Avant d'introduire les mécanismes de résistance, il est nécessaire de définir les étapes qui conduisent à l'action d'un herbicide. Lorsqu'un herbicide est appliqué, il pénètre dans la plante puis est transporté jusqu'à son site d'action où il va s'accumuler, interagir avec sa cible et ainsi exercer son effet cytotoxique (Figure 2). Son efficacité va dépendre de la quantité de substance active capable d'atteindre sa cible sans être dégradée par le métabolisme de la plante, du temps que sa forme active restera disponible pour interagir avec son site d'action et de la sensibilité de la cible à cette substance (Gaines et al. 2020). La classification internationale HRAC (« HRAC Global ») des herbicides classe les différents groupes d'herbicides en fonction de leur site d'action (Annexe 1). D'autres classifications existent, comme la classification développée par le réseau de chercheurs R4P (« R4P – Réseau de Réflexion et de Recherches sur les Résistances aux Pesticides ») qui propose une classification unifiée de tous les produits phytosanitaires (Annexe 1).

Les mécanismes conférant la résistance vont interférer avec au moins une des étapes qui permet à l'herbicide d'exercer son effet cytotoxique. Deux grandes catégories de mécanismes de résistance sont définies : la résistance liée à la cible (RLC) et la résistance non liée à la cible (RNLC).

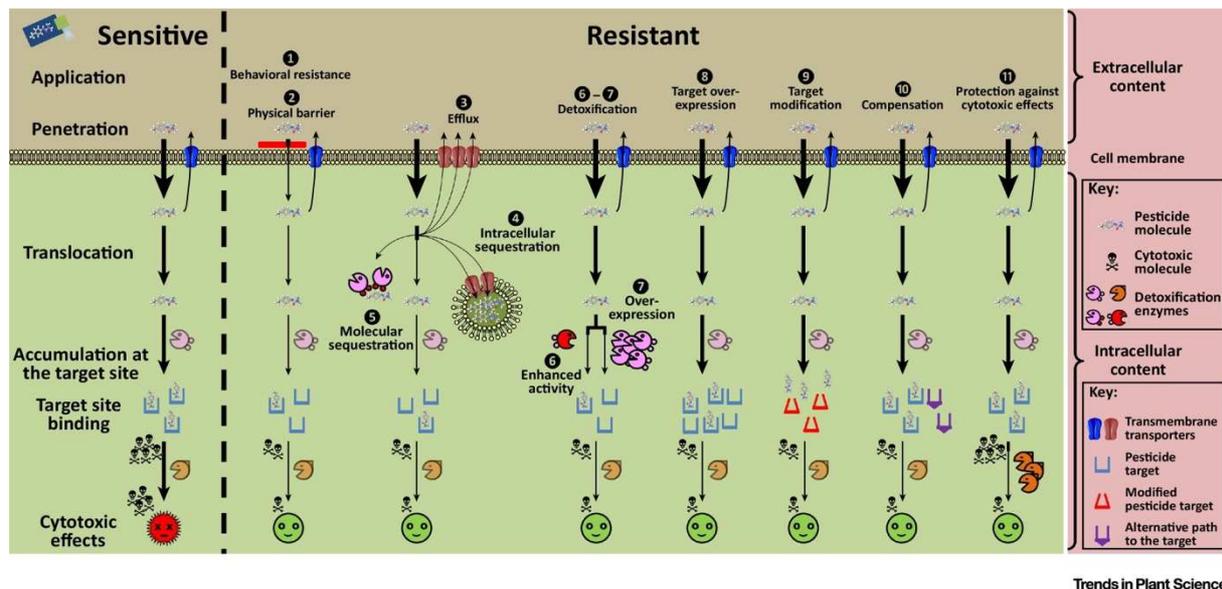


Figure 2 : D'après R4P Network (2016); les différents mécanismes de résistance aux pesticides développés par les organismes nuisibles.

La RLC : des mécanismes qui affectent la cible de l'herbicide

La RLC est spécifique du mode d'action de l'herbicide : elle provoque une réduction de l'efficacité de l'herbicide sur sa cible. Elle peut être causée par une mutation structurale du gène de la cible de l'herbicide (Figure 2, ⑨), ce qui conduit à réduire l'affinité de l'herbicide pour sa cible, ou bien par une surexpression de la cible (mutation de régulation), ce qui permet de « diluer » l'effet de l'herbicide (Figure 2, ⑧). La modification de la cible de l'herbicide est le mécanisme de RLC le plus répandu. Les mutations se produisent en général dans ou près du site de liaison de l'herbicide pour sa cible. Cependant certaines mutations peuvent se produire ailleurs dans la molécule sans interférer avec l'activité de l'enzyme (Gaines et al. 2020). La RLC peut engendrer ou non de la résistance à plusieurs familles chimiques d'un même mode d'action (Beckie & Tardif 2012 ; Heap 2022). Cela dépend de la manière dont l'herbicide interagit avec sa cible et de comment la mutation structurale interfère avec sa fixation (Gaines et al. 2020). La surexpression de la cible (Figure 2, ⑧) est liée, soit à des changements de la régulation de la transcription du gène cible, soit à l'augmentation du nombre de copies du gène dans le génome. Elle affecte tous les herbicides agissant sur cette cible.

La RNLC : des mécanismes qui interfèrent avec l'action de l'herbicide

Les mécanismes de RNLC permettent de diminuer la quantité de molécules herbicides capables d'atteindre leur cible ou bien de protéger la plante des effets cytotoxiques liés à l'action de l'herbicide. Ils peuvent être constitutifs ou induits : dans le premier cas, les voies du métabolisme neutralisent

Synthèse bibliographique

l'herbicide sont plus actives chez les plantes résistantes même en absence d'exposition à un herbicide, dans le second les mécanismes de RNLC sont déclenchés suite à la perception du stress abiotique généré par le traitement (Délye 2013).

Résistance par esquive ou réduction d'absorption

La RNLC peut résulter d'une réduction de l'absorption de la molécule par la plante (Figure 2, ① et ②) grâce à un phénomène d'esquive ou bien une modification physiologique de la plante. Dans le premier cas, en raison des effets indirects que peut avoir l'application d'un herbicide sur la dormance des semences (Darmency et al. 2017), les adventices lèvent après l'application de l'herbicide. Elles ne sont donc pas exposées à l'application. Dans le second cas, une modification de la cuticule de la plante permet de réduire la quantité de substance absorbée. Ces mécanismes sont peu courants et souvent associés à d'autres mécanismes de résistance (Gaines et al. 2020). Par exemple, dans le cas d'une population d'*Amaranthus tuberculatus*, la réduction de l'absorption du glyphosate a été associée à un mécanisme de RLC (Nandula et al. 2013).

Résistance par modification du transport de la molécule jusqu'à sa cible

Des mécanismes de RNLC peuvent interférer lors du transport de la molécule jusqu'à sa cible. La molécule peut être directement excrétée hors de la cellule via des transporteurs membranaires (Figure 2, ③). Elle peut également être séquestrée au sein de structures intracellulaires ou moléculaires avant d'atteindre sa cible (Figure 2, ④ et ⑤). Des changements du flux de translocation et/ou une séquestration vacuolaire ont par exemple été enregistrés chez des plantes résistantes au glyphosate, au paraquat et à deux herbicides auxiniques, le 2,4-D et le dicamba (Gaines et al. 2020).

Résistance par détoxification de l'herbicide

D'autres mécanismes permettent la neutralisation de l'herbicide par détoxification grâce à une amélioration de l'activité d'enzymes de détoxification (Figure 2, ⑥) ou bien leur surproduction (Figure 2, ⑦). La détoxification des composés xénobiotiques par les plantes se déroule théoriquement en quatre phases (Figure 3 ; Zhang et Yang 2021 ; Gaines et al. 2020).

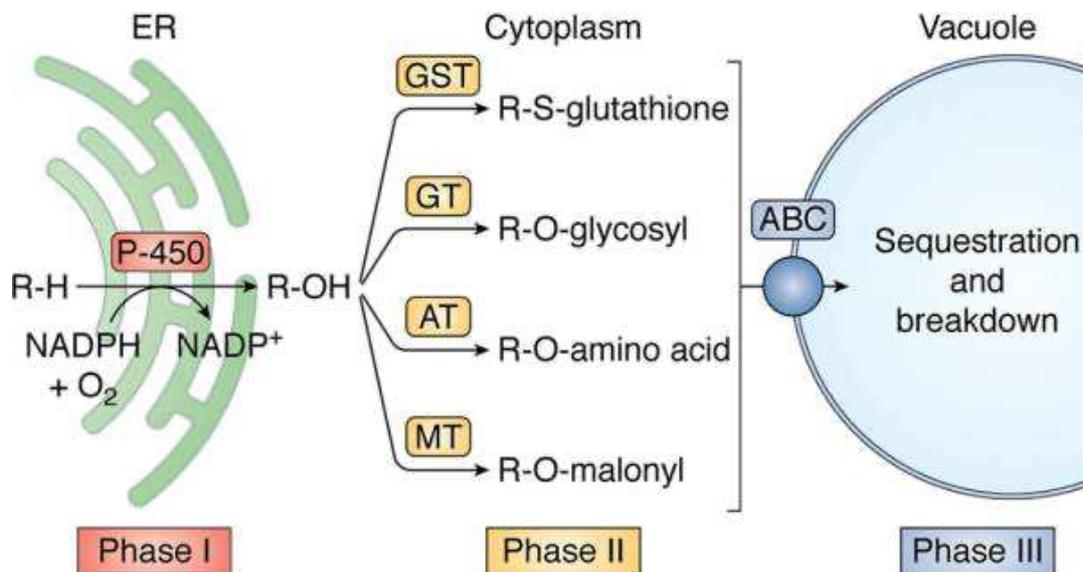


Figure 3 : Métabolisme des herbicides dans une cellule végétale (Gaines et al. 2020). Les herbicides peuvent être dégradés au cours de trois phases successives du métabolisme. En général, la phase I permet grâce à des réactions d'oxido-réduction d'augmenter la solubilité de la molécule. La phase II permet l'ajout de composés hydrosolubles à la molécule en cours de dégradation. Lors de la phase III, les métabolites conjugués sont transférés au sein de la vacuole ou de la paroi végétale où ils subiront leur dégradation ultime.

La phase 1 permet de réduire la toxicité de la molécule et d'augmenter sa solubilité grâce à diverses réactions enzymatiques, comme illustré sur la Figure 4 (B). Cette première phase peut faire intervenir une grande diversité de familles enzymatiques : des monooxygénases à cytochromes à P450 (CYP) (Figure 4 (A)), des oxydases, des peroxydases, des estérases, des hydrolases, des laccases (Délye 2013 ; Zhang et Yang 2021). Les CYP représentent la plus vaste famille d'enzymes chez les plantes et catalysent la plupart des réactions du métabolisme (Nelson et Werck-Reichhart 2011). Leur rôle dans la métabolisation des herbicides a été démontré pour des cultures (Werck-Reichhart & Feyereisen 2000) et des adventices (Siminszky 2006). Pas moins de 30 CYP ont été identifiés chez différentes espèces pour leur capacité à métaboliser les herbicides (Dimaano & Iwakami 2021). Par exemple, l'implication de la famille des CYP81 dans la dégradation d'au moins cinq familles d'herbicides (groupes HRAC 1, 2, 3, 5 et 27) a été démontrée (Han et al. 2021 ; Iwakami et al. 2014 ; 2019) pour *Lolium rigidum* et *Echinochloa phyllopogon*. D'autres familles (CYP70, 71, 72 et 96) ont été décrites comme impliquées dans la métabolisation de différents herbicides (Gaines et al. 2020).

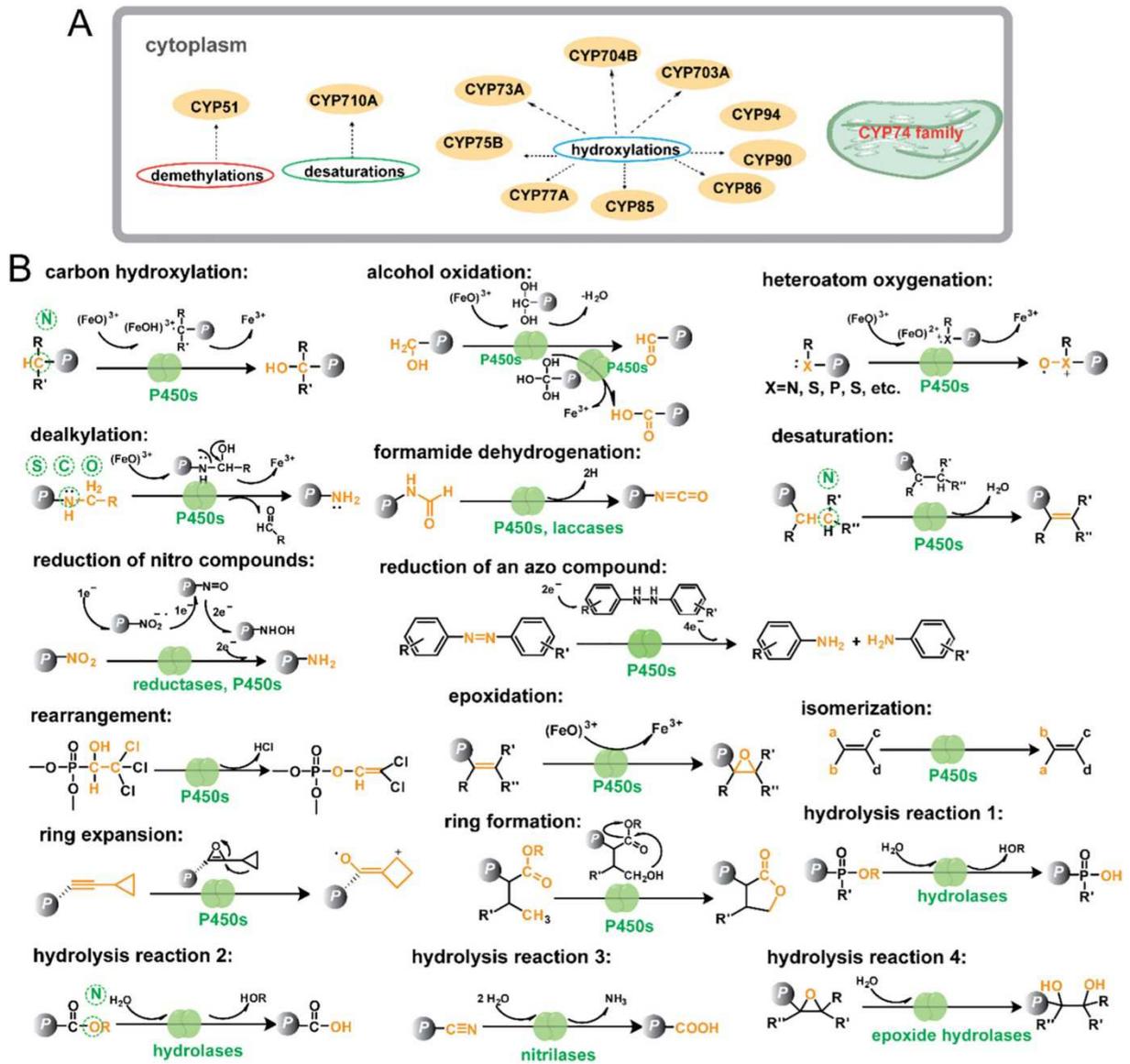


Figure 4 : métabolisation d'un pesticide par les plantes durant la phase 1 ; (A) les familles de P450 qui catalysent des réactions de composés xénobiotiques dans les plantes ; (B) différentes réactions que peuvent catalyser les enzymes au cours de la phase 1 (Zhang & Yang 2021)

La phase 2 (Figure 3) vise à améliorer la solubilité de la molécule et à diminuer sa toxicité. Elle consiste à ajouter à la molécule en cours de dégradation un composé supplémentaire par réaction de conjugaison. Cette phase est catalysée par des enzymes comme les glutathion-S-transférases (GST), des glucosyl ou glycosyl-transférases (GT), des amino-transférases ou des malonyl-transférases. L'implication d'enzymes de type GST dans la dégradation de différents herbicides des groupes HRAC 1, 2, 5, 14, 15 a été démontrée à plusieurs reprises (Anjum et al. 2010 ; Chronopoulou et al. 2017 ; Cummins et al. 2013). L'implication directe des autres enzymes de type transférases dans la dégradation des herbicides n'a pas été démontrée, mais une exacerbation de leur activité a été notée à plusieurs reprises (Gaines et al. 2020).

Lors de la phase 3 (Figure 3), la molécule conjuguée est séquestrée dans des organites cellulaires comme la vacuole ou bien dans la paroi végétale où elle sera définitivement dégradée par des enzymes de types carboxypeptidases ou lyases (Coleman et al. 1997) lors de la phase 4. Le transport de la molécule conjuguée jusqu'à ces composés cellulaires peut être réalisé par le biais de transporteurs actifs comme les ABC transporteurs (« ATP binding cassette ») ou d'autres types de transporteurs (transporteurs spécialisés dans le transport actif de molécules conjuguées au glutathion ou à un résidu glucosylé, (Coleman, Blake-Kalff, et Davies 1997 ; Zhang et Yang 2021). Les ABC transporteurs sont des protéines membranaires impliquées dans le transport de molécules comme les sucres, les acides-aminés ou les composés xénobiotiques (Zhang, Zhao, et Yang 2018). Leur rôle dans le transport des herbicides n'a pas été directement prouvé mais certaines études montrent qu'une augmentation de leur activité peut être induite en réponse à un traitement (Zhang et al. 2016 ; Wang et al. 2022).

Résistance par compensation ou contournement

Enfin, d'autres mécanismes permettent de compenser les effets de l'herbicide en ayant recours à une voie alternative de celle du site cible qui est inhibée (résistance par contournement, Figure 2, ⑩) ou en neutralisant les molécules cytotoxiques libérées par l'action de l'herbicide (résistance par compensation, Figure 2, ⑪). La résistance par contournement reste théorique pour les adventices et n'a jamais été signalée dans le cas de la résistance aux herbicides. La tolérance au stress oxydatif généré par le traitement herbicide peut être due à l'activité accrue d'enzymes peroxydase (Cummins et Edwards 2004 ; Zhao et al. 2019 ; Piasecki et al. 2019 ; Junzhi Wang et al. 2022 ; Caverzan et al. 2019).

Régulation des mécanismes de RNLC

L'application d'un herbicide est perçue par la plante comme un stress abiotique. La réponse à ce stress est induite aussi bien chez les plantes résistantes que sensibles, mais c'est l'ampleur et la vitesse de la réponse qui vont permettre à un individu de résister ou non (Gaines et al. 2020). Le stress lié à l'application de l'herbicide est perçu par des récepteurs qui envoient le signal à des gènes régulateurs *via* des cascades de régulation (Délye 2013). L'activation de ces voies de régulation va permettre de réguler l'expression de gènes « protecteurs » dont le rôle est d'éliminer l'herbicide ou bien de neutraliser ses effets indirects (Délye 2013). Des voies de réponse au stress chez les plantes comme celles de l'acide jasmonique et de l'acide salicylique peuvent être activées en réponse à un traitement (Zhang et Yang 2021). Des modifications épigénétiques peuvent également intervenir dans

la réponse de la plante au traitement herbicide (Délye 2013 ; Markus et al. 2018), la reprogrammation de l'expression des gènes chez les plantes leur permettant de résister aux stress environnementaux (Markus et al. 2018). A l'heure actuelle, peu d'études se sont intéressées aux mécanismes de régulation de la RNLC, probablement parce que les ressources génétiques nécessaires à ce type d'études sur les espèces adventices sont encore en plein développement. Quelques études ont commencé à explorer l'implication de la méthylation de l'ADN dans la régulation de l'expression de gènes impliqués dans la détoxification d'herbicides (Pan et al. 2022 ; Margaritopoulou et al. 2018 ; Nardemir et al. 2015 ; Lu et al. 2016) et montrent des différences de méthylation entre des plantes sensibles et résistantes qui pourraient être à l'origine de mécanismes de RNLC.

Coexistence des mécanismes de RLC et RNLC

La RLC et la RNLC peuvent coexister au sein d'une population ou d'une même plante (Délye, Jasieniuk, et Le Corre 2013). Des cas ont par exemple été signalés pour des populations de *Lolium rigidum* dont les plantes sont résistantes aux inhibiteurs de l'ACCCase (Han et al. 2016), d'*Amaranthus palmeri* dont les plantes sont résistantes au glyphosate (Larran et al. 2022) et d'*Ambrosia artemisiifolia* pour les inhibiteurs de l'ALS (Meyer et al. 2022). Les mécanismes de RNLC sont prédominants par rapport aux mécanismes de RLC (Gaines et al. 2020). Ils concernent quatorze modes d'actions herbicides commercialisés alors que les mécanismes de RLC en concernent neuf (Tableau 1).

Tableau 1 : mécanismes de résistance détectés pour les différents modes d'action herbicide et nombre de cas correspondants (adapté de Gaines et al. (2020) et Heap (2022) (consulté le 27 décembre 2021))

Groupe HRAC (ancienne nomenclature)	Mode d'action	Famille chimique	Mécanisme de résistance	Nombre de cas de résistance
Synthèse d'acides aminés				
2 (B)	Inhibiteurs de l'ALS			169
		<i>Imidazolinones</i>		
		Imazethapyr	RLC and RNLC	
		Imazaquin	RLC	
		<i>Sulfonylureas</i>		
		Benzulfuron	RLC and RNLC	
		Chlorimuron	RLC and RNLC	
		Chlorsulfuron	RLC and RNLC	
		<i>Pyrimidinyl benzolates</i>		
		Bispyribac	RLC and RNLC	
		<i>Triazolopyrimidine</i>		

Synthèse bibliographique

		Penoxsulam	RNLC	
9 (G)	Inhibiteurs de l'EPSP synthase	Glyphosate	RLC and RNLC	55
10 (H)	Inhibiteurs de la glutamine synthase	Glufosinate	RLC and RNLC	5
Mimétiques de l'auxine				
4 (O)	Auxines de synthèse			41
		<i>Phenoxy-carboxylates</i>		
		2,4-D	RLC and RNLC	
		Dicamba	RLC and RNLC	
		Quinclorac	RNLC	
		<i>Picolinates</i>		
		Picloram	RLC	
Synthèse des caroténoïdes				
27 (F2)	Inhibiteurs de l'HPPD			3
		Isoxaflutole	RNLC	
		<i>Triketones</i>		
		Mesotrione	RNLC	
		Tembotrione	RNLC	
34 (F3)	Inhibiteurs de la Lycopene cyclase	Amitrole	RNLC	6
12 (F1)	Inhibiteurs de la PDS			5
		<i>Diphenyl heterocycles</i>		
		Fluridone	RLC	
		<i>N-Phenyl heterocycles</i>		
		Norflurazon	RLC	
13 (F4)	Inhibiteurs de la DOXP synthase	Clomazone	RNLC	3
Division cellulaire				
3 (K1)	Inhibiteurs de l'assemblage des microtubules	<i>Dinitroanilines</i>		
		Oryzalin	RLC	
		Trifluralin	RLC	
23 (K2)	Inhibition de l'organisation des microtubules	Carbamates	Non déterminé	1
Synthèse de la chlorophylle				
14 (E)	Inhibiteurs de la PPO	<i>Diphenyl ethers</i>		
		Lactofen	RLC	
		Fomesafen	RNLC	
Synthèse d'acides gras				
1 (A)	Inhibiteurs de l'ACCCase			50
		<i>Aryloxyphenoxypropionates</i>		
		Diclofop-methyl	RLC and RNLC	
		Fenoxaprop-P-ethyl	RLC and RNLC	
		Clodinafop	RNLC	

		Quizalofop	RLC	
		<i>Cyclohexanediones</i>		
		Sethoxydim	RLC	
		Tralkoxydim	RLC and RNLC	
		Pinoxaden	RNLC	
30 (Q)	Inhibiteurs de la thioésterase	Cinmethylin	RNLC	1
15 (K3)	Inhibiteurs de la synthèse des acides gras à très longue chaîne			14
		Thiobencarb	RNLC	
		Flufenacet	RNLC	
		<i>Chloroacetamides</i>		
		Alachlor	RNLC	
		Metolachlor	RNLC	
Photosynthèse				
5 (C1, C2)	Inhibiteurs du photosystème II - Sérine 264			87
		<i>Amides</i>		
		Propanil	RLC and RNLC	
		<i>Triazines</i>		
		Atrazine	RLC and RNLC	
		<i>Ureas</i>		
		Chlorotoluron	RNLC	
		Bentazon	RNLC	
6 (C3)	Inhibiteurs du photosystème II - Histidine 215	<i>Nitriles</i>		4
		Bromoxynil	RNLC	
22 (D)	Diversion d'électron dans le photosystème I	Paraquat	RNLC	32

La résistance aux herbicides : une évolution adaptative des adventices

La résistance aux herbicides a évolué plus ou moins rapidement pour 21 des 31 modes d'action herbicides et concerne à ce jour 266 espèces (Heap 2022). Elle suit un schéma adaptatif généralement rapide lié à la très forte pression de sélection exercée par le traitement (Palumbi 2001). En effet, un traitement appliqué selon les recommandations d'usage permet d'éliminer de 95 à 99% des individus sensibles de la population (Foster et al. 1993). En réponse à cette forte pression de sélection, les individus possédant un avantage sélectif (c'est-à-dire, les individus porteurs d'un ou plusieurs allèles impliqués dans la résistance) survivent et se reproduisent. L'application répétée de l'herbicide va conduire à augmenter la proportion d'individus résistants à chaque traitement et à terme, conduire à leur prédominance dans la population (Délye, Jasieniuk, et Le Corre 2013).

L'évolution de la résistance est facilitée par plusieurs facteurs (Jugulam et Shyam 2019 ; Délye, Jasieniuk, et Le Corre 2013). Elle va dépendre d'une part de l'intensité de la pression de sélection (dose appliquée, fréquence d'application, diversité des modes d'actions utilisés) (Hicks et al. 2018), et d'autre part, des caractéristiques biologiques de l'espèce (mode de reproduction, dissémination du pollen et des graines), de la taille de la population (plus une population sera grande, plus il sera probable qu'elle comprenne des individus avec un avantage sélectif), et de ses caractéristiques génétiques (fréquence initiale de mutations qui confèrent la résistance, coût de la résistance en absence de pression de sélection).

L'origine de la résistance est discutée dans la littérature (Baucom 2019 ; Hawkins et al. 2019 ; Neve et al. 2014). Elle peut résulter, soit de l'apparition spontanée de mutations qui confèrent un avantage sélectif (mutations *de novo*) (Messer & Petrov 2013), soit de mutations déjà présentes en faible fréquence dans la population et qui sont sélectionnées par le changement de pression de sélection (Barrett & Schluter 2008). À l'appui de cette dernière hypothèse, des allèles connus pour être directement impliqués dans la résistance ont été détectés dans des populations n'ayant jamais été exposées aux herbicides (Délye, Deulvot, et Chauvel 2013 ; Mengistu, Messersmith, et Christoffers 2003).

Évolution de la RLC

Le déterminisme génétique de la RLC est généralement monogénique (exception des mimétiques de l'auxine dont les cibles, les récepteurs à l'auxine, sont multiples (Busi et al. 2018)), puisqu'il concerne le gène de la cible de l'herbicide, et conduit le plus souvent à une résistance forte à modérée (Gaines et al. 2020). La RLC évolue dans une population grâce à l'avantage sélectif qu'elle confère aux mutants et se propage rapidement grâce à la pression de sélection (Délye, Jasieniuk, et Le Corre 2013). La cible de l'herbicide est souvent codée par un gène nucléaire (exception pour la résistance à la triazine où la cible de l'herbicide est codée par un gène chloroplastique (Oettmeier 1999)) et dont l'allèle responsable de la résistance est dominant ou semi-dominant (Délye, Jasieniuk, et Le Corre 2013). Il existe quelques rares cas d'allèle récessif (Délye et al. 2004).

Les déterminismes génétiques de la RLC étant connus, l'origine de ce mécanisme a pu être étudiée. Plusieurs études s'accordent sur les origines multiples, indépendantes et redondantes de la RLC (Délye, Jasieniuk, et Le Corre 2013). L'étude de la RLC sur de larges zones géographiques montre que lorsque différentes populations d'une même espèce sont soumises à une même pression de sélection, différents événements de mutation peuvent évoluer indépendamment dans chacune

d'elles. C'est par exemple le cas de populations de *Papaver rhoeas* (Scarabel, Pernin, et Délye 2015 ; Délye, Pernin, et Scarabel 2011) ou de *Raphanus raphanistrum* (Yu et al. 2003) pour les inhibiteurs de l'ALS, *Alopecurus myosuroides* pour les inhibiteurs de l'ACCase (Delye 2004) ou encore *Sorghum halepense* pour le glyphosate (Fernández et al. 2013). De plus, un même allèle peut évoluer dans plusieurs populations d'une même espèce ou de différentes espèces sous l'effet de la pression de sélection (par exemple, pas moins de 11 substitutions au codon 197 du gène de l'ALS ont été recensées chez 40 espèces différentes (Heap 2022)).

Évolution de la RNLC

Les déterminismes génétiques de la RNLC sont le plus souvent complexes et multiples (multigéniques) bien qu'il existe de rares cas de RNLC monogénique (Délye 2013). La RNLC évolue grâce à la sélection d'allèles à effets mineurs qui s'accumulent au cours des générations (Délye 2013 ; Figure 5), comme le démontrent des expériences de sélection récurrente (Busi et al. 2012 ; Ashworth et al. 2016). La sélection de ces allèles est favorisée par l'application de doses sublétales sur le terrain, liées à des pulvérisations non homogènes, de la dérive lors de la pulvérisation, ou de faibles doses appliquées intentionnellement. En effet, certains individus possèdent naturellement des allèles leur permettant de survivre à de faibles doses d'herbicides. En présence d'une pression de sélection, ces allèles sont transmis au cours des générations (Figure 5) et s'accumulent dans la descendance jusqu'à ce qu'à ce qu'ils confèrent une résistance à la pleine dose ou plus (Figure 5). Ils deviennent majoritaires au sein des individus de la population en raison de l'avantage sélectif qu'ils leur confèrent. L'accumulation d'allèles est plus rapide lorsque les plantes sont allogames (Powles et Yu 2010 ; Délye 2013) puisque ce mode de reproduction permet de cumuler des allèles provenant de différents individus. Les limites à cette accumulation sont les fréquences initiales des allèles dans la population et le coût que leur accumulation peut engendrer (Délye 2013).

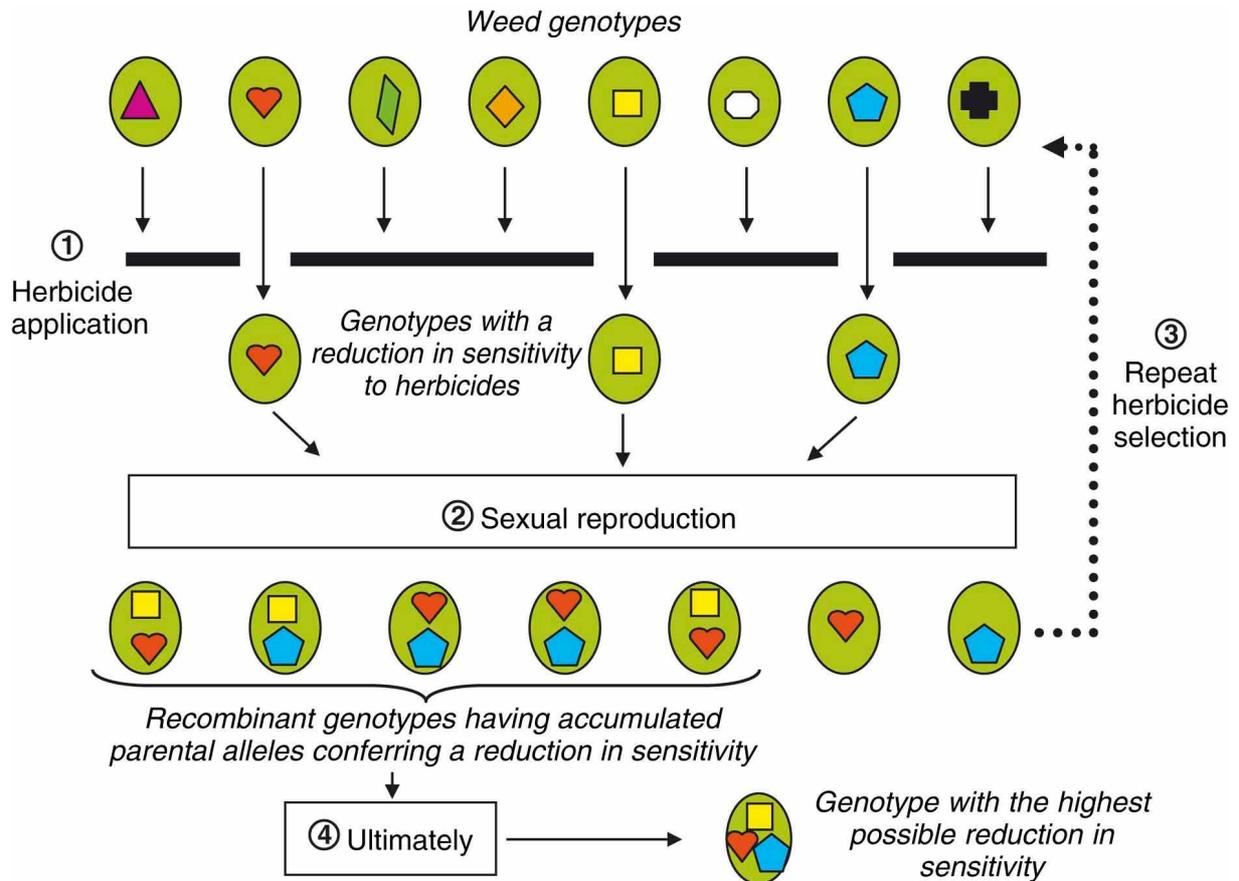


Figure 5 : modèle d'évolution de la RNLC par accumulation d'allèles proposé par Délye (2013). L'application d'un herbicide permet de sélectionner des génotypes qui confèrent aux plantes une réduction de sensibilité. Les individus issus de la reproduction de ces génotypes auront accumulé différents allèles parentaux. Ces nouveaux génotypes peuvent être moins sensibles que les plantes parentales en termes de niveau de résistance et/ou de spectre de résistance. Après plusieurs cycles de sélection, les génotypes obtenus par accumulation de nombreux allèles confèrent une réduction de sensibilité aux herbicides.

Résistance multiple et croisée

A l'inverse de la RLC, les mécanismes de RNLC ne sont pas nécessairement spécifiques d'un mode d'action et peuvent donner lieu à des cas de résistance multiple ou de résistance croisée. Dans le cas de la résistance multiple, plusieurs mécanismes sont sélectionnés et confèrent aux plantes de la résistance à différents modes d'action. Par exemple, Yu et al. (2009) montrent que de multiples mécanismes de RNLC ont évolué dans deux populations de *Lolium rigidum* et confèrent aux plantes qui les composent de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS, de l'ACCCase et de l'EPSP synthase. Dans le cas de la résistance croisée, un même mécanisme peut conférer de la résistance à plusieurs substances actives, indépendamment de leur mode d'action. Par exemple, Han et al. (2021) ont montré l'implication d'une famille de cytochrome (CYP81A) dans la résistance de plantes d'*Echinochoa phyllopogon* et *Lolium rigidum* à quatre groupes herbicides.

Synthèse bibliographique

Puisque la RNLC n'est pas nécessairement spécifique d'un mode d'action, le profil de résistance qu'elle confère est imprévisible et menace l'efficacité de futurs modes d'action qui n'ont pas encore été mis sur le marché (Gaines, Busi, et Küpper 2021). Il existe des modes d'action pour lesquels des mécanismes de RNLC étaient déjà en place avant leur commercialisation. Par exemple, des plantes d'*Echinochloa phyllopogon* ont été détectées résistantes au quinclorac avant sa commercialisation (Yasuor et al 2012).

La détection de la RNLC est d'autant plus complexe que son expression peut varier en fonction des conditions environnementales. Par exemple, des études récentes ont montré que des mécanismes de RNLC sont impactés par des variations de température (Jugulam & Shyam 2019 ; Matzrafi et al. 2016 ; Trezzi et al. 2021). En particulier, certains mécanismes de détoxification seraient favorisés par des températures élevées.

Outils de diagnostic de la résistance

Le diagnostic de la résistance est essentiel pour assurer la gestion durable des communautés adventices et maintenir l'efficacité des solutions chimiques existantes. Il permet de limiter l'application de traitements inefficaces qui ne feraient que contribuer à l'expansion de la résistance à l'échelle de la population traitée. Il existe trois catégories de tests qui permettent le diagnostic de la résistance : les tests biologiques, moléculaires et biochimiques. Dans cette partie, nous nous concentrons sur les tests biologiques et moléculaires.

Tests biologiques : une étape nécessaire pour confirmer la résistance, indépendamment du mécanisme en cause

Les tests biologiques, c'est-à-dire, la pulvérisation d'un herbicide en suivant toutes les recommandations d'usage (bon stade de traitement, bonnes conditions environnementales, dose préconisée) sont une première étape indispensable pour confirmer un cas de résistance (Burgos 2015). La mortalité dans la population testée est comparée à celle d'une population de référence, c'est-à-dire une population pour laquelle 100% des individus sont sensibles au produit testé. Deux types de tests peuvent être réalisés (R4P 2016) :

- les courbes de dose-réponse, qui permettent d'établir la mortalité dans la population à chaque dose testée,
- l'application d'une dose discriminante, qui permet d'établir la fréquence d'individus résistants dans une population.

Le phénotype des plantes (sensible ou résistant) est apprécié par rapport à celui des plantes de la population de référence après traitement. Les tests biologiques ont l'avantage de mettre en évidence la résistance quelle que soit la catégorie de mécanismes en jeu (RLC ou RNLC).

Ils peuvent également permettre de montrer l'implication de mécanismes de RNLC par détoxification grâce à l'application, en complément de l'herbicide, d'inhibiteurs métaboliques. Le spectre d'action de l'inhibiteur appliqué fournit également une indication sur la famille d'enzyme impliquée.

Les tests biologiques requièrent cependant un équipement spécifique (chambre climatique, serre, chambre de pulvérisation) et d'avoir à disposition du matériel végétal vivant. De plus, ils sont longs à mettre en œuvre et ne permettent donc pas un diagnostic immédiat de la résistance, qui permettrait d'éviter l'application d'un traitement sur le terrain.

Outils de détection basés sur l'amplification de l'ADN

Les outils de détection de la résistance basés sur l'amplification de l'ADN permettent de révéler la présence d'une ou plusieurs mutations impliquées dans la résistance. Leur utilisation nécessite donc de connaître les mutations recherchées.

Génotypage d'une mutation, exemple de la PCR dCAPS

La PCR dCAPS (derived Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) est une technique basée sur l'amplification de l'ADN (parmi d'autres, comme par exemple la PCR CAPS, dPACS, allèle spécifique) qui permet le génotypage rapide d'une mutation connue (Délye, Duhoux, et al. 2015). Elle repose sur la reconnaissance d'un site de restriction par une enzyme après amplification du fragment par PCR (Neff et al. 1998). Le site de restriction est inséré au niveau du codon où se situe la mutation sur l'allèle sauvage grâce à un couple d'amorce spécifique. Après amplification, l'amplicon est digéré par l'enzyme de restriction et les génotypes sont lus directement après migration sur gel d'agarose. Cette technique a l'avantage d'être rapide, robuste et peu coûteuse. Elle impose cependant de connaître la mutation à génotyper. Elle est donc adaptée au diagnostic de la RLC, dans la mesure où le nombre d'échantillons à génotyper n'est pas trop important. Elle a par exemple été utilisée pour diagnostiquer la RLC aux inhibiteurs de l'ALS chez *Alopecurus myosuroides* (Délye et Boucansaud 2008), *Lolium* sp. (Délye et al. 2009), *Papaver rhoeas* (Délye, Pernin, et Scarabel 2011) et *Senecio vulgaris* (Délye, Causse, et Michel 2016).

Séquençage « bas-débit » (Sanger) et « haut-débit » (NGS, next generation sequencing)

Le séquençage d'un fragment d'intérêt ou d'un gène entier permet d'identifier une ou plusieurs mutations qui différencient les génotypes sensibles et résistants. Le séquençage Sanger est une technique ancienne (Sanger et al. 1977) qui permet de séquencer un fragment d'intérêt provenant de plantes individuelles. Il est encore utilisé, souvent en complément de tests biologiques, pour rechercher des mutations dans le gène de la cible de l'herbicide (par exemple, Rojano-Delgado et al. 2019 ; Simard et al. 2017 ; Tehranchian et al. 2019). Cette technique est adaptée aux expérimentations de petites dimensions. Pour des études de diagnostic à grande échelle (par exemple, à une échelle nationale), le séquençage « haut débit » (Metzker 2010) est plus adapté puisqu'il permet de séquencer simultanément un ou plusieurs fragment d'ADN pour un très grand nombre d'individus (Délye, Causse, et al. 2015). Cette technique a l'avantage d'être bien moins coûteuse en comparaison du séquençage Sanger lorsque le nombre d'échantillons est important. Elle permet également de diminuer le nombre de réactions et le nombre d'analyses (Figure 6), ce qui augmente considérablement l'échelle de diagnostic possible.

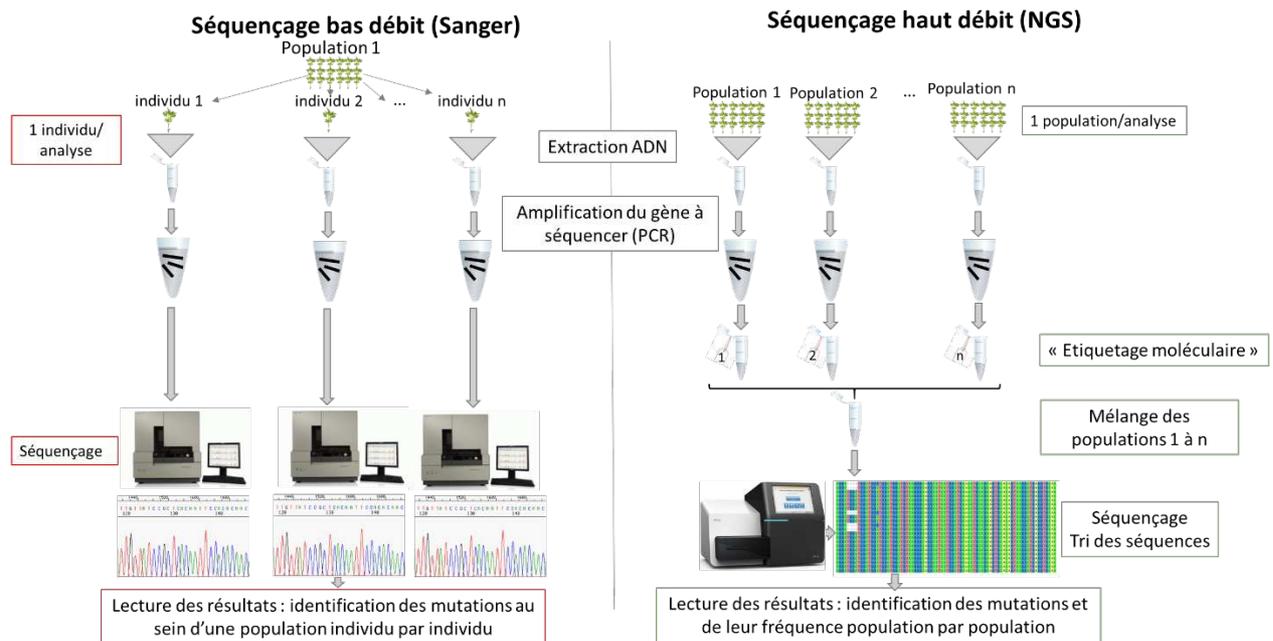


Figure 6 : comparaison des techniques de séquençage "bas" et "haut" débit (Loubet et al., 2020 ; voir Annexe 2)

Dans leur étude, Délye et al. (2015) ont utilisé cette technique pour le diagnostic de la RLC aux inhibiteurs de l'ALS au sein de plusieurs populations d'*Echinochloa crus-galli*. Cette technique a ensuite été appliquée pour le diagnostic de la RLC aux inhibiteurs de l'ALS chez *Senecio vulgaris* et *Ambrosia artemisiifolia* (Délye et al. 2020), aux inhibiteurs de la PPO chez *Amaranthus* sp. (Nie et al. 2019) et aux inhibiteurs de l'ALS, du PSII, de la PPO et au glyphosate chez *A. artemisiifolia* (Kutasy et al. 2021).

Ces outils de diagnostic nécessitent de connaître les déterminismes génétiques de la résistance. Ils sont aujourd'hui très adaptés pour le diagnostic de la RLC. En revanche, les bases génétiques et moléculaires de la RNLC demeurent majoritairement inconnues et d'autres outils peuvent être utilisés pour les rechercher.

Diagnostic de la RNLC : recherche d'allèles ou de marqueurs grâce aux outils « omiques »

Potentiel des « omiques »

Les « omiques » rassemblent les techniques de génomique, transcriptomique, protéomique et métabolomique. Leur usage pour la détection d'allèles de la RNLC (allèles dont le rôle dans la RNLC a été démontré) ou des marqueurs de la RNLC (allèle ou composé cellulaire dont la présence, le niveau d'expression ou la concentration est corrélé avec la RNLC, mais dont le rôle direct n'a pas été prouvé) (Délye 2013) est décrit dans le Tableau 2.

Tableau 2 : les quatre techniques "omiques" et leur possible application pour le diagnostic de la RNLC (Délye 2013)

	Génomique	Transcriptomique	Protéomique	Métabolomique
Molécules ciblées	ADN	ARN	Protéines	Métabolites
Support	Génome (incluant les régions régulatrices et non transcrites)	Transcriptome (tous les transcrits)	Protéome (toutes les protéines)	Métabolome (tous les métabolites)
Exemples de techniques	Séquençage de nouvelle génération (NGS)	Séquençage de nouvelle génération (RNASeq)	Electrophorèse bidimensionnelle	Résonnance magnétique nucléaire (RMN), chromatographie liquide en phase gazeuse + spectrométrie de masse
Objet de la recherche	Polymorphismes spécifiques (mutations ponctuelles, insertions, délétions, duplications)	Allèles marqueurs et/ou niveaux d'expression spécifiques	Modifications post traduction et/ou niveaux d'expression	Concentration de métabolites ou métabolites spécifiques
Outils de diagnostic de la RNLC qui pourraient être développés à l'issue des connaissances acquises grâce aux omiques	Test PCR ou qPCR, puces ADN	Test PCR ou qPCR, Pucés ADN	Tests colorimétriques (basés sur des anticorps permettant de détecter une protéine spécifique ou sur l'activité des enzymes)	Tests colorimétriques (réaction spécifique à un métabolite)

Les technologies de séquençage « haut-débit » ont été adoptées par les malherbologues car elles offrent de nombreuses perspectives quant à la compréhension du lien entre le génotype de la plante et son phénotype. Elles permettent l'assemblage *de novo* de génome et de transcriptome qui permettent l'étude d'espèces non-modèles comme les adventices (Ravet et al. 2018 ; Hölzer et Marz 2019). La baisse de leur coût et l'augmentation des débits de séquençage font que des études de plus en plus nombreuses les utilisent. Elles ont notamment permis l'assemblage de génomes de référence pour plusieurs espèces adventices (Patterson et al. 2019) pendant que d'autres se sont intéressées à l'assemblage de transcriptomes de référence (Giacomini et al. 2018). Les études à l'échelle du

transcriptome sont plus nombreuses : depuis 2013, 30 études ont été conduites dans le but d'identifier des gènes impliqués dans la RNLC.

Potentiel de la transcriptomique

Le séquençage du transcriptome (RNASeq) permet une étude à la fois quantitative et qualitative de l'exome : il permet de comparer l'expression relative de gènes entre différentes conditions, d'analyser des variants de séquence ou de caractériser l'épissage alternatif (Maroli et al. 2018).

La RNLC pouvant résulter de la modification de l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme secondaire de la plante, la transcriptomique est particulièrement adaptée pour l'identification des mécanismes en cause (Délye 2013). La comparaison des profils d'expression de gènes de plantes au phénotype sensible et résistant, avant et/ou après traitement, permet d'identifier des gènes candidats potentiellement impliqués dans des mécanismes constitutifs ou induits de la RNLC (Giacomini et al. 2018). Les données de RNASeq pouvant générer beaucoup de faux positifs, les niveaux d'expression relatifs doivent être validés. La validation est généralement réalisée grâce à la PCR quantitative (qPCR) sur les ADNc (Giacomini et al. 2018). De plus, les résultats de RNASeq ne suffisent pas à démontrer l'implication des gènes identifiés dans des mécanismes de RNLC. Les gènes candidats doivent être validés, soit comme marqueurs de la RNLC en établissant une corrélation entre leur niveau d'expression et un phénotype (Duhoux et al. 2017), soit comme gènes de résistance, auquel cas leur rôle dans la détoxification de l'herbicide peut être validé fonctionnellement (Han et al. 2021 ; Cummins et al. 2013 ; LeClere et al. 2018).

Les variants de séquence peuvent être analysés dans le but d'identifier des mutations qui pourraient expliquer les changements d'activité enzymatique enregistrés (mutations fonctionnelles) ou pour identifier des mutations marqueurs dont la présence est spécifique aux plantes résistantes. Ces marqueurs pourraient alors être utilisés pour développer un outil de diagnostic basé sur l'amplification de l'ADN. En revanche, contrairement à la génomique, la recherche de ces marqueurs au sein du transcriptome ne permet pas d'identifier les mutations dans des régions non-codantes du génome, impliquées dans la régulation de l'expression des gènes et qui expliqueraient les modifications d'expression observées.

Les inhibiteurs de l'ALS

Mode d'action

Les inhibiteurs de l'ALS ont été commercialisés pour la première fois en 1982 (Yu et Powles 2014). Ces herbicides ont rapidement été adoptés et représentent un des modes d'action les plus utilisés encore aujourd'hui. En effet, ces herbicides sont réputés pour agir à faible dose et ne pas être toxiques chez les mammifères puisque ces derniers ne possèdent pas la cible enzymatique de l'herbicide. Ce dernier argument est aujourd'hui controversé en France, des preuves de la toxicité de ces herbicides sur l'environnement et sur la santé de l'homme ayant été rapportées (Bourdineaud 2020). De plus, ces herbicides ont un spectre d'action large et permettent de contrôler à la fois les monocotylédones et les dicotylédones. Ils agissent sur l'acétolactate synthase (ou acétohydroxyacide synthase, AHAS), la première enzyme qui intervient dans la voie de synthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (leucine, valine et isoleucine) (Zhou et al. 2007 ; Duggleby, McCourt, et Guddat 2008). En inhibant l'activité de cette enzyme, ils permettent de diminuer la quantité d'acides aminés essentiels qui assurent le bon fonctionnement de la synthèse des protéines par la plante, ce qui conduit à l'arrêt de la croissance de la plante puis à sa mort. Les effets de l'herbicide sont visibles dès la première semaine, avec un arrêt de la croissance des plantes traitées. Les plantes meurent deux à trois semaines après l'application. Les inhibiteurs de l'ALS incluent cinq familles chimiques représentées sur la Figure 7 ci-après.

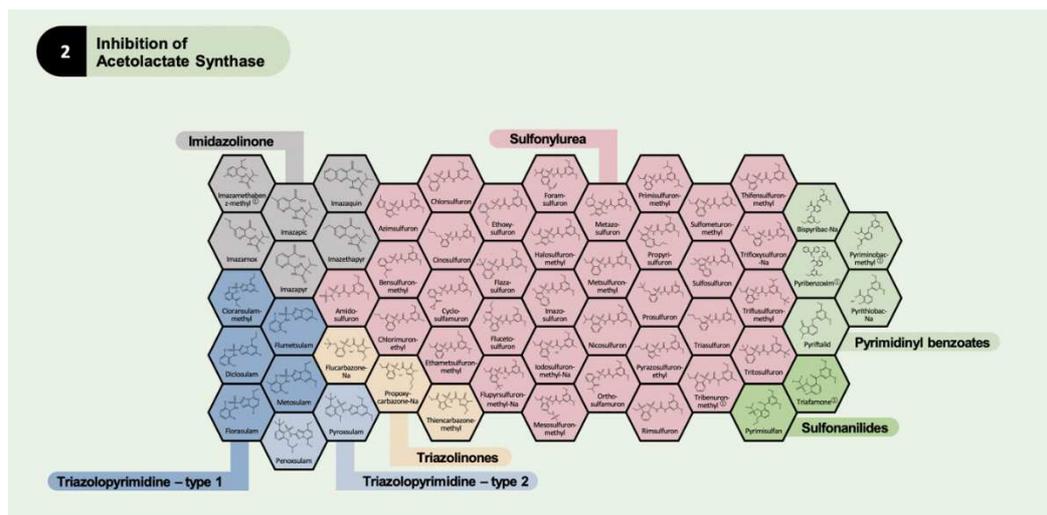
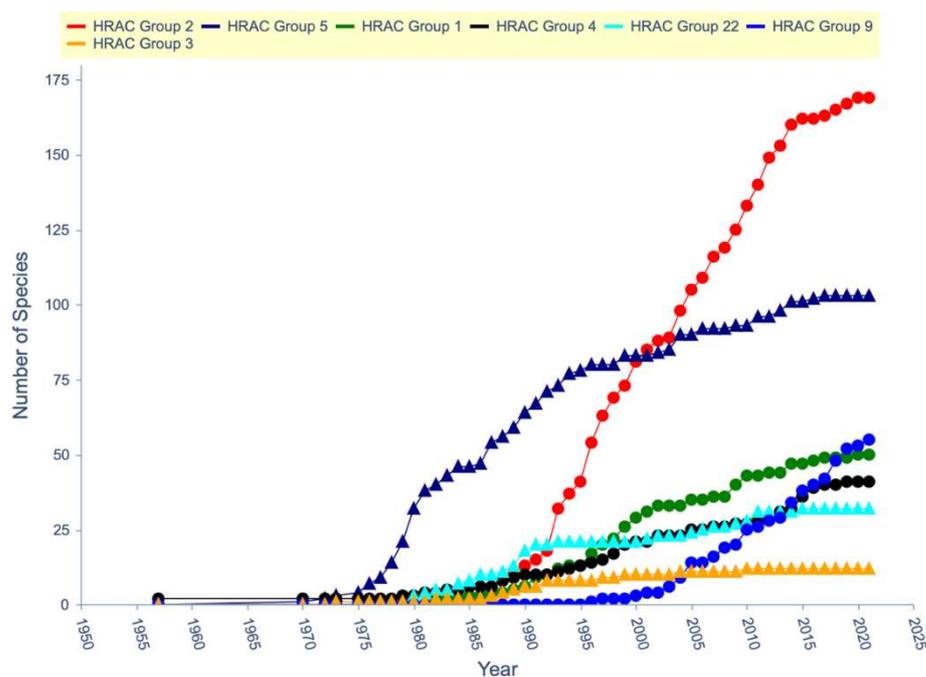


Figure 7 : Familles chimiques des inhibiteurs de l'ALS (groupe HRAC 2/B) (« HRAC Global »)

Résistance aux inhibiteurs de l'ALS

L'utilisation répétée et intensive de ce mode d'action a rapidement conduit à la sélection de mécanismes de résistance chez plusieurs espèces adventices. Le premier cas a été détecté en 1987 chez une espèce de laitue sauvage, *Lactuca serriola* aux États-Unis (Mallory-Smith et al. 1990) en même temps qu'au sein d'une population de *Lolium rigidum* pour laquelle le premier cas de résistance croisée aux inhibiteurs de l'ALS et de l'ACCase a été observé (Heap & Knight 1986). Aujourd'hui, la résistance à ce mode d'action a évolué chez 169 espèces adventices, soit le mode d'action pour lequel le nombre de cas de résistance est le plus élevé au monde (Figure 8 ; Heap 2022). Le tribénuron et l'imazamox (des familles des sulfonylurées et des imidazolinones), deux substances actives utilisées en France, sont respectivement les troisième et quatrième substances actives pour lesquelles le nombre de cas de résistance est le plus élevé (42 et 47 cas décrits, respectivement, Heap 2022). Des mécanismes de RLC et de RNLC sont en cause dans la résistance à ce mode d'action.



©2022 WeedScience.org, Dr. Ian Heap 01/03/2022

Figure 8 : Évolution du nombre d'espèces résistantes aux groupes HRAC 1 à 5, 9 et 22 depuis 1955 (Heap 2022). Les inhibiteurs de l'ALS sont le groupe HRAC 2 (en rouge).

RLC aux inhibiteurs de l'ALS

Huit codons dans le gène ALS ont déjà été identifiés comme impliqués dans la résistance chez des espèces adventices sur le terrain (Tranel et al. 2021) et sept autres ont été identifiés en laboratoire uniquement (Jung et al., 2004) (Figure 9).

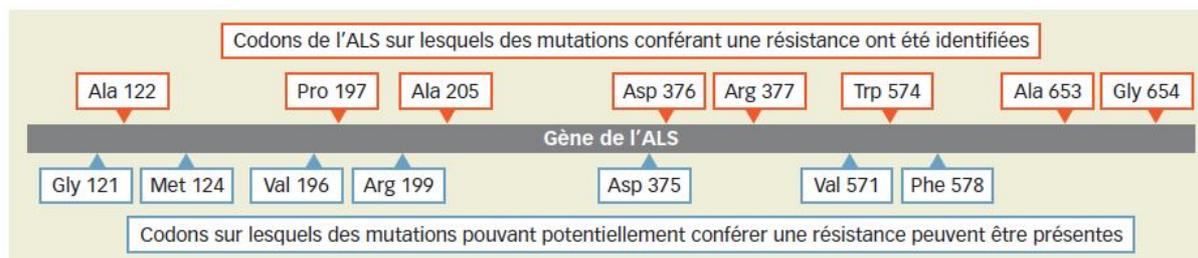


Figure 9 : mutations dans le gène de l'ALS qui confèrent (en rouge) ou peuvent conférer (en bleu) de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS (Loubet et al. 2020)

Les différentes familles chimiques de ce mode d'action (Figure 7) interagissent différemment avec leur cible mais se fixent sur des zones qui se recouvrent spatialement (Yu et Powles 2014). Ainsi, utiliser différentes familles chimiques de ce mode d'action à l'échelle d'une rotation ne permet pas de réduire la pression de sélection et facilite l'apparition de la résistance (Gaines et al. 2020). Alors que la fréquence de mutation générale dans une population adventice est estimée de 10^{-6} à 10^{-8} (Délye 2005 ; Powles et Yu 2010), la fréquence de mutation observée pour le gène de l'ALS est de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} (Gaines et al. 2020). La probabilité de sélectionner rapidement une mutation impliquée dans la RLC sur ce gène est donc plus élevée. Les mutations aux codons 574 et 197 sont les plus fréquentes : elles concernent respectivement 39 et 40 espèces (Heap 2022). En plus du nombre de codons où peut se produire une mutation, il y a également une diversité de substitutions nucléotidiques possibles à un codon donné (11 substitutions répertoriées au codon 197 (Heap 2022)). La résistance croisée à différents herbicides varie en fonction de la mutation (position et substitution), de la famille chimique voir même de l'herbicide au sein d'une famille et de l'espèce (Yu et Powles 2014). Par exemple, au codon 197, la substitution par une alanine confère de la résistance aux sulfonylurées mais pas aux imidazolinones, alors que la substitution par une leucine confère presque toujours (peut varier selon l'espèce) de la résistance à ces deux familles chimiques (Heap 2022). La surexpression du gène de l'ALS est rare (Yu et al. 2007) et parfois associée à une des mutations impliquée dans la RLC (Sen et al. 2021).

RNLC aux inhibiteurs de l'ALS

De nombreux cas de RNLC aux inhibiteurs de l'ALS ont été rapportés pour différentes espèces de monocotylédones (par exemple, *Lolium rigidum* (Torra et al. 2021 ; Han et al. 2021), *Beckmannia syzigachne* (Wang et al. 2021), *Alopecurus myosuroides* (Franco-Ortega et al. 2021)) et quelques dicotylédones (*Myosoton aquaticum* (Bai et al. 2018 ; Liu et al. 2018), *Papaver rhoeas* (Torra et al. 2021 ; Scarabel, Pernin, et Délye 2015), *Amaranthus tuberculatus* (Milani et al. 2021), *Amaranthus hybridus* (Manley et al. 1999), *Amaranthus palmeri* (Nakka et al. 2017), *Sinapsis arvensis* (Jeffers, O'Donovan, et Hall 1996 ; Veldhuis et al. 2000)). Les mécanismes en cause peuvent conférer

de la résistance croisée à d'autres modes d'action (Beckie & Tardif 2012) et coexister avec la RLC (Cao et al. 2021 ; Meyer et al. 2022 ; Yu & Powles 2014b).

Des études de plus en plus nombreuses s'intéressent aux mécanismes moléculaires responsables de la RNLC aux inhibiteurs de l'ALS et la plupart d'entre elles s'accordent sur l'implication de mécanismes de résistance métabolique (Jugulam & Shyam 2019). Plusieurs familles de CYP ont été identifiées comme surexprimées constitutivement ou après traitement chez différentes espèces (par exemple, Wang et al. 2021 ; Yan et al. 2019) et la capacité de certains CYP à détoxifier les inhibiteurs de l'ALS a été validée fonctionnellement (Han et al. 2021). Des gènes appartenant aux familles des GST, à d'autres familles de transférases et des ABC transporteurs ont également été identifiés (Jugulam & Shyam 2019). L'exsudation racinaire de l'imazamox a été rapportée une fois chez *Euphorbia heterophylla*, en complément d'une mutation de cible (Rojano-Delgado et al. 2019).

Variétés rendues tolérantes aux inhibiteurs de l'ALS

Les variétés rendues tolérantes aux herbicides (VrTH) sont des variétés dans lesquelles l'homme a fixé une modification génétique d'intérêt qui leur confère la capacité de survivre à l'application d'un herbicide donné (Tsafaris 1996). Elles sont obtenues par l'exploitation de la variabilité génétique naturelle présente chez l'espèce, par mutagenèse aléatoire ou par introduction d'un gène d'intérêt grâce à des techniques de transgénèse. Le trait d'intérêt est ensuite fixé par rétrocroisement. Des variétés de maïs, blé, riz, chicorée, colza, soja et tournesol rendues tolérantes aux inhibiteurs de l'ALS (imidazolinones et sulfonyles) ont été développées (Tan et al. 2005 ; Streit 2012) dans le but de faciliter le désherbage dans ces cultures grâce au spectre large d'efficacité de ces herbicides. Leur utilisation facilite également le désherbage des adventices qui appartiennent à la même famille botanique que la culture.

En France, des variétés de tournesol rendues tolérantes aux inhibiteurs de l'ALS sont cultivées depuis 2010. Ces variétés représentent depuis 2017, 27% de l'assolement français en tournesol (Anses, 2020). Elles ont été développées à partir des technologies Clearfield®/ClearfieldPlus de BASF (« BASF France division Agro ») et ExpressSun™ de DuPont™ (« Pioneer ») associées aux herbicides Pulsar 40 et Passat Plus (imazamox) et à l'Express SX (tribénuron), respectivement. Les plantes de ces variétés sont porteuses d'une mutation de cible dans le gène de l'ALS qui leur permet de survivre à l'application de la dose recommandée (Gil & Nestares 2019 ; Sala et al. 2012).

La durabilité des systèmes utilisant ces variétés est abondamment débattue dans la littérature en raison des impacts liés à leur possible utilisation non raisonnée (Dessaux, Beckert, et Tibi 2014 ; Goldberg 1992) : simplification des systèmes de culture, augmentation des applications d'herbicides

Synthèse bibliographique

(Bonny 2016), pollution des ressources, baisse de la biodiversité et augmentation du risque de sélectionner des adventices résistantes aux herbicides (Lamichhane et al. 2017 ; Vencill et al. 2012).

Ambrosia artemisiifolia L., biologie, impact sanitaire et agronomique

Taxonomie et morphologie

L'ambrosie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia* L.) (appelée ambrosie par la suite) est une plante herbacée de la famille des Astéracées (*Asteraceae*) du genre *Ambrosia* qui regroupe 51 espèces (« The Plant List »). La plupart des espèces du genre *Ambrosia* sont originaires d'Amérique du Nord (Bassett & Crompton 1975), à l'exception d'*A. maritima* L., originaire de la région méditerranéenne (Triest et al. 1989). En Europe de l'Ouest, quatre espèces envahissantes sont établies : *A. artemisiifolia*, *A. psilostachya*, *A. tenuifolia* et *A. trifida* (Makra et al. 2015), l'ambrosie étant la plus représentée.

Au stade plantule, l'ambrosie présente deux cotylédons arrondis et deux premières feuilles opposées et découpées en 3 à 6 folioles (Figure 10, A). Au stade végétatif, les feuilles d'ambrosie sont très découpées et disposées de manière alterne le long de la tige (Figure 10, B) (Payne, 1963). Adulte, l'ambrosie présente un port buissonnant (Figure 10, C) et peut mesurer jusqu'à 1,5 mètre. C'est une plante monoïque allogame et anémogame (Bassett & Crompton 1975). Les fleurs mâles sont organisées en épi avec à leur base les fleurs femelles (Figure 10, D et E).

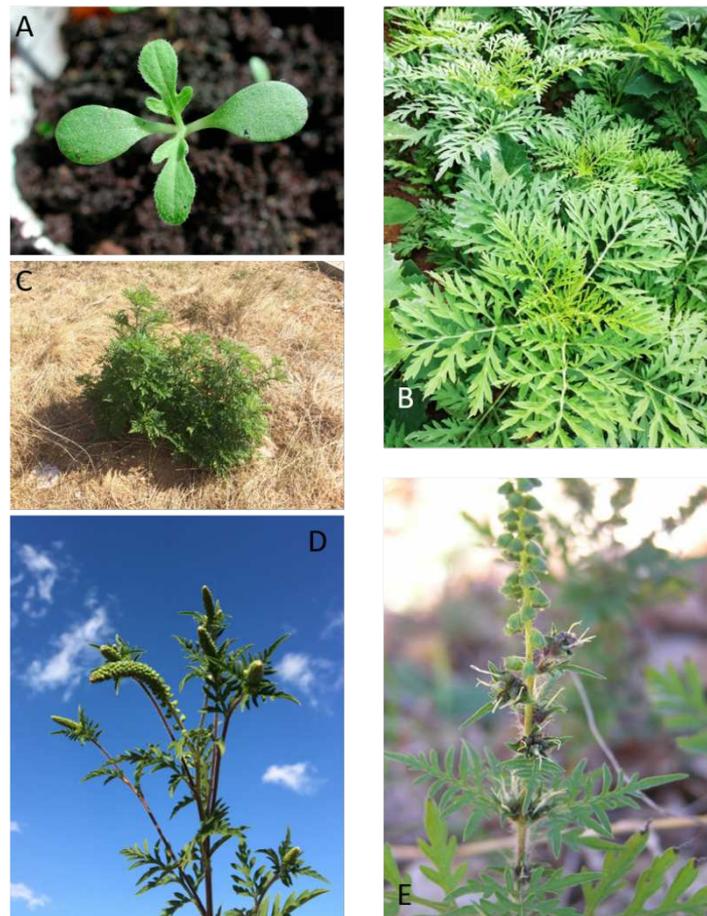


Figure 10 : (A) Plantule d'ambrosie ; (B) et (C) stade végétatif, feuilles découpées et port buissonnant ; (D) inflorescences mâles en épis et fleurs femelles à leur base ; (E) zoom sur les fleurs femelles (source photos : Observatoire des ambrosies, <https://ambrosie-risque.info>)

Cycle de développement

L'ambrosie est une plante estivale annuelle dont la germination s'étend de mars à mai (Figure 11). Elle demeure au stade végétatif jusqu'à la fin de l'été où commence la période de reproduction. Sur un pied, les fleurs mâles apparaissent avant les fleurs femelles, ce qui maximise l'allogamie (Payne 1963). La proportion de fleurs mâles et femelles par plante est dépendante de sa taille et de facteurs environnementaux comme l'accès à la lumière et aux nutriments (Paquin & Aarssen 2004). La production de pollen est maximale en septembre (Figure 11) et varie de 100 millions à 3 milliards de grains de pollen par plante (Fumanal, Chauvel, et Bretagnolle 2007) qui peuvent être disséminés sur de courtes ou longues distances (Clot et al. 2002). La libération du pollen est synchronisée entre les fleurs mâles selon un cycle diurne affecté par l'hygrométrie de l'air (Martin, Chamecki, et Brush 2010). Les semences issues des fleurs femelles sont de poids et de taille variables ce qui favorise leur dispersion dans différents environnements (Guillemin & Chauvel 2011). L'ambrosie est une espèce très prolifique, la production de semences par plante étant de l'ordre du millier mais varie selon la

taille de la plante et l'environnement (Fumanal, Chauvel, et Bretagnolle 2007). Elles restent en dormance durant l'hiver avant leur germination au printemps suivant. L'exposition au froid humide est indispensable pour la germination de la semence (stratification, Willemsen 1975). Les taux de germination sont élevés (77 à 94%) et favorisés par un enfouissement peu profond des semences (Guillemin & Chauvel 2011). Les semences peuvent rester en dormance secondaire pendant des dizaines d'années et présenter des taux de germination encore élevés (85%) 20 ans après leur enfouissement (Baskin et Baskin 1980 ; Lewis 1973).

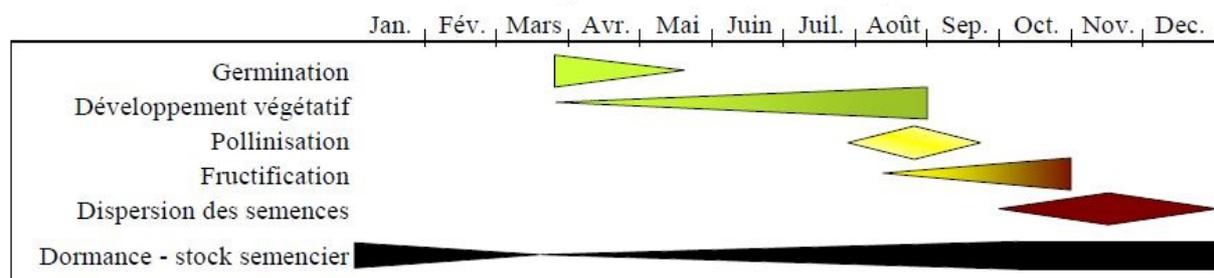


Figure 11 : cycle de développement de l'ambrosie en France (Fumanal et Chauvel 2007)

Espèce allergène

L'ambrosie représente un problème de santé publique majeur en raison de son pollen hautement allergène et allergisant qui est la première cause de rhinite au monde (Bassett et Crompton 1975 ; Makra et al. 2015). L'exposition au pollen d'ambrosie augmente le risque de développer des allergies croisées au pollen d'autres espèces, notamment à d'autres espèces d'Astéracées mais aussi de graminées (Sriramarao et Rao 1993 ; Chen et al. 2018). Une petite quantité de pollen dans l'air suffit à déclencher les symptômes (Tamarcaz et al. 2005). Dans les cas les plus graves, le pollen d'ambrosie peut causer des crises d'asthme. En France, l'Anses estime qu'entre 1 et 3,5 millions de personnes sont allergiques, ce qui représente un coût de prise en charge de 59 à 186 millions d'euros par an (Observatoire des ambrosies, <https://ambrosie-risque.info>). Étant donné l'impact sanitaire de cette espèce, plusieurs pays ont fait de la lutte contre cette espèce une obligation légale (c'est par exemple le cas en Hongrie, en Suisse et en France, loi du 26 janvier 2016 et arrêté du 26 avril 2017).

Une espèce à fort potentiel adaptatif

Depuis son aire d'origine, l'Amérique du Nord, l'ambrosie a été disséminée sur de nombreux continents : en Europe, où elle est classée en 13^{ème} position des 100 pires espèces envahissantes, en Asie, en Australie, en Afrique et en Amérique du Sud (Smith et al. 2013). Les activités anthropiques sont le principal vecteur de dispersion des semences (Essl et al. 2015 ; Kiss et Béres 2006), *via* notamment les engins agricoles à courte et longue distance (Vitalos & Karrer 2009), les échanges de

Synthèse bibliographique

lots de semences contaminés à l'échelle mondiale, le déplacement de gravats à l'échelle d'un territoire. Les routes et les voies fluviales sont également des vecteurs de dispersion (Lemke, Kowarik, et Lippe 2019 ; Fumanal et al. 2007).

Son potentiel invasif est lié à ses caractéristiques écologiques et génétiques. C'est une espèce généraliste capable de se développer dans différents types d'habitats qui ont pour caractéristique commune d'être régulièrement perturbés (Kröel-Dulay et al. 2019) comme les friches, les chantiers et les milieux agricoles. Elle se développe sur une large gamme de texture de sol et de pH (Fumanal et al. 2008) bien qu'elle préfère les sols légèrement acides et sableux (Bassett & Crompton 1975). C'est une espèce peu compétitrice qui se développe de préférence sur des milieux où la compétition est faible et, contrairement à d'autres espèces envahissantes, elle ne modifie pas les communautés déjà en place (Fumanal et al. 2008). La faible structuration génétique observée au sein des populations Européennes montre qu'il existe des flux de gènes importants entre les populations. Ses capacités de dispersion associées à une grande diversité génétique (Chun et al. 2010) confèrent à cette espèce un fort potentiel adaptatif qui lui permet de répondre à différentes pressions de sélection et changements environnementaux (McGoey & Stinchcombe 2021). Une étude récente a également montré que l'adaptation locale de différentes populations d'ambrosie est liée à la sélection positive de gènes pléiotropes (Hämälä et al., 2020).

L'ambrosie a été introduite en France dans le Rhône en 1863 (Chauvel et al. 2006) *via* l'importation de semences contaminées. L'étude de la structure génétique des populations invasives et natives montre que les populations françaises sont issues de multiples introductions au cours du XX^{ème} siècle (Genton, Shykoff, et Giraud 2005 ; Chun et al. 2010). Elle est maintenant largement répartie sur tout le territoire (Figure 12).

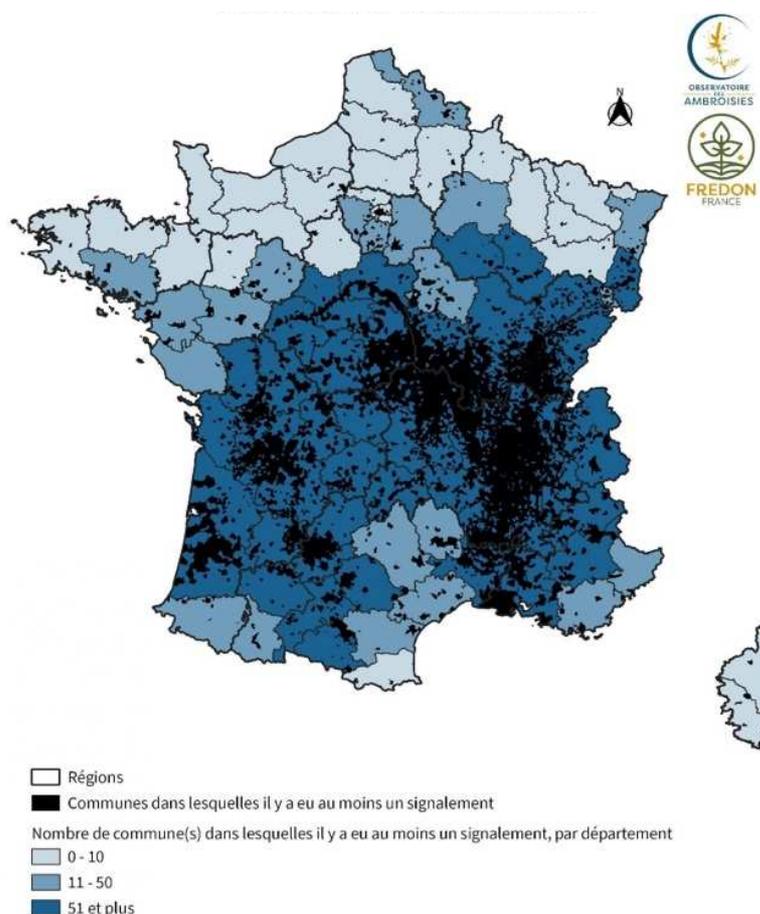


Figure 12 : répartition de l'ambrosie en France en 2020 (Observatoire des ambrosies, <https://ambrosie-risque.info>)

Espèce adventice

En milieu agricole, l'ambrosie se développe dans les cultures d'été (soja, maïs, tournesol) et lors de l'interculture estivale, notamment dans les chaumes des céréales (Mutch et al. 2003). Sa gestion y est essentielle, pour limiter les pertes de rendements liées à la compétition qu'elle exerce pour les ressources avec les cultures, et éviter sa dispersion dans l'environnement, plus de la moitié des semences étant dispersées avant la récolte des cultures d'été (Simard et al. 2020) et pendant l'interculture (Mutch et al. 2003). C'est une adventice problématique dans plusieurs pays, comme en Hongrie où elle est classée comme une des espèces adventices les plus problématiques à l'échelle nationale ou en Russie où elle est classée comme organisme de quarantaine (Smith et al. 2013). Les pertes de rendements liées à la présence de l'ambrosie augmentent avec la densité de plantes présentes par mètre carré. En tournesol, les pertes sont estimées à trois quintaux par hectare par tranche de dix pieds d'ambrosie par mètre carré, les pertes pouvant aller jusqu'au deux tiers de la récolte (Terre inovia 2019). En soja, les pertes peuvent aller jusqu'à 90% en présence de six pieds par mètre carré d'ambrosie (Barnes et al. 2017). En maïs, elles peuvent atteindre 80% (Weaver 2001). Différentes méthodes prophylactiques sont mises en place pour éliminer l'ambrosie, axées sur des

méthodes de lutte mécaniques ou chimiques, les deux pouvant être associées, l'utilisation de couverts (Smith et al. 2013) et la diversification des rotations permettant de casser son cycle de développement. Des méthodes de lutte biologique sont également à l'étude (Moultet et al. 2018). L'efficacité de la lutte mécanique seule peut aller jusqu'à 90% lorsque les différents outils sont utilisés au bon moment (Weill et al. 2007). Sa levée étant relativement précoce au printemps, un travail du sol avant le semis de la culture permet de restreindre significativement son impact sur la culture suivante (Barnes et al. 2017). Une fois que la culture est en place, des opérations de binage permettent de réduire efficacement la taille des populations d'ambrosie. Le fauchage, s'il est effectué, doit être régulier, car des études montrent que l'ambrosie est capable de reprendre et de terminer son cycle de développement après avoir été fauchée (Gard et al. 2013 ; Karrer & Pixner 2012). Le désherbage chimique est une solution efficace pour contrôler l'ambrosie au début de son développement (Bohren et al. 2007). Plusieurs solutions existent et présentent une efficacité modérée à bonne, les groupes HRAC 2 (inhibiteurs de l'ALS, appliqués en post-levée) et 9 (glyphosate, qui peut être utilisé pendant l'interculture) étant les plus utilisés. Le contrôle chimique de l'ambrosie dans le tournesol est particulièrement difficile puisque ces deux espèces appartiennent à la même famille botanique. Le recours à des variétés rendues tolérantes aux herbicides permet d'assurer un contrôle efficace de l'ambrosie dans cette culture (Kömives, Reisinger, et Bittsanszky 2016 ; Kukorelli et al. 2011; Reisinger et al. 2014). En Europe et en France, ces variétés sont majoritairement présentes dans des zones très infestées par l'ambrosie (Anses, 2020). L'utilisation des herbicides doit être intégrée dans un programme de gestion des adventices diversifié, qui combine différentes méthodes prophylactiques et plusieurs modes d'actions, sans quoi le risque de sélectionner des mécanismes de résistance est élevé.

Résistance aux herbicides de l'ambrosie dans le monde et en France

Le premier cas de résistance aux herbicides pour l'ambrosie a été signalé en 1976 au Canada pour l'atrazine (Heap 2022). La base de données (Heap 2022) recense aujourd'hui 40 signalements de cas de résistance chez cette espèce pour les groupes HRAC 2, 5, 7, 9 et 14 ainsi que des cas de résistance pour deux à trois sites d'actions dans une même population, les cas les plus fréquents étant pour les groupes 2 (inhibiteurs de l'ALS) et 9 (inhibiteur de l'EPSPS : glyphosate).

Les cas de résistance publiés se situent aux États-Unis, au Canada et en Hongrie et sont majoritairement liés à des mécanismes de RLC, lorsque les mécanismes ont été recherchés. La RLC concerne la résistance aux inhibiteurs de l'ALS (Patzoldt et al. 2001 ; Rousonelos et al. 2012 ; Zheng, Patzoldt, et Tranel 2005 ; Tranel et Wright 2002 ; Kutasy et al. 2021), où une mutation au codon 574 du gène de l'ALS a été détectée, aux inhibiteurs du photosystème II (Cseh, Cernák, et Taller 2009 ;

Synthèse bibliographique

Simard et al. 2017 ; Kutasy et al. 2021), aux inhibiteurs de l'EPSP synthase (Parrish 2015) et aux inhibiteurs de la PPO (Rousonelos et al. 2012). Des mécanismes de RNLC sont suspectés pour les inhibiteurs de l'EPSP synthase et une étude montre une différence dans l'absorption du glyphosate entre des individus résistants et sensibles à cet herbicide (Ganie et al. 2017). Dans sa thèse, J. Parrish (2015) révèle un taux de polymorphisme élevé dans le gène de l'EPSPS et montre qu'une grande diversité de mécanismes de résistance au glyphosate a évolué au niveau d'une population et au niveau individuel permettant à l'ambrosie de mobiliser différentes stratégies pour répondre à la pression de sélection. La RNLC a également été détectée comme le mécanisme en cause dans une population résistante au linuron (inhibiteur du photosystème II) (Laforest et al. 2022; Simard et al. 2017).

En France, en raison de l'introduction des variétés de tournesol rendues tolérantes aux inhibiteurs de l'ALS, la résistance de l'ambrosie à ce mode d'action est surveillée depuis 2013 dans le cadre de la surveillance biologique du territoire (SBT) qui dépend du plan Écophyto II et grâce au projet ENI-VTH piloté par l'INRAE (2017 à 2019, « effets non-intentionnels associés à l'utilisation des variétés de tournesol tolérantes aux herbicides : impact sur les pratiques, la flore adventice et les populations d'ambrosies, proposition de nouveaux outils de surveillance et de gestion »). La SBT a pour objectif de « s'assurer de l'état sanitaire et phytosanitaire des végétaux et de suivre l'apparition des effets non intentionnels des pratiques agricoles sur l'environnement ». Dans ce cadre, la surveillance de l'apparition de résistance comme effet non intentionnel de l'utilisation de pesticides est réalisée annuellement. Le projet ENI-VTH avait pour objectif la surveillance des effets non intentionnels liés à la mise en place de cultures de Variétés rendues Tolérantes aux Herbicides (VrTH) de tournesol. Dans le cadre de ces deux projets, des semences et des feuilles d'ambrosie ont été récoltées en France dans le but d'évaluer la présence potentielle de résistances dans des zones à risque. Des relevés de flore ont également été réalisés sur des parcelles et en bordure des parcelles de tournesol VrTH, conventionnelles et biologiques dans le but d'évaluer l'effet des VrTH sur la biodiversité. Une enquête sur les pratiques appliquées par les agriculteurs a également été réalisée. Les résultats indiquent que les parcelles en VrTH sont soumises à une pression herbicide plus élevée que les parcelles conventionnelles (en raison d'une plus forte infestation) et que ces cultures sont souvent insérées dans des rotations plus courtes (Fried et al. 2022). Ces deux facteurs favorisent l'apparition de résistance.

Les premiers travaux de caractérisation biologique et moléculaire de la résistance de l'ambrosie ont été menés dans le cadre d'une thèse antérieure (Meyer, 2018). Dans ce travail, le premier cas de résistance en France a été détecté en 2013 sur une parcelle de monoculture de soja depuis quatre ans dans le Tarn et Garonne. Pour cette population, le séquençage du gène de l'ALS a permis d'identifier une mutation au codon 205 chez des plantes résistantes au tribénuron et à l'imazamox, les deux substances actives des inhibiteurs de l'ALS appliqués en France sur les VrTH de

Synthèse bibliographique

tourne-sol. De plus, des plantes résistantes par RLC et/ou RNLC ont été détectées sur la base de l'observation des phénotypes des plantes porteuses ou non de cette mutation. Deux autres cas ont par la suite été détectés pour lesquels la RNLC a été identifiée comme le seul mécanisme impliqué (Meyer, 2018). Des expériences de sélection récurrente ont également démontré que l'évolution de la RNLC par accumulation d'allèles de résistance est possible pour l'ambrosie (Meyer et al. 2022). Enfin, le transcriptome de l'ambrosie a été assemblé *de novo* dans le but de rechercher les déterminants génétiques de la RNLC dans une population d'ambrosie résistante à l'imazamox. Cette expérimentation a permis de présélectionner une soixantaine de gènes candidats pour cette population et dont la validation n'a pas pu être réalisée. C'est dans la continuité de ce travail que s'inscrit ce nouveau travail de thèse.

Objectifs de la thèse

L'évolution de la résistance au sein des populations d'ambrosie vis-à-vis des inhibiteurs de l'ALS en France menace l'efficacité de ces herbicides pour le contrôle de cette adventice allergène et allergisante. La RNLC étant en partie impliquée, l'efficacité d'autres modes d'action est menacée en raison des phénomènes potentiels de résistance croisée qu'ils peuvent engendrer. La détection précoce et à grande échelle de la résistance est donc cruciale pour éviter que celle-ci ne se disperse et ne se généralise sur le territoire.

Dans ce travail de thèse, notre objectif est d'**identifier les déterminismes génétiques de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS ayant évolué chez l'ambrosie sur le territoire français**. Dans ce but, nous avons cherché à :

- **Caractériser les mécanismes de résistance, leur prévalence et leurs modalités d'évolution sur l'ensemble du territoire.**
- **Identifier les mécanismes moléculaires constitutifs et/ou induits à la base de la résistance non liée à la cible, ceux-ci étant inconnus pour l'ambrosie.**
- **Identifier des marqueurs moléculaires dont la présence est corrélée à la résistance non liée à la cible.**

D'un point de vue appliqué, l'identification des déterminismes génétiques de la RNLC, ou de marqueurs qui lui sont associés, pourrait avoir une application directe sur le terrain, à savoir le développement d'un outil de diagnostic reposant sur leur détection grâce aux techniques de séquençage « haut-débit ». Ces dernières sont déjà utilisées avec succès pour la détection haut-débit, à grande échelle et même à faible fréquence de la RLC.

La première partie de ce manuscrit répond au premier sous-objectif de la thèse et est constituée d'un chapitre (**Chapitre 1**) ayant fait l'objet d'une publication dans *Scientific Report* (Loubet et al. 2021). Grâce à un échantillonnage de différentes populations d'ambrosie sur l'ensemble du territoire et la réalisation de tests herbicides couplés au séquençage du gène de l'ALS, nous avons évalué la distribution de la résistance sur le territoire, son « intensité » et la prévalence des mécanismes de RLC et RNLC à l'échelle nationale. L'utilisation des techniques de séquençage « haut-débit » sur un échantillonnage conséquent de populations d'ambrosie a permis de caractériser l'état d'évolution de la RLC à l'échelle nationale. Enfin, ces données nous ont permis de caractériser les modalités d'évolution de la RLC sur le territoire français.

La seconde partie de ce manuscrit répond aux deux autres sous-objectifs de la thèse. **Notre travail s'est appuyé sur le transcriptome de l'ambrosie et l'hypothèse que des gènes ou des marqueurs de la RNLC se différencient par leur niveau d'expression et/ou des polymorphismes de séquence entre plantes résistantes et sensibles.**

Ainsi, dans le **Chapitre 2** nous avons cherché à identifier des gènes différemment exprimés de manière constitutive et/ou induite entre plantes résistantes et sensibles provenant de six populations prélevées sur le terrain. Cette recherche a été permise par le séquençage du transcriptome de différents individus provenant de ces populations. Les six populations choisies proviennent de différentes régions de France et présentent un spectre de résistance différent pour les deux herbicides utilisés en France, l'imazamox et le tribénuron. Ainsi, cet échantillonnage a été choisi pour couvrir au maximum la diversité des mécanismes qui ont pu évoluer sur le territoire. Les gènes candidats ainsi identifiés ont été évalués comme marqueurs de la RNLC sur la base de leur niveau d'expression chez les plantes résistantes et sensibles. Ce chapitre fera l'objet d'une publication scientifique ultérieure après traduction en anglais.

Dans le **Chapitre 3**, nous avons cherché à identifier des variants de séquence dont la présence est corrélée à la RNLC. Pour cela, nous avons réalisé une étude d'association entre les polymorphismes de séquence identifiés sur le transcriptome des six populations étudiées dans le **Chapitre 2** et le phénotype des plantes vis-à-vis de la résistance.

Première partie : Résistance de
l'ambrosie aux inhibiteurs de l'ALS :
mécanismes en cause et modalités
d'évolution

Chapitre 1

Ce chapitre a fait l'objet d'une publication dans la revue *Scientific Reports* (Loubet et al. 2021)



OPEN

A high diversity of mechanisms endows ALS-inhibiting herbicide resistance in the invasive common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.)

Ingvild Loubet^{1,2}, Laëticia Caddoux², Séverine Fontaine², Séverine Michel¹, Fanny Pernin¹, Benoit Barrès², Valérie Le Corre¹ & Christophe Délye¹✉

Ambrosia artemisiifolia L. (common ragweed) is a globally invasive, allergenic, troublesome arable weed. ALS-inhibiting herbicides are broadly used in Europe to control ragweed in agricultural fields. Recently, ineffective treatments were reported in France. Target site resistance (TSR), the only resistance mechanism described so far for ragweed, was sought using high-throughput genotyping-by-sequencing in 213 field populations randomly sampled based on ragweed presence. Additionally, non-target site resistance (NTSR) was sought and its prevalence compared with that of TSR in 43 additional field populations where ALS inhibitor failure was reported, using herbicide sensitivity bioassay coupled with ALS gene Sanger sequencing. Resistance was identified in 46 populations and multiple, independent resistance evolution demonstrated across France. We revealed an unsuspected diversity of ALS alleles underlying resistance (9 amino-acid substitutions involved in TSR detected across 24 populations). Remarkably, NTSR was ragweed major type of resistance to ALS inhibitors. NTSR was present in 70.5% of the resistant plants and 74.1% of the fields harbouring resistance. A variety of NTSR mechanisms endowing different resistance patterns evolved across populations. Our study provides novel data on ragweed resistance to herbicides, and emphasises that local resistance management is as important as mitigating gene flow from populations where resistance has arisen.

Among crop pests, weeds are the leading causes for row crop yield losses in agriculture¹. The use of synthetic herbicides to control weeds since the middle of the twentieth century contributed to increase global crop yields. However, following the intensive use of herbicides to control weeds, a number of weed species evolved mechanisms allowing them to survive and successfully reproduce in treated fields. Herbicide resistance can be defined as the natural, inheritable ability of mutant weed genotypes to survive herbicide concentrations that kill or inhibit the development of wild-type genotypes of the same species (sensitive genotypes), and/or as the outcome of the adaptive evolution of weeds as a result of selection for reduced sensitivity under herbicide selective pressure². The efficacy of herbicides is now threatened by the widespread evolution of resistance. To date, resistance has been reported in 263 weed species worldwide and to 23 of the 26 known herbicides modes of action³. The mechanisms underlying herbicide resistance can be classified into two main categories: target site resistance (TSR) and non-target site resistance (NTSR)^{4,5}. TSR can be caused by mutation(s) at the gene encoding the target protein of the herbicide, resulting in a modification of the protein structure that reduces herbicide binding. TSR can also be due to an increase in the amount of the herbicide target (gene amplification and/or over-expression). TSR is generally under monogenic control, although there are a few exceptions⁵. By contrast, NTSR is endowed by quantitative and/or qualitative change(s) in the weed secondary metabolism that leads to a reduction in the quantity of active herbicide molecules reaching their target site (e.g. excretion, sequestration, exacerbated metabolism). NTSR is generally considered a complex, polygenic adaptation to herbicide selective pressure that involves large genes families^{4,5}.

A diversity of mechanisms is involved in TSR or in NTSR. The amino-acid changes involved in TSR must allow the mutant herbicide target to retain its physiological activity. Thus, a relatively limited set of amino-acid replacements is observed across weed species for a given herbicide target^{3,6}. Furthermore, different amino-acid substitutions at a given herbicide target are not always functionally redundant and can confer resistance to different sets of herbicide molecules acting at this target⁷. NTSR is most often a quantitative trait. It is considered

¹UMR Agroécologie, INRAE, Dijon, France. ²USC CASPER, Anses, INRAE, Université de Lyon, Lyon, France. ✉email: christophe.delye@inrae.fr

to evolve gradually from standing genetic variation by the accumulation of small-effect alleles⁴. Due to this quantitative nature, it is likely that a number of allelic combinations can cause NSTR to a given herbicide. On the other hand, it has been demonstrated that one given NSTR mechanism can cause resistance to herbicides with different targets⁸. At the level of one individual weed plant, herbicide resistance can be caused by one or by several TSR and/or NTSR alleles. As a diversity of such alleles exist, the evolution of herbicide resistance in weed species is most often a complex process, and the evolutionary trajectory of a weed population will depend on the resistance mechanism(s) selected. Furthermore, multiple, independent evolution across populations is likely^{9,10}. Yet, few studies so far have explored the diversity of resistance mechanisms within a species on a large geographical scale⁴.

Common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) is one of the most troublesome weeds worldwide. This annual plant from the *Asteracea* family is native from North America¹¹, but has spread worldwide, mostly by human mediated seed dispersal¹². Common ragweed is currently considered as a major weed in agricultural fields, competing with crops for light, water and soil nutrients. It particularly impacts summer crops such as maize, soybean and sunflower^{13,14}. Moreover, common ragweed is also a major concern for public health. Its highly allergenic pollen is one of the most important cause of hay fever globally¹⁵. In agricultural fields, common ragweed is mainly controlled by herbicide applications. As a result, resistance to herbicides targeting photosystem II, protoporphyrinogen oxidase, 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase and/or acetolactate-synthase (ALS) has been reported in this species in its native range (the United States and Canada³).

Common ragweed has been introduced in France in 1863¹⁶. It is currently a growing concern in agriculture, with especially high levels of infestation in sunflower and in soybean. Sunflower cultivars resistant to the ALS-inhibiting herbicides tribenuron or imazamox have been marketed to control weeds difficult to control in “conventional” sunflower cultivars, including ragweed¹⁷. Imazamox is also used for common ragweed control in soybean. Both herbicides provide efficient ragweed control. Yet, a decrease in their efficacy has recently been reported in highly infested areas, arising the suspicion of the occurrence of resistance to ALS inhibitors. TSR is a frequent and widespread cause of resistance to ALS inhibitors, especially in broadleaf weeds^{18,19}. Indeed, TSR to ALS inhibitors endowed by an ALS allele carrying a Trp574Leu substitution observed in the USA is the only mechanism of resistance identified to date in common ragweed^{20–22}.

Managing or mitigating herbicide resistance requires understanding its modalities of evolution, and identifying the mechanisms involved. Here, we investigated the occurrence of resistance to ALS inhibitors in French common ragweed populations. In a first step, we used a high-throughput genotyping-by-sequencing approach (Pool-seq) to seek TSR to ALS inhibitors in a massive and national-scale sampling of ragweed populations. In a second step, we investigated the presence of resistance, whatever the underlying mechanism, using herbicide sensitivity bioassays, and compared the respective prevalence of TSR and NTSR mechanisms. The cross-resistance pattern associated to the two major TSR ALS alleles identified in common ragweed was established. In addition, we examined the patterns of resistance evolution among populations.

Results

Detection of nine amino-acid substitutions at the ALS gene in French common ragweed populations. Overall, nine nucleotide substitutions causing nine amino-acid changes within the ALS protein were detected in the two ragweed population samplings analysed in this study. Three substitutions occurred at codon 197, two at codon 205, two at codon 574, one at codon 376 and one at codon 578.

A random sampling including a total of 213 common ragweed populations collected in areas in France where ragweed is frequently observed in agricultural fields was analysed using Illumina Pool-seq. We detected five amino-acid substitutions at a total of four codons involved or potentially involved in TSR to ALS inhibitors in 15 populations distributed among all sampled regions (Table 1; Fig. 1). Two different substitutions at codon 197 (Pro197Gln and Pro197Ser) were each detected in one population, in a frequency of 1.0 and 2.4% respectively (Table 1). A Trp574Arg substitution was detected in low frequencies (1.6% and 2.1%) in two neighbouring populations. An Ala205Thr substitution was detected in eight populations in frequencies ranging from 1.2 to 11.5%. Seven of these populations formed a geographical cluster. Last, a Phe578Ile substitution was detected in three clustered populations in frequencies ranging from 1.1 to 4.9%. Overall, the frequencies of the mutant ALS alleles in each population were low, with values < 5% in 12 of the 15 populations where such alleles were detected, and a maximum value of 11.5%.

The random sampling was completed by a targeted sampling including 43 additional common ragweed populations collected in fields where treatment failures had been reported, and therefore occurrence of resistance could be suspected. All populations were subjected to ALS inhibitor sensitivity bioassays. Sanger sequencing of the ALS gene in the resistant plants identified by these bioassays detected a total of five amino-acid substitutions at four codons involved in TSR to ALS inhibitors (Table 2; Fig. 1). The Ala205Thr substitution detected in the random survey was also found in a geographical cluster of three populations. Four additional substitutions were identified in six populations. An Ala205Val substitution was detected in a geographical cluster of three populations. A Pro197Thr, an Asp376Glu and a Trp574Leu substitution were each detected in one population.

Phylogenetic analysis of mutant ALS alleles. The DNA sequences of all mutant ALS alleles detected in at least two populations (i.e., Thr205, Val205, Arg574 and Ile578) were aligned and a haplotype network established on the basis of the nucleotide polymorphisms observed (Fig. 2). The Val205, the Arg574 and the Ile578 haplotypes had one single evolutionary origin each. These haplotypes had been detected in populations clustered within relatively small regions (Fig. 1). The maximum distance as the crow flies between two populations in our sampling harbouring these haplotypes were 37 km, 18 km and 15 km for the Val205, Arg574 and Ile578 haplotype, respectively. Two different evolutionary origins corresponding to two distinct geographical areas were

Population code	Mutant ALS allele detected	Mutant ALS allele frequency (%)
OCC20	Gln197	1.0
ARA9	Ser197	2.4
OCC14	Thr205	11.5
OCC16	Thr205	5.6
OCC17	Thr205	5.7
OCC21	Thr205	2.0
OCC22	Thr205	1.2
OCC23	Thr205	1.7
OCC24	Thr205	1.1
CVL6	Thr205	4.1
OCC18	Arg574	2.1
OCC19	Arg574	1.6
NAQ10	Ile578	1.1
NAQ11	Ile578	1.4
NAQ12	Ile578	4.9

Table 1. Mutant ALS alleles detected by Illumina Pool-seq and their estimated within-population frequencies in a random sampling of 213 populations. Only populations where mutant alleles were detected are listed in this table.

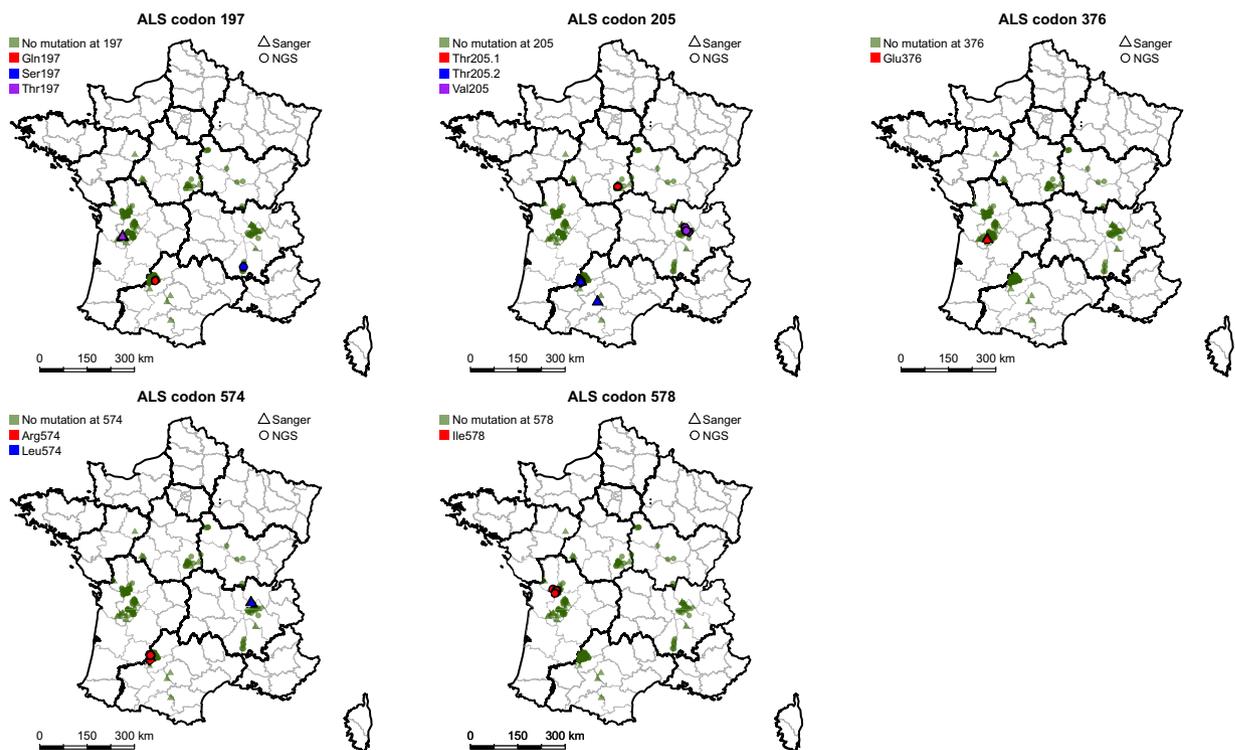


Figure 1. Geographical distribution of the nine mutant ALS alleles identified in this study among common ragweed populations. The results obtained by Pool-seq analysis of the random sampling of 213 populations and by Sanger sequencing of resistant plants from the targeted sampling of 43 additional populations are illustrated together. Green dots, populations where no allele mutant at the considered codon was detected. Coloured dots, populations where mutant ALS alleles were detected by pool-seq. Coloured triangles, populations where mutant ALS alleles were detected by Sanger sequencing. Maps generated using R software (v4.1.0, packages rgdal, rgeos and mapplots).

Population code	Imazamox				Tribenuron			
	% Resistant plants	% Resistant plants sequenced	Mutation detected	% Mutant, resistant plants	% Resistant plants	% Resistant plants sequenced	Mutation detected	% Mutant, resistant plants
ARA2	10	100	0		0			
ARA3	3	100	Leu574	100	NA			
NAQ4	3	100	0		0			
OCC4	3	100	0		0			
OCC5	3	100	Thr205	100	0			
ARA4	0				15	50	0	
CVL2	0				8	100	0	
CVL3	0				5	50	0	
CVL4	0				8	33	0	
CVL5	0				13	100	0	
NAQ10	0				10	100	Thr197	25
NAQ5	0				5	50	0	
NAQ6	0				16	100	0	
NAQ7	0				15	100	0	
NAQ8	0				43	100	0	
NAQ9	0				18	71	0	
OCC6	0				5	100	0	
OCC7	0				3	100	0	
OCC8	0				3	0	NA	
OCC9	NA				25	0	NA	
ARA5	70	20	Val205	100	70	25	Val205	100
ARA6	5	100	Val205	100	33	77	Val205	33
ARA7	65	20	Val205	100	58	9	Val205	100
ARA8	3	100	0		15	100	0	
NAQ11	3	100	0		03	100	0	
NAQ12	3	100	0		10	100	0	
NAQ13	3	100	Glu376	100	3	0	NA	
OCC10	16	100	Thr205	100	5	0	NA	
OCC11	3	100	0		5	100	Thr205	50
OCC12	5	100	0		5	100	0	
OCC13	5	100	0		10	100	0	

Table 2. Occurrence and frequencies of imazamox-resistant plants and of tribenuron-resistant plants in the 31 populations from the targeted sampling (43 populations in total) where at least one resistant plant was detected by herbicide sensitivity bioassays. Mutant ALS alleles were sought in resistant plants by Sanger sequencing. Populations are grouped according to the presence of resistance to imazamox only, to tribenuron only, or to both herbicides. NA not assayed.

observed for the Thr205 alleles. Haplotype Thr205.1 was detected in one single population located 327 km apart from the nearest sampled population harbouring a Thr205 allele. The 11 remaining populations all contained a second haplotype (Thr205.2). Of these populations, 10 were clustered within a 10 km radius. The last one was located 83 km apart from the nearest population in the cluster harbouring allele Thr205.2.

Resistance to the ALS inhibitors tribenuron and imazamox in common ragweed populations.

The 43 populations in the targeted sampling were collected on the basis of a suspicion for resistance and assayed for sensitivity to the herbicides imazamox and tribenuron. Resistant plants were identified with at least one of the two herbicides assayed in 31 of the 43 populations. Only imazamox-resistant plants were detected in five populations (four populations tested with both herbicides and one with imazamox only), in frequencies ranging from 3 to 10% (Table 2). Conversely, only tribenuron-resistant plants were detected in 15 populations (14 tested with both herbicides and one with tribenuron only), in frequencies ranging from 3 to 28% (Table 2). Both imazamox-resistant plants and tribenuron-resistant plants were detected in 11 populations, in frequencies ranging from 3 to 10%. In the remaining 12 populations, no plants resistant to the herbicide(s) assayed were detected (seven populations were tested with both herbicides, four with imazamox only and one with tribenuron only) (Fig. 3).

Mechanisms underlying resistance: TSR. As detailed above and in Table 2, five mutant ALS alleles were detected in resistant plants in nine out of the 31 populations of the targeted sampling where resistance was

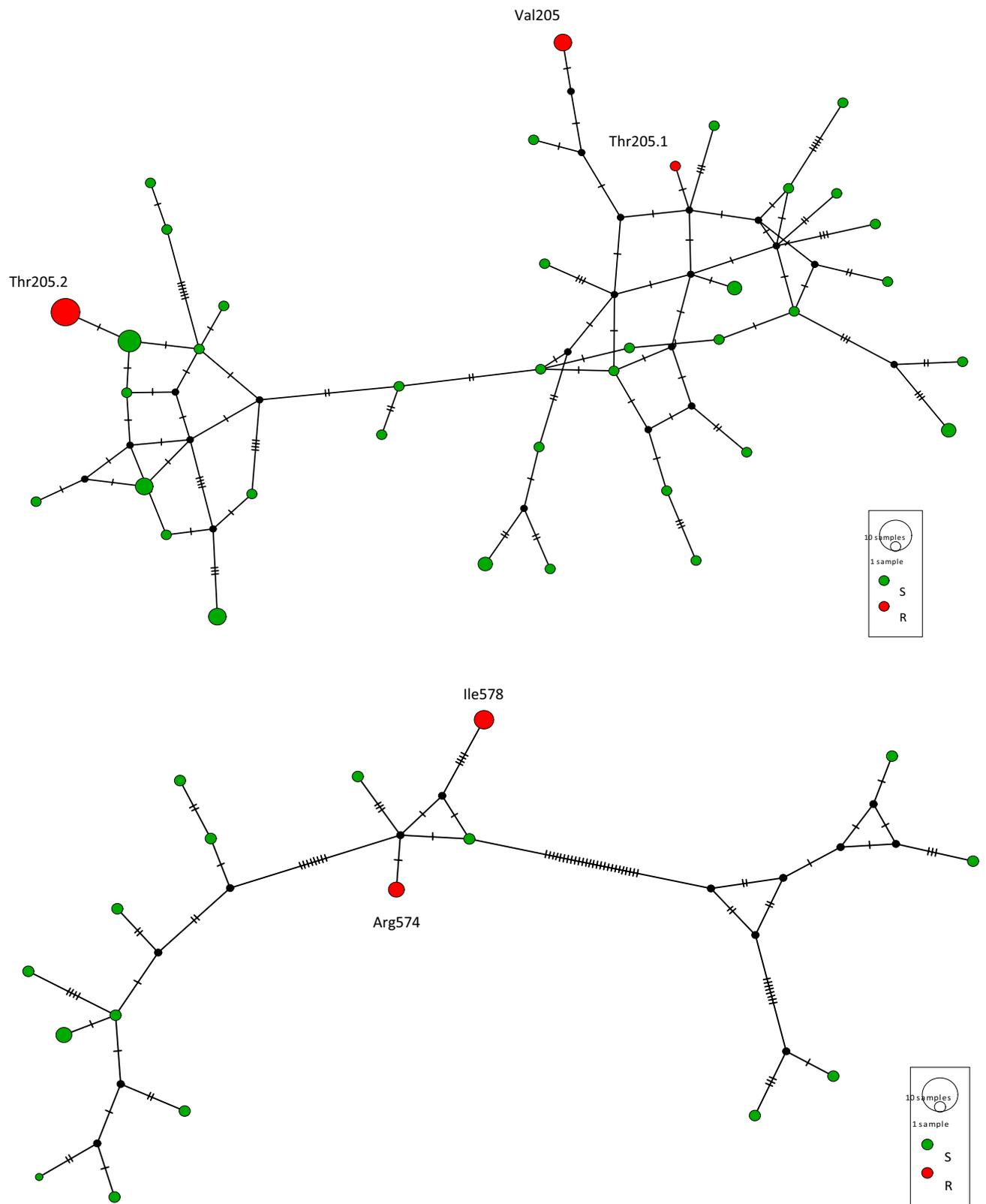


Figure 2. Haplotype network of the ALS haplotypes carrying a mutation at codon 205 (top), 574 or 578 (bottom) (red discs). Green discs, wild-type haplotypes (not carrying a mutation involved in herbicide resistance).

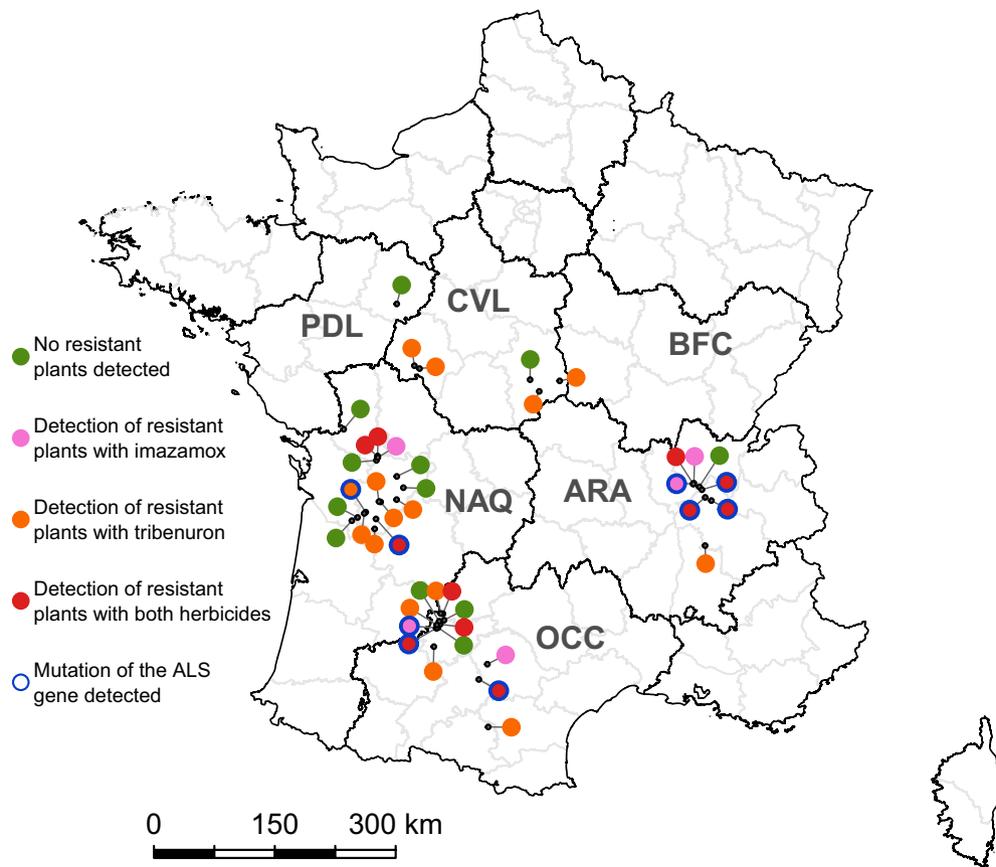


Figure 3. Occurrence of resistance to imazamox, tribenuron and both herbicides in the targeted sampling of 43 common ragweed populations. The presence or absence of resistant plants is indicated by coloured dots. The small grey dot connected to each coloured dot indicates the precise location of the corresponding population. French Région names are coded as follows: ARA, Auvergne Rhône-Alpes; BFC, Bourgogne Franche-Comté; CVL, Centre Val-de-Loire; NAQ, Nouvelle Aquitaine; OCC, Occitanie; PDL, Pays de la Loire. Map generated using R software (v4.1.0, packages rgdal, rgeos and mapplots).

observed. The resistance phenotype conferred by the two most commonly detected Val205 and Thr205 alleles was confirmed by conducting a combined genotyping-and-phenotyping approach on four populations. The results are summarised in Table 3. In all four populations tested, all homozygous wild-type plants were sensitive to imazamox and tribenuron. All plants with at least one mutant allele were resistant to both herbicides. Overall, Fisher's exact test showed a clear association of the genotype at ALS with resistance (p value = 1.8×10^{-61}).

The remaining three mutant ALS alleles observed in the targeted population sampling could not be characterised as thoroughly as the Thr250 and Val205 alleles, because of their low frequencies (Table 2). All these alleles were observed in one single population each (Table 2). The Thr197 allele was observed in the heterozygous state in one single tribenuron-resistant plant in population NAQ10. The Glu376 allele was detected in the heterozygous state in the only plant resistant to imazamox sequenced in population NAQ13. The Leu574 allele was observed in the only imazamox-resistant plant identified in population ARA3. Plants from this population could not be assayed with tribenuron, due to poor seed germination.

Mechanisms underlying resistance: NTSR. Overall, the ALS gene was sequenced in 122 resistant plants from 31 populations, and mutant ALS alleles were identified in 36 plants from nine populations (Table 2). The 11 other resistant plants in these nine populations did not carry any mutant ALS allele. No resistant plant carrying a mutant ALS allele was detected in the remaining 22 populations where resistance was observed.

To confirm that no TSR mechanism was at play in the resistant plants carrying wild-type ALS alleles, ALS expression was compared between resistant plants and sensitive plants in four populations where no mutant ALS allele was detected. ALS expression was not significantly different between resistant and sensitive plants in any of the four populations analysed (Supplementary Figure S1). TSR due to ALS gene overexpression was thus not the mechanism involved in resistance in these plants (Table 2).

To sum up, the presence of NTSR (that is, occurrence of resistant plants not carrying TSR mechanisms) was established in 23 of the 31 populations where resistance was identified (Table 2); three populations where resistance to imazamox only was detected, 13 populations where resistance to tribenuron only was detected, and

Population code	Genotype	Phenotype			
		Number of imazamox-resistant plants	Number of imazamox-sensitive plants	Number of tribenuron-resistant plants	Number of tribenuron-sensitive plants
ARA5	Ala/Ala205	0	9	0	17
	Val/Val205	9	0	7	0
	Ala/Val205	22	0	16	0
ARA7	Ala/Ala205	0	18	NA	NA
	Val/Val205	7	0	NA	NA
	Ala/Val205	15	0	NA	NA
OCC10-bulk1	Ala/Ala205	0	2	0	6
	Thr/Thr205	18	0	14	0
	Ala/Thr205	20	0	19	0
OCC10-bulk2	Ala/Ala205	0	5	0	9
	Thr/Thr205	11	0	16	0
	Ala/Thr205	23	0	15	0

Table 3. Genotype at ALS codon 205 and sensitivity to imazamox or tribenuron of common ragweed. Forty plants were assayed per population and per herbicide. *NA* not assayed.

seven populations with resistance to both herbicides was detected. Over all populations, NTSR mechanisms were estimated to underly resistance in 70.5% of the resistant ragweed plants (95% confidence interval 0.61–0.78).

Discussion

This is the first national-scale study investigating the occurrence of herbicide resistance in the major weed common ragweed and elucidating the diversity of mechanisms at the root of this resistance. Our study confirmed for the first time the occurrence of resistance to the ALS inhibitors imazamox and tribenuron in common ragweed in France. Resistance was present in several foci scattered across the regions investigated. Resistance was likely emerging in most of the populations where it was detected, with frequencies of resistant plants observed in bioassays in and around a few percent. However, resistance was much more firmly established in a few locations (33–70% resistant plants in three populations in Auvergne Rhône-Alpes, and 43% in one population in Nouvelle Aquitaine). While these rates do not reach those observed in Canada where resistance to ALS inhibitors is widespread and frequent (81% and 100% of ragweed populations uncontrolled by these herbicides in Quebec and in Ontario, respectively, contain substantial frequencies of resistant plants^{23,24}), the emergence of resistance observed in our study could herald the beginning of a broad-scale resistance selection if the use of ALS inhibitors is maintained, or even increased to compensate for the decrease in efficacy caused by resistance. Thus, ragweed resistance to ALS inhibitors in France has now become an issue. In areas where common ragweed is widespread and frequent, most applications of ALS inhibitors specifically targeting this weed have been, and still are, performed in sunflower crops or in soybean crops. Indeed, sunflower cultivars resistant to ALS inhibitors were introduced in France in 2010 primarily to allow ragweed control in this crop. Herbicide-resistant sunflower is often included in short rotations including cereal crops, where ALS inhibitors are also used as a weed control solution, or soybean, where imazamox can be applied. As a result of intensive use of ALS inhibitors against common ragweed, resistance has been detected in the two samplings we performed between 2015 and 2019, i.e., half a dozen years after the release of the herbicide-resistant sunflower cultivars. This observation agrees with data from the literature. ALS inhibitors are the herbicide mode of action to which the highest number of resistance cases have been recorded (166 resistant weed species worldwide evolved resistance to these herbicides, and particularly to imazamox and tribenuron³). Moreover, common ragweed belongs to the *Asteraceae* taxonomic family, which ranks second in term of the number of species where resistance evolved (45 species so far³). Last, the introduction of herbicide-resistant crops has been reported to contribute to the development of herbicide resistance in weeds²⁵. As a case in point, the evolution of common ragweed resistance to glyphosate, a low-resistance-risk herbicide²⁶, was associated to the use of glyphosate-resistant soybean in the USA²⁷.

So far, resistance to herbicides in common ragweed had only been reported in the species native range, i.e., North-America. Most studies published to date pertain to glyphosate, an herbicide inhibiting 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. Among the studies reporting resistance to ALS inhibitors in common ragweed, only three investigated the mechanisms involved. The first two studies each identified a Leu574 ALS allele in one population^{20,21}. The third study also reported the presence of a Leu574 ALS allele, in ten additional populations²². The presence of other TSR allele(s) was suspected in some populations on the basis of ALS enzyme assays, but the amino-acid substitutions involved were not identified. Thus, only TSR caused by Leu574 ALS allele had previously been reported in common ragweed. This is in contrast to our study, where the unprecedented combination of high-throughput TSR diagnosis, herbicide bioassays and ALS Sanger sequencing unravelled an unsuspected diversity of TSR alleles. We detected a total of nine amino-acid substitutions, of which two had never been reported before. The previously reported Leu574 allele was detected at a very low frequency in one single population (Table 2). It was not, and by far, the most frequent or widespread allele identified in French common ragweed populations (Tables 1, 2). Leu574 ALS allele has been characterised in numerous weeds and is known to confer a high level of resistance to most ALS inhibitors^{18,28}, including imazamox in common ragweed²². A second

allele carrying a substitution at the same codon (Trp574Arg) was detected in our work. This allele had only been reported before in the grass *Digitaria sanguinalis* (large crabgrass), where it also conferred a broad resistance pattern²⁹. Three alleles carried a substitution at codon 197 (Gln197, Ser197 and Thr197), each previously shown in other species to confer a high resistance to sulfonylureas like tribenuron, and a variable resistance to imidazolinones like imazamox¹⁹. The same applies to the Glu376 allele identified in our work. Conversely, the Val205 allele was reported to confer a high resistance to imidazolinones and a variable resistance to sulfonylureas¹⁹. Herein, we demonstrated that this allele confers dominant resistance to both tribenuron and imazamox in common ragweed (Table 3). The last two alleles identified in our survey were both novelties. Characterisation of the resistance endowed by the Thr205 allele yielded results similar to those obtained for the Val205 allele, i.e., dominant resistance to tribenuron and imazamox (Table 3). The last ALS allele identified was a putative TSR allele. It carried a Phe-to-Ile substitution at codon 578. Seven amino-acid substitutions at codon 578 have been studied in yeast or in tobacco laboratory mutants, and shown to alter sensitivity or to confer resistance at least to sulfonylureas herbicides^{30,31}. However, ALS alleles carrying a substitution at codon 578 had never been observed before in weed populations from the field. Furthermore, the Phe-to-Ile substitution we identified at position 578 is not among the seven amino-acid substitutions characterised at this codon^{30,31}. Herbicide bioassays on plants from the originating fields will be necessary to confirm the novel Ile578 allele is actually a TSR ALS allele, and to characterise its associated resistance phenotype.

The diversity of the ALS alleles detected across common ragweed populations in our French sampling exceeds what had been previously described in most other weed species worldwide. Indeed, up to six variable amino-acid positions were previously recorded in a single species (*Amaranthus retroflexus*), while up to eight amino-acid changes at no more than four positions were described in each of the four species *Apera spica-venti*, *Descurainia sophia*, *Kochia scoparia* and *Schoenoplectus juncooides*¹⁹. The unprecedented diversity observed in our study is partly attributable to a methodological breakthrough. Indeed, our study is the first broad-scale resistance survey implementing high-throughput genotyping-by-sequencing to detect variants at all known resistance-associated positions within the ALS gene. In the future, applying this method to other pests that have evolved pesticide resistance will undoubtedly reveal more diverse genetic bases for TSR than presently recorded.

Our broad sampling enabled us to detect mutations and resistant plants in very low frequencies, and therefore to detect resistance at its emergence. Previous monitoring studies mostly considered resistance distribution or prevalence at a much more advanced stage^{32,33}. In particular, we observed the appearance of TSR clusters, including two independent events of appearance of the Ala205Thr substitution in geographically distant areas. Redundant evolution of TSR by multiple, independent appearances of TSR alleles had been previously observed in other species (e.g.,^{34,35}), including species that evolved TSR to ALS inhibitors (e.g., *Papaver rhoeas*³⁶ and *Amaranthus tuberculatus*¹⁰). Our results also suggest that once a TSR haplotype has evolved, its geographical spread in a region is rapid. In the 5–8 years that elapsed between the onset of ALS inhibitor selective pressure caused by herbicide-resistant sunflower release and our sampling, one TSR allele (Thr205.2) spread over a distance of c.a. 150 km (Fig. 1). Wind-borne pollen like that of common ragweed is a vector for herbicide resistance (e.g.,^{35,37}). However, long-distance dispersal of common ragweed is mainly mediated by seeds moved by human activity, especially agricultural machinery³⁸. It is likely that the dispersion of herbicide resistance in common ragweed over an agricultural production basin is promoted by agricultural activities.

While our work unravelled a surprisingly high diversity of TSR alleles in common ragweed, a major outcome of this study was the unexpected predominance of NTSR mechanisms. Indeed, the majority of common ragweed populations where resistance was detected using bioassay did not harbour TSR alleles (Table 2). Occurrence of TSR by increased ALS expression, be it due to enhanced transcription or ALS gene amplification, was ruled out using ALS expression measurement (Supplementary Figure S1). Our results agree with TSR to ALS inhibitors by increased target content being rare, with only one case reported to date in the literature in the grass weed *Hordeum leporinum*³⁹.

NTSR had already been reported in common ragweed to other herbicides modes of action, such as photosystem II inhibitors⁴⁰ and glyphosate⁴¹ in Canada. Ours is the first report worldwide of NTSR to ALS inhibitors in common ragweed. NTSR to ALS inhibitors had already frequently been reported in grass weeds^{7,42–44}, but very seldom in dicotyledonous weeds, with four species concerned so far: *Amaranthus hybridus*⁴⁵, *Sinapis arvensis*^{46,47}, *P. rhoeas*⁴⁸ and *Amaranthus palmeri*⁴⁹. Here, we observed that NTSR is largely distributed in French common ragweed populations and can cause alone high resistance frequencies. Resistance patterns varied with the population, and resistance to both herbicides assayed was not systematically associated. Rather, evolution of NTSR to imazamox alone or to tribenuron alone seemed to be the preferred pattern observed. This is consistent with imazamox-resistant sunflower and tribenuron-resistant sunflower being mutually exclusively grown on vast areas, as a result of the different requirements of the respective cultivars and of competition between agricultural cooperatives. This is also consistent with imazamox and tribenuron displaying different chemistries while acting at the same target site. This data combined to our results suggest that the metabolic pathways involved in imazamox or in tribenuron degradation are at least in part different, and that independent events of evolution of NTSR occurred across France.

Conclusions

In conclusion, our work unravelled an unexpected diversity of herbicide resistance mechanisms in common ragweed in France. Common ragweed is a striking example of multiple, parallel evolution where a diversity of TSR and/or NTSR mechanisms are selected for locally, and combined within populations as well as within individual plants. Common ragweed is a highly genetically variable species. Invasive populations of this weed have especially high levels of genetic diversity due to genetic admixture among different colonization sources^{50,51}. This may be a reason why the diversity of resistance mechanisms observed in its invasive range appears greater

than reported from its native range. Given the detrimental impact of common ragweed on both agricultural production and human health, it is of high importance to be able to monitor herbicide resistance so as to adapt agricultural practices and keep common ragweed under control. High-throughput resistance diagnosis using massive genotyping-by-sequencing is certainly a tool of choice for this purpose. Yet, implementing such a tool requires genes and mutations at the root of resistance to be identified. While this is the case for TSR, the genetic determinants of NTSR to ALS inhibitors remains unresolved. This is all the more unfortunate that the bulk of resistance in common ragweed seems to be endowed by NTSR mechanisms. There is thus an urgent need to gain a better understanding on the genes and alleles driving common ragweed NTSR to ALS inhibitors.

Materials and methods

Ragweed samplings. Two samplings were conducted in this study (Supplementary Figure S2). To check whether TSR to ALS inhibitors was present in French ragweed populations, a total of 213 agricultural fields were randomly sampled in five regions faced at least locally with high levels of common ragweed infestation: Auvergne Rhône-Alpes (ARA), Bourgogne Franche-Comté (BFC), Centre Val de Loire (CVL), Nouvelle Aquitaine (NAQ) and Occitanie (OCC) (Supplementary Table S1). Areas of high ragweed presence were criss-crossed by car during summer, and fields were sampled on the sole basis of the presence of common ragweed, without any a priori information on the efficacy of herbicides. One leaf was collected on each of 50 different plants per field sampled prior to TSR diagnosis (see below). Populations were sampled between 2015 and 2018. Overall, 18 populations were sampled in 2015, 68 in 2016, 112 in 2017 and 15 in 2018.

In a second step, to assess the relative importance of TSR and NTSR in common ragweed resistance to ALS inhibitors in France, a second, targeted sampling was performed (Supplementary Table S1). Seeds were collected from 43 additional fields selected on the basis of farmers having reported a poor ALS-inhibitor-based control of common ragweed. This information was obtained through the channels of the national French monitoring system of the adverse effects of phytosanitary products. The fields sampled had in common a history of ALS-inhibiting herbicide applications against common ragweed, but the detail of this history could not be obtained. They were mostly cultivated with sunflower cultivars resistant to ALS inhibitors, with soybean or with maize. Tribenuron (a sulfonyleurea) and imazamox (an imidazolinone) were largely the main ALS-inhibiting herbicides applied in these fields. In every field, ripe seeds were collected as a bulk from at least 30 different common ragweed plants. Seeds batches were stored at room temperature for at least 3 months to allow post-ripening before being used for resistance analysis. Populations were sampled between 2017 and 2019. Overall, 28 populations were sampled in 2017, 8 in 2018 and 7 in 2019.

This study complies with the French legislation and institutional guidelines. Permission for collection of ragweed leaves and seeds were obtained in the framework of the monitoring system of the adverse effects of phytosanitary products instituted by the French law of October 13, 2014 on the future of agriculture.

TSR detection using Illumina high-throughput sequencing technology. The 213 randomly sampled common ragweed populations were analysed following the protocol described in a previous study⁵². Briefly, discs were punched out of the 50 leaves representing each population, pooled in one tube per population and ground in liquid nitrogen. DNA extraction was performed following the rapid DNA extraction procedure described in a previous study⁵³. DNA extracts were stored at -20°C . PCR were performed on diluted DNA extracts (1/10) and mixes prepared as described⁵². The PCR programs consisted of 3 min at 95°C , followed by 37 cycles of 5 s at 95°C , 10 s at 60°C and 30 s at 72°C . Three regions of the ALS gene were amplified separately from each DNA extract with the primer pairs including overhang adapter sequences at their 5' end described elsewhere⁵². These regions carried the eight codons involved in TSR to ALS inhibitors (codons 122, 197, 205, 376, 377, 574, 653 and 654, as standardised after *Arabidopsis* ALS sequence)²⁸ and seven additional codons potentially involved in TSR (codons 121, 124, 196, 199, 375, 571 and 578)⁵⁴. All three amplicons were subsequently pooled in an equimolar mix for each population. Each of the 213 resulting mixes was tagged with one specific index. Tagged amplicons were purified and loaded onto one Illumina MiSeq V3 cartridge according to the manufacturer instructions. The 250-nucleotide pair-end sequences passing Illumina standard quality controls were assigned to their population of origin on the basis of the population-specific indexes. Nucleotide changes causing amino-acid substitutions at the 15 ALS codons targeted were sought in each population using the R-based pipeline described elsewhere⁵². Briefly, the reads were aligned to a reference sequence of common ragweed ALS (GenBank accession KX870184). Variant calling was performed at each of the nucleotide positions in the 15 targeted codons where nucleotide changes were predicted to cause amino-acid substitutions. To account for Illumina sequencing errors, we applied a frequency threshold of 1% for the detection of any such change. Then, frequencies of single-nucleotide substitutions at the 15 ALS codons implicated in herbicide resistance were calculated in every pool of 50 plants.

Resistance detection using herbicide sensitivity bioassays. Seeds were stratified at 4°C during one month to break dormancy and transferred to a growth chamber for germination (photoperiod of 16 h, $20^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ day/night). After germination, seedlings at the cotyledon stage were transplanted into plastic trays ($17 \times 12.5 \times 5.5$ cm) filled with 60% silt-loam soil, 15% sand, 15% perlite and 10% peat by volume and placed in a greenhouse ($20^{\circ}\text{C}/15^{\circ}\text{C}$ day/night with a 16 h photoperiod). Plants were watered as needed until the two-to-four leaf stage, when they were subjected to herbicide treatment. Each tray contained 20 seedlings. Two trays per population (40 seedlings) were sprayed per herbicide dose, and one tray per population (20 seedlings) was sprayed with water and served as the untreated control. Herbicides were applied using a custom-built, single-nozzle (nozzle AXI 110°06; Albus, France) sprayer delivering herbicide in 300 L ha^{-1} water at 400 kPa under a temperature of 23°C and a relative humidity of 80%. The two major ALS inhibitors used to control com-

mon ragweed in France were sprayed as commercial formulations at their respective, maximum recommended French field rate. The commercial herbicides used were Express SX[®] (FMC, 50% w/w tribenuron, field rate of 30 g tribenuron ha⁻¹) with 1 L ha⁻¹ surfactant (Actirob B[®], Bayer CropScience), and Pulsar 40[®] (BASF, 40 g L⁻¹ imazamox, field rate of 50 g imazamox ha⁻¹) with 1.25 L ha⁻¹ surfactant (Dash[®], BASF).

Every spraying experiment included one batch of 20 plants from the reference population P08 (100% plants sensitive to any herbicide used to control ragweed and applied at the recommended French field rate) for each of the herbicides and herbicide rates assayed, as a check for herbicide application efficiency. Phenotype rating based on visual injury was performed four weeks after treatment, when all plants from the reference population were clearly dead and plant phenotype rating could be performed without ambiguity. Preliminary experiments demonstrated that plants with visually estimated biomass ranging from unaffected by herbicide application (identical to the untreated control plants, 100%) down to $\geq 50\%$ of that of the untreated control plants ultimately recovered and were able to produce viable seeds. They were thus considered resistant. Plants injured and with a visually estimated biomass $< 50\%$ of that of the untreated control plants ultimately died. These plants and the plants dead at the time of rating were thus considered sensitive. After phenotype rating, one leaf fragment was collected on plants rated resistant and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ prior to ALS gene Sanger sequencing.

ALS gene Sanger sequencing and genotyping. DNA was extracted as before from the leaf fragments collected on the resistant plants. The ALS gene was amplified as two overlapping fragments encompassing the whole ALS coding sequence. A 1237-nucleotide amplicon was amplified using primers ALA5 (5'-IAICACACT CATTCAACAATGGC-3' where I indicates an inosine base) and ALA4R (5'-CAAAATCTCGTTAAGCCCCTG TAAC-3'), and a 667-nucleotide amplicon was amplified using primers ALA6 (5'-GGTTCGGCAGCATCAGA TG-3') and ALA1R (5'-ACTGATCCATAACATTCATAACCAG-3'). PCR mixes were as before. For both PCRs, cycling programs consisted of 95 °C 3 min followed by 40 cycles of 95 °C 10 s, 60 °C 15 s and 72 °C 90 s. Both fragments were amplified from each individual plant in three independent PCRs and subsequently sequenced on both strands using Sanger sequencing. The 15 codons screened by Illumina genotyping-by-sequencing were visually checked from Sanger chromatograms using the BioEdit software.

Haplotype networks for mutant ALS alleles. All sequence reads obtained either from Sanger sequencing or from Illumina sequencing were aligned and compared within and among the populations where they had been detected. Common ragweed is a diploid species¹⁵, and some of the plants carrying a mutant allele were heterozygous. In these cases, the Sanger sequence of the heterozygous plant was aligned with homozygous sequences obtained from the same population, and its mutant haplotype was deduced from the alignment. When mutant alleles had been identified by Illumina sequencing, the paired reads encompassing the mutant codon were merged before alignment. To account for Illumina sequencing errors, only polymorphisms present at a frequency $> 1\%$ of the total of the reads were considered. Haplotype networks were inferred with PopART⁵⁵ using the Median joining method.

Cross-resistance pattern of the two major ALS TSR alleles to imazamox and tribenuron. The most common and widespread TSR alleles identified carried an Ala205Val or an Ala205Thr substitution. To characterize their cross-resistance pattern to imazamox and tribenuron, common ragweed populations where these alleles were present in high frequencies were required. This criterion was fulfilled for the Val205 allele (populations ARA5 and ARA7, Table 2) but not for the Thr205 allele that was present with a maximum frequency of 16% in the populations sampled (population OCC10, Table 2). To overcome this issue, two populations segregating the Thr205 allele were obtained by separately bulk-crossing two batches of a dozen plants each from population OCC10. The presence of the Thr205 allele at the homozygous or heterozygous state in each of the parental plants had been ascertained beforehand by dCAPS genotyping (see below). The two field populations and the two bulked segregating progenies were subjected to herbicide sensitivity bioassays. To correlate plant phenotype and genotype at the ALS gene, plants were individually identified from their position in the growing tray (40 plants per population and per herbicide), and a piece of young leaf tissue was collected 24 h before herbicide application and stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until ALS genotyping. Plants were individually genotyped at ALS codon 205 using the derived Cleaved Amplified Polymorphism Sequence technique (dCAPS⁵⁶) and applying previously described guidelines⁵⁷. The dCAPS primer ALAMwoI (5'-GCTATAACTGGTCAAGTTCCA AGAAGAATGATTGCAACAG-3') introduces a *MwoI* restriction site in ALS sequences encoding an alanine residue at codon 205 (wild-type). Any substitution at any of the 2 first nucleotides in codon 205 shall remove this restriction site (substitutions at the third nucleotide in codon 205 are silent). This primer was used in PCR with primer ALA7R (5'-GACAAATAACCCGGTAACCTCATAGG-3'). PCR mixes were as before. Cycling program consisted of 95 °C 5 min followed by 37 cycles of 95 °C 5 s, 65 °C 10 s and 72 °C 30 s. Digestion was performed at 37 °C for 3 h using 5 μL digestion mix of *MwoI* isoschizomer *HpyF10VI* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and 5 μL of the PCR mix. dCAPS patterns were visualised by electrophoresis on 3% agarose gel in 0.5 \times TBE Buffer. The genotype of each plant was associated to its phenotype after herbicide bioassay rating.

Relative ALS gene expression between sensitive and resistant plants. A number of plants surviving ALS inhibitor application did not carry TSR allele(s). To investigate the possibility of these plants being resistant because of an increased content in ALS, the relative expression level of this gene was compared between resistant and sensitive plants in four populations. These populations were selected for their relatively high frequencies of plants resistant to at least one of the herbicides tested (imazamox for population ARA2, tribenuron for population NAQ8, and both herbicides for populations ARA8 and OCC13). Ninety-six individual plants per population were grown in 96-well trays to individualise each seedling, as well as eight plants from the reference

population P08. At the four-leaf stage, the apical bud of each plant was harvested in liquid nitrogen in 2 mL tubes containing steel beads and stored at -80°C . Twenty-four hours after bud collection, plants were sprayed with imazamox or tribenuron, as described previously. Plant phenotype was rated as previously.

Total RNA extraction of apical buds was performed using the Direct-zol™ RNA MiniPrep (Zymo research) kit and following the manufacturer's instructions. Total RNA concentration and quality were assessed using a NanoDrop spectrophotometer (LABTECH, Luton, UK). cDNA was synthesised from 1 μg total RNA of quality samples using the Quantitect⁺ Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). qPCR was performed from eightfold diluted cDNA samples using the ViiA7 system (Applied Biosystem). A seven-point standard curve based on a two-fold dilution series (from 1:2 to 1:128) of a pool of cDNAs from resistant and sensitive plants was included in the experiment as a control for the efficiency of the qPCR. The relative expression level of the ALS gene was compared between resistant and sensitive plants using the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method⁵⁸ after normalisation with three reference genes validated beforehand following the recommendations of⁵⁹ (Supplementary Table S2). The plants from the reference population P08 were used as the reference sample for ALS expression normalisation. ALS relative expression levels of resistant and sensitive plants were compared within each of the four populations using a non-parametric Wilcoxon test.

Received: 21 June 2021; Accepted: 22 September 2021

Published online: 07 October 2021

References

- Oerke, E.-C. Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* **144**, 31–43 (2006).
- R4P Network. Trends and challenges in pesticide resistance detection. *Trends Plant Sci.* **21**, 834–853 (2016).
- Heap, I. M. The international herbicide-resistant weed database. <http://www.weedscience.org/Home.aspx> (2021).
- Délye, C., Jasieniuk, M. & Le Corre, V. Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends Genet.* **29**, 649–658 (2013).
- Gaines, T. A. *et al.* Mechanisms of evolved herbicide resistance. *J. Biol. Chem.* **295**, 10307–10330 (2020).
- Murphy, B. P. & Tranel, P. J. Target-site mutations conferring herbicide resistance. *Plants* **8**, 382 (2019).
- Beckie, H. J. & Tardif, F. J. Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Prot.* **35**, 15–28 (2012).
- Han, H. *et al.* Cytochrome P450 CYP81A10v7 in *Lolium rigidum* confers metabolic resistance to herbicides across at least five modes of action. *Plant J.* **105**, 79–92 (2021).
- Kreiner, J. M. *et al.* Multiple modes of convergent adaptation in the spread of glyphosate-resistant *Amaranthus tuberculatus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **116**, 21076–21084 (2019).
- Milani, A. *et al.* Population structure and evolution of resistance to acetolactate synthase (ALS)-inhibitors in *Amaranthus tuberculatus* in Italy. *Pest Manag. Sci.* **77**, 2971–2980 (2021).
- Clements, D. R. *et al.* Adaptability of plants invading North American cropland. *Agric. Ecosyst. Environ.* **104**, 379–398 (2004).
- Essl, F. *et al.* Biological flora of the British Isles: *Ambrosia artemisiifolia*. *J. Ecol.* **103**, 1069–1098 (2015).
- Cowbrough, M. J., Brown, R. B. & Tardif, F. J. Impact of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) aggregation on economic thresholds in soybean. *Weed Sci.* **51**, 947–954 (2003).
- Swinton, S. M., Buhler, D. D., Forcella, F., Gunsolus, J. L. & King, R. P. Estimation of crop yield loss due to interference by multiple weed species. *Weed Sci.* **42**, 103–109 (1994).
- Bassett, I. J. & Crompton, C. W. The biology of Canadian weeds: *Ambrosia artemisiifolia* L. and *A. psilostachya* DC. *Can. J. Plant Sci.* **55**, 463–476 (1975).
- Chauvel, B., Dessaint, F., Cardinal-Legrand, C. & Bretagnolle, F. The historical spread of *Ambrosia artemisiifolia* L. France from herbarium records. *J. Biogeogr.* **33**, 665–673 (2006).
- Sala, C. A., Bulos, M., Altieri, E. & Ramos, M. L. Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower. *Helia* **35**, 57–69 (2012).
- Yu, Q. & Powles, S. B. Resistance to AHAS inhibitor herbicides: Current understanding. *Pest Manag. Sci.* **70**, 1340–1350 (2014).
- Tranel, P. J., Wright, T. R. & Heap, I. M. ALS mutations from resistant weeds. <http://www.weedscience.com> (2021).
- Patzoldt, W. L., Tranel, P. J., Alexander, A. L. & Schmitzer, P. R. A common ragweed population resistant to cloransulam-methyl. *Weed Sci.* **49**, 485–490 (2001).
- Rousonelos, S. L., Lee, R. M., Moreira, M. S., VanGessel, M. J. & Tranel, P. J. Characterization of a common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) population resistant to ALS- and PPO-inhibiting herbicides. *Weed Sci.* **60**, 335–344 (2012).
- Zheng, D., Patzoldt, W. L. & Tranel, P. J. Association of the W574L ALS substitution with resistance to cloransulam and imazamox in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). *Weed Sci.* **53**, 424–430 (2005).
- Van Wely, A. C. *et al.* Glyphosate and acetolactate synthase inhibitor resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in southwestern Ontario. *Can. J. Plant Sci.* **95**, 335–338 (2015).
- Marsan-Pelletier, F., Vanasse, A., Simard, M.-J. & Cuerrier, M.-E. Survey of imazethapyr-resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in Quebec. *Phytoprotection* **99**, 36–44 (2019).
- Owen, M. D. & Zelaya, I. A. Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest Manag. Sci.* **61**, 301–311 (2005).
- Duke, S. O. & Powles, S. B. Glyphosate: A once-in-a-century herbicide. *Pest Manag. Sci.* **64**, 319–325 (2008).
- Barnes, E. R., Knezevic, S. Z., Sikkema, P. H., Lindquist, J. L. & Jhala, A. J. Control of glyphosate-resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in glufosinate-resistant soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. *Front. Plant Sci.* **8**, 1455 (2017).
- Tranel, P. J. & Wright, T. R. Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned?. *Weed Sci.* **50**, 700–712 (2002).
- Li, J., Li, M., Gao, X. & Fang, F. A novel amino acid substitution Trp574Arg in acetolactate synthase (ALS) confers broad resistance to ALS-inhibiting herbicides in crabgrass (*Digitaria sanguinalis*). *Pest Manag. Sci.* **73**, 2538–2543 (2017).
- Duggleby, R. G., Pang, S. S., Yu, H. & Guddat, L. W. Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase. Interpretation of herbicide-resistance data. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2895–2904 (2003).
- Jung, S.-M. *et al.* Amino acid residues conferring herbicide resistance in tobacco acetohydroxyacid synthase. *Biochem. J.* **383**, 53–61 (2004).
- Owen, M. J., Walsh, M. J., Llewellyn, R. S. & Powles, S. B. Widespread occurrence of multiple herbicide resistance in Western Australian annual ryegrass (*Lolium rigidum*) populations. *Aust. J. Agric. Res.* **58**, 711–718 (2007).
- Owen, M. J., Martinez, N. J. & Powles, S. B. Multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum* (annual ryegrass) now dominates across the Western Australian grain belt. *Weed Res.* **54**, 314–324 (2014).
- Délye, C. Nucleotide variability at the acetyl coenzyme A carboxylase gene and the signature of herbicide selection in the grass weed *Alopecurus myosuroides* (Huds.). *Mol. Biol. Evol.* **21**, 884–892 (2004).
- Délye, C., Clément, J. A. J., Pernin, F., Chauvel, B. & Le Corre, V. High gene flow promotes the genetic homogeneity of arable weed populations at the landscape level. *Basic Appl. Ecol.* **11**, 504–512 (2010).

36. Délye, C., Pernin, F. & Scarabel, L. Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Plant Sci.* **180**, 333–342 (2011).
37. Sudheesh, M. An analysis of polygenic herbicide resistance evolution and its management based on a population genetics approach. *Basic Appl. Ecol.* **16**, 104–111 (2015).
38. Bullock, J. M. Assessing and controlling the spread and the effects of common ragweed in Europe. *Report, Contractor: Natural environment research Council UK* (2012).
39. Yu, Q., Nelson, J. K., Zheng, M. Q., Jackson, J. & Powles, S. B. Molecular characterisation of resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Hordeum leporinum* biotypes. *Pest Manag. Sci.* **63**, 918–927 (2007).
40. Simard, M.-J., Laforest, M., Soufiane, B., Benoit, D. L. & Tardif, F. Linuron resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) populations in Quebec carrot fields: presence and distribution of target-site and non-target site resistant biotypes. *Can. J. Plant Sci.* **98**, 345–352 (2017).
41. Ganie, Z., Jugulam, M., Varanasi, V. & Jhala, A. J. Investigating mechanism of glyphosate resistance in a common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) biotype from Nebraska. *Can. J. Plant Sci.* (2017). <https://doi.org/10.1139/CJPS-2017-0036>.
42. Duhoux, A., Carrère, S., Duhoux, A. & Délye, C. Transcriptional markers enable identification of rye-grass (*Lolium* sp.) plants with non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase. *Plant Sci.* **257**, 22–36 (2017).
43. Gardin, J. A. C., Gouzy, J., Carrère, S. & Délye, C. ALOMYbase, a resource to investigate non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in the major grass weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *BMC Genomics* **16**, 590 (2015).
44. Torra, J. *et al.* Target-site and non-target-site resistance mechanisms confer multiple and cross-resistance to ALS and ACCase inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* from Spain. *Front. Plant Sci.* **12**, 625138 (2021).
45. Manley, B. S., Hatzios, K. K. & Wilson, H. P. Absorption, translocation, and metabolism of chlorimuron and nicosulfuron in imidazolinone-resistant and susceptible smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*). *Weed Technol.* **13**, 759–764 (1999).
46. Jeffers, G. M., O'Donovan, J. T. & Hall, L. M. Wild mustard (*Brassica kaber*) resistance to ethametsulfuron but not to other herbicides. *Weed Technol.* **10**, 847–850 (1996).
47. Veldhuis, L. J., Hall, L. M., O'Donovan, J. T., Dyer, W. & Hall, J. C. Metabolism-based resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to ethametsulfuron-methyl. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 2986–2990 (2000).
48. Scarabel, L., Pernin, F. & Délye, C. Occurrence, genetic control and evolution of non-target-site based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase (ALS) in the dicot weed *Papaver rhoeas*. *Plant Sci.* **238**, 158–169 (2015).
49. Nakka, S., Thompson, C. R., Peterson, D. E. & Jugulam, M. Target site-based and non-target site based resistance to ALS inhibitors in Palmer Amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Weed Sci.* **65**, 681–689 (2017).
50. Meyer, L. *et al.* New gSSR and EST-SSR markers reveal high genetic diversity in the invasive plant *Ambrosia artemisiifolia* L. and can be transferred to other invasive *Ambrosia* species. *PLOS ONE* **12**, e0176197 (2017).
51. Van Boheemen, L. A. *et al.* Multiple introductions, admixture and bridgehead invasion characterize the introduction history of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe and Australia. *Mol. Ecol.* **26**, 5421–5434 (2017).
52. Délye, C. *et al.* Harnessing the power of next-generation sequencing technologies to the purpose of high-throughput pesticide resistance diagnosis. *Pest Manag. Sci.* **76**, 543–552 (2020).
53. Délye, C., Matějček, A. & Gasquez, J. PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds.) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud.). *Pest Manag. Sci.* **58**, 474–478 (2002).
54. Duggleby, R. G., McCourt, J. A. & Guddat, L. W. Structure and mechanism of inhibition of plant acetylhydroxyacid synthase. *Plant Physiol. Biochem.* **46**, 309–324 (2008).
55. Leigh, J. W. & Bryant, D. POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* **6**, 1110–1116 (2015).
56. Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J. & Pepper, A. E. dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms: Experimental applications in *Arabidopsis thaliana* genetics. *Plant J.* **14**, 387–392 (1998).
57. Délye, C. & Boucansaud, K. 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 (2008).
58. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2ddCT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
59. Bustin, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* **55**, 611–622 (2009).

Acknowledgements

The authors acknowledge all the people in the field who contributed to seed and leaf collection. The high-throughput sequencing analyses performed at USC Casper and herbicide sensitivity assays were supported by Anses as part of the implementation of the monitoring system of the adverse effects of phytosanitary products instituted by the French law of October 13, 2014 on the future of agriculture (Phytopharmacovigilance). Ragweed sampling was funded by Phytopharmacovigilance and by the Direction Générale de l'Alimentation of the French Ministère de l'Agriculture within the framework of the Écophyto 2 national plan. The development of the high-throughput sequencing technique and the analyses carried out at INRAE Dijon were supported by the French Agency for Biodiversity, within the framework of the Écophyto 2 national plan (research project ENI-VTH), and by BASF France SAS. I.L. was supported by INRAE, Département Santé des Plantes et Environnement, and ACTA—Les instituts techniques agricoles.

Author contributions

I.L., B.B., V.L.C. and C.D. designed the experiments; I.L., L.C. S.F., S.M., F.P. performed the experiments; I.L., B.B., C.D., V.L.C. performed data analysis, I.L., B.B., V.L.C. generated figures, I.L., B.B., V.L.C., C.D. wrote the paper. All authors reviewed the manuscript.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Additional information

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-99306-9>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to C.D.

Reprints and permissions information is available at www.nature.com/reprints.

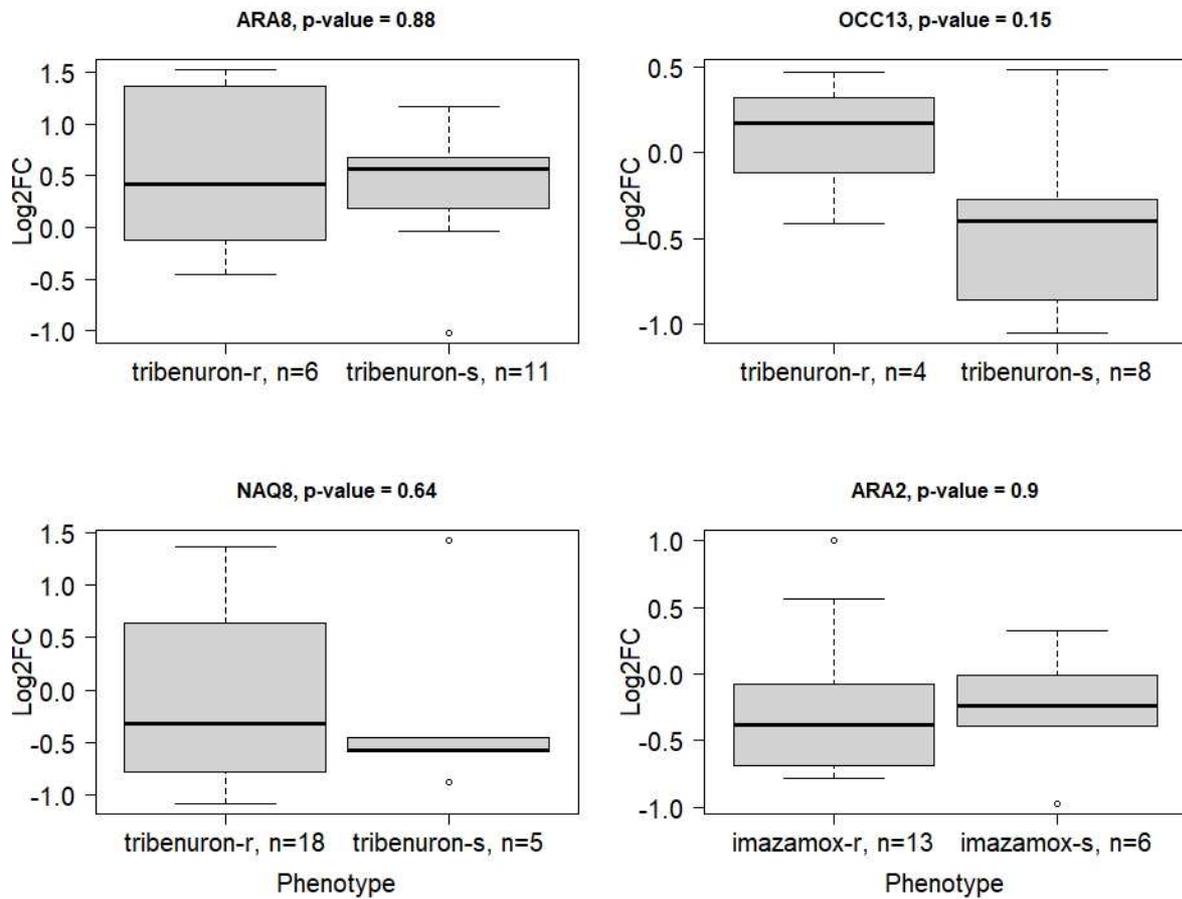
Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



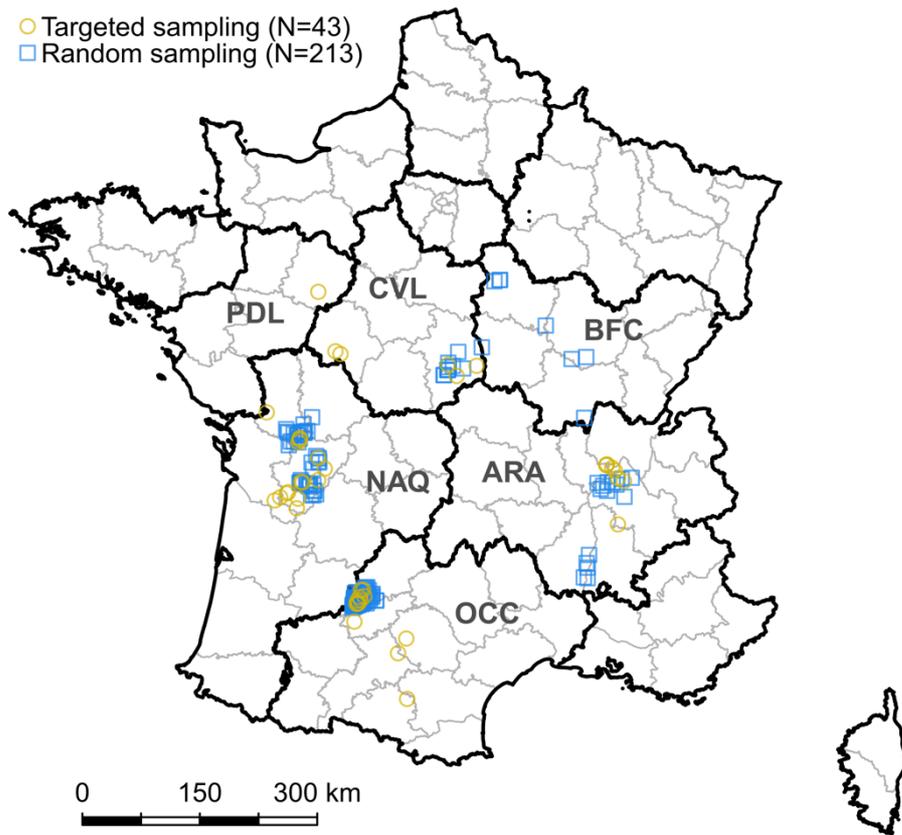
Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2021

Supplementary Information 1



Supplementary Figure 1: Relative expression level of the ALS gene in resistant and sensitive plants from populations where resistance to imazamox only (ARA2), to tribenuron only (NAQ8) or to both herbicides (OCC13 and ARA8) was observed. P-values are given for the non-parametric Wilcoxon test checking the significance of the difference of relative expression between resistant and sensitive plants in each population.



Supplementary Figure 2: Geographical localisation of the 256 common ragweed populations sampled for this study in six French regions. ARA, Auvergne Rhône-Alpes; BFC, Bourgogne Franche-Comté; CVL, Centre Val-de-Loire; NAQ, Nouvelle Aquitaine; OCC, Occitanie, PDL, Pays de la Loire. Map generated using R software (v4.1.0, packages rgdal, rgeos and mapplots).

Supplementary Table 2: common ragweed genes used as references for the normalisation of gene expression data.

Gene code	Gene	Primer (Forward)	Primer (Reverse)
EF	Elongation factor	5' CGTTCATGCTGCTTT CACAAAAC	5' CCTCATCAGCTGCAGC CTTTGTC
FIL	Filamin	5' TTCGATGGGATTATG CCGGA	5' ACCGCCAAAAGAAACC ATCC
UBQ	Cue protein, ubiquitin system component	5' TGAAAGAACCCTCAA CCAATGTG	5' CACTTTGGGTTTGAATT TGATACTCT

Supplementary Information 2

Supplementary Table 1: common ragweed population information

Population code	Sampling	Crop	Latitude	Longitude	Sequencing method
1700938FL	Random	Sunflower	45,594539	5,079073	NGS
1704318FL	Random	Sunflower	46,912707	2,443450	NGS
1704418FL	Random	Sunflower	46,913744	2,439681	NGS
1705738FL	Random	Sunflower	45,626730	5,311229	NGS
1706138FL	Random	Sunflower	45,637278	5,475735	NGS
1706938FL	Random	Sunflower	45,587745	4,914658	NGS
1801038FL	Random	Sunflower	45,419364	5,347022	NGS
1801338FL	Random	Sunflower	45,562780	5,223708	NGS
1801438FL	Random	Sunflower	45,588367	5,160130	NGS
1801638FL	Random	Sunflower	45,493305	5,066488	NGS
1802418FL	Random	Sunflower	46,912707	2,443450	NGS
1803838FL	Random	Sunflower	45,553236	5,004411	NGS
1806318FL	Random	Sunflower	46,931689	2,704388	NGS
1806438FL	Random	Sunflower	47,123515	2,621374	NGS
ANN	Random	Sunflower	46,960251	2,532895	NGS
ARD01	Random	Wheat stubble	44,755566	4,748558	NGS
ARD02	Random	Sunflower	44,661964	4,706496	NGS
ARD03	Random	Sunflower	44,608462	4,722337	NGS
ARD04	Random	Soybean	44,497270	4,657409	NGS
BE01	Random	Wheat stubble	47,956906	3,321936	NGS
BE02	Random	Meadow	47,956906	3,331936	NGS
BLB	Random	Wheat stubble	47,050509	4,773920	NGS
CHA1	Random	Sunflower	46,852950	2,376937	NGS
CHA2	Random	Spring barley	46,852950	2,386937	NGS
DR01	Random	Wheat stubble	44,486475	4,716776	NGS
IS19	Random	Sunflower	45,516941	4,962637	NGS
LCL	Random	Oilseed rape	47,177091	3,018014	NGS
LRV	Random	Grapevine	46,346792	4,719113	NGS
MQ16-01	Random	Alfalfa	44,184150	1,017917	NGS
MQ16-01b	Random	Alfalfa	44,184150	1,017917	NGS
MQ16-02	Random	Soybean	44,188550	1,049400	NGS
MQ16-03	Random	Sunflower	44,189283	1,049633	NGS
MQ16-04	Random	Soybean	44,189117	1,049983	NGS
MQ16-07	Random	Soybean	44,229483	1,078733	NGS
MQ16-14	Random	Sunflower	44,218350	1,120700	NGS
MQ16-17	Random	Soybean	44,213567	1,130167	NGS

MQ16-18	Random	Sunflower	44,217583	1,193083	NGS
MQ16-21	Random	Chickpea	44,272117	1,267067	NGS
MQ16-23	Random	Sunflower	44,195250	1,071917	NGS
MQ16-24	Random	Wheat stubble	44,193100	1,020733	NGS
MQ16-26	Random	Maize	44,185083	1,020867	NGS
MQ16-27	Random	Wheat stubble	44,190117	1,037950	NGS
MQ16-28	Random	Sunflower	44,201017	1,084583	NGS
MQ16-29	Random	Sunflower	44,201350	1,096250	NGS
MQ16-31	Random	Sunflower	44,202433	1,121167	NGS
MQ16-32	Random	Sunflower	44,206067	1,128717	NGS
MQ16-36	Random	Sunflower	44,210450	1,139917	NGS
MQ16-42	Random	Chickpea	44,262350	1,230833	NGS
MQ16-43	Random	Soybean	44,136898	0,954089	NGS
MQ16-44	Random	Wheat stubble	44,151601	0,978559	NGS
MQ16-45	Random	Buckwheat	44,158829	0,990081	NGS
MQ16-46	Random	Sunflower	44,170546	1,002116	NGS
MQ16-48	Random	Meadow	44,182447	1,038352	NGS
MQ16-49	Random	Wheat stubble	44,181702	1,049382	NGS
MQ16-50	Random	Sunflower	44,179958	1,091959	NGS
MQ16-51	Random	Sunflower	44,220292	1,064801	NGS
MQ16-52	Random	Soybean	44,219978	1,066720	NGS
MQ16-53	Random	Sunflower	44,224550	1,074992	NGS
MQ16-54	Random	Maize	44,245828	1,113711	NGS
MQ16-55a	Random	Sunflower	44,259300	1,125257	NGS
MQ16-55b	Random	Sorghum	44,257553	1,123765	NGS
MQ16-56	Random	Sunflower	44,272370	1,108624	NGS
MQ16-57	Random	Sunflower	44,266989	1,078310	NGS
MQ16-58	Random	Sunflower	44,258503	1,081277	NGS
MQ16-59	Random	Sunflower	44,236868	1,021961	NGS
MQ16-60	Random	Soybean	44,237975	1,028822	NGS
MQ16-61	Random	Alfalfa	44,241696	1,052406	NGS
MQ16-62	Random	Soybean	44,273683	1,214693	NGS
MQ16-63	Random	Sunflower	44,299638	1,251068	NGS
MQ16-64	Random	Wheat stubble	44,303917	1,269550	NGS
MQ16-65	Random	Wheat stubble	44,345229	1,207393	NGS
MQ16-66	Random	Sunflower	44,381035	1,182771	NGS
MQ16-67	Random	Sunflower	44,369709	1,162472	NGS
MQ16-68	Random	Sunflower	44,376365	1,149371	NGS
MQ16-69	Random	Wheat stubble	44,356612	1,132641	NGS

MQ16-70	Random	Sunflower	44,341195	1,123926	NGS
MQ16-71	Random	Soybean	44,318076	1,177927	NGS
MQ16-72	Random	Sunflower	44,310475	1,170564	NGS
MQ16-73	Random	Wheat stubble	44,306962	1,108730	NGS
MQ16-74	Random	Soybean	44,304733	1,097984	NGS
MQ16-75	Random	Wheat stubble	44,192153	1,176674	NGS
MQ16-76	Random	Wheat stubble	44,238842	1,229680	NGS
MQ16-77a	Random	Soybean	44,227619	1,328986	NGS
MQ16-77b	Random	Soybean	44,228713	1,327979	NGS
MQ16-78	Random	Wheat stubble	44,276762	1,189529	NGS
MQ16-79	Random	Sunflower	44,234102	1,111513	NGS
MQ16-80	Random	Sunflower	44,226817	1,092850	NGS
MQ16-81	Random	Sorghum	44,221906	1,106348	NGS
MQ16-82	Random	Sunflower	44,302507	1,077546	NGS
MQ16-83	Random	Wheat stubble	44,315396	1,050392	NGS
MQ16-84	Random	Sunflower	44,320053	1,010635	NGS
MQ16-85	Random	Sunflower	44,310513	0,986176	NGS
MQ16-86	Random	Wheat stubble	44,288339	1,055223	NGS
MQ16-87	Random	Sunflower	44,217733	0,990371	NGS
MQ16-88	Random	Sunflower	44,207233	0,978740	NGS
MQ17-01	Random	Wheat stubble	44,190181	1,037960	NGS
MQ17-02	Random	Wheat stubble	44,185361	1,003761	NGS
MQ17-03	Random	Meadow	44,160505	1,000864	NGS
MQ17-04	Random	Soybean	44,165712	0,998443	NGS
MQ17-05	Random	Soybean	44,185527	1,024490	NGS
MQ17-06	Random	Soybean	44,187664	1,028773	NGS
MQ17-07	Random	Alfalfa	44,186257	1,030180	NGS
MQ17-08	Random	Alfalfa	44,186409	1,028982	NGS
MQ17-09	Random	Soybean	44,188625	1,031027	NGS
MQ17-10	Random	Wheat stubble	44,188761	1,029744	NGS
MQ17-11	Random	Soybean	44,188605	1,033077	NGS
MQ17-12	Random	Meadow	44,189474	1,036158	NGS
MQ17-13	Random	Wheat stubble	44,189486	1,037422	NGS
MQ17-14	Random	Wheat stubble	44,192978	1,041462	NGS
MQ17-15	Random	Soybean	44,192566	1,042077	NGS

MQ17-16	Random	Wheat stubble	44,191004	1,045629	NGS
MQ17-17	Random	Wheat stubble	44,191098	1,045219	NGS
MQ17-18	Random	Wheat stubble	44,191848	1,046257	NGS
MQ17-19	Random	Wheat stubble	44,190652	1,046964	NGS
MQ17-20	Random	Sunflower	44,193955	1,051716	NGS
MQ17-21	Random	Fallow	44,204496	1,066145	NGS
MQ17-22	Random	Soybean	44,201579	1,057947	NGS
MQ17-23	Random	Meadow	44,219931	1,026018	NGS
MQ17-24	Random	Sunflower	44,214233	1,024861	NGS
MQ17-25	Random	Sunflower	44,208992	1,032941	NGS
MQ17-26	Random	Sunflower	44,199318	1,042670	NGS
MQ17-27	Random	Wheat stubble	44,196972	1,025101	NGS
MQ17-28	Random	Soybean	44,198008	1,025249	NGS
MQ17-29	Random	Sunflower	44,170278	1,029623	NGS
MQ17-30	Random	Wheat stubble	44,173169	1,041267	NGS
MQ17-31	Random	Wheat stubble	44,173038	1,038955	NGS
MQ17-32	Random	Sunflower	44,170467	1,023622	NGS
MQ17-33	Random	Sunflower	44,172525	1,022602	NGS
MQ17-34	Random	Soybean	44,186963	1,025867	NGS
MQ17-35	Random	Wheat stubble	44,190008	1,023887	NGS
MQ17-36	Random	Sunflower	44,187934	1,025057	NGS
MQ17-37	Random	Sunflower	44,194541	1,018822	NGS
MQ17-38	Random	Sunflower	44,194795	1,016994	NGS
MQ17-39	Random	Wheat stubble	44,201321	1,022153	NGS
MQ17-40	Random	Wheat stubble	44,202659	1,020587	NGS
MQ17-41	Random	Alfalfa	44,215490	1,011077	NGS
MQ17-42	Random	Alfalfa	44,216519	1,011752	NGS
MQ17-43	Random	Soybean	44,194834	1,012978	NGS
MQ17-44	Random	Sunflower	44,204171	0,996717	NGS
MQ17-45	Random	Chickpea	44,204326	0,995147	NGS
MQ17-46	Random	Wheat stubble	44,200891	0,988763	NGS
MQ17-47	Random	Wheat stubble	44,199547	0,987884	NGS
MQ17-48	Random	Sunflower	44,160828	0,958114	NGS
MQ17-49	Random	Sunflower	44,160747	0,960740	NGS
MQ17-50	Random	Sunflower	44,166268	0,958023	NGS

MQ17-51	Random	Wheat stubble	44,172087	0,956604	NGS
MQ17-52	Random	Soybean	44,177690	0,965380	NGS
MQ17-53	Random	Wheat stubble	44,200576	0,967902	NGS
MQ17-54	Random	Soybean	44,202351	0,970998	NGS
MQ17-55	Random	Sunflower	44,202859	0,978420	NGS
MQ17-56	Random	Wheat stubble	44,203216	0,977523	NGS
MQ17-57	Random	Sunflower	44,222972	0,992192	NGS
MQ17-58	Random	Wheat stubble	44,236604	0,985166	NGS
MQ17-59	Random	Wheat stubble	44,240647	0,979142	NGS
MQ17-60	Random	Wheat stubble	44,251464	0,975897	NGS
MQ17-61	Random	Sunflower	44,255569	0,976884	NGS
MQ17-62	Random	Wheat stubble	44,258069	0,983629	NGS
MQ17-63	Random	Melon	44,244915	1,032987	NGS
MQ17-64	Random	Oilseed rape	44,265087	1,094650	NGS
MQ17-65	Random	Wheat stubble	44,273370	1,107012	NGS
PC17-01	Random	Wheat stubble	46,182151	-0,222130	NGS
PC17-02	Random	Sunflower	46,151044	-0,202954	NGS
PC17-03	Random	Sunflower	46,142410	-0,184238	NGS
PC17-04	Random	Chickpea	46,130308	-0,095219	NGS
PC17-05	Random	Sunflower	46,112535	-0,040764	NGS
PC17-06	Random	Wheat stubble	46,119820	-0,026535	NGS
PC17-07	Random	Sunflower	46,120200	-0,018532	NGS
PC17-08	Random	Sunflower	46,147958	0,018002	NGS
PC17-09	Random	Sunflower	46,156089	0,064234	NGS
PC17-10	Random	Sunflower	46,166116	0,082196	NGS
PC17-11	Random	Wheat stubble	46,150581	0,085795	NGS
PC17-12	Random	Sunflower	46,147094	0,080744	NGS
PC17-13	Random	Sunflower	46,082489	0,008091	NGS
PC17-14	Random	Sunflower	46,076000	-0,006604	NGS
PC17-15	Random	Wheat stubble	46,041074	-0,140859	NGS
PC17-16	Random	Sunflower	46,043339	-0,088721	NGS
PC17-17	Random	Sunflower	45,997123	-0,168980	NGS
PC17-18	Random	Sunflower	45,733122	0,245994	NGS
PC17-19	Random	Sunflower	45,806488	0,218589	NGS
PC17-20	Random	Pea	45,809517	0,332826	NGS

PC17-21	Random	Sunflower	45,819521	0,343375	NGS
PC17-22	Random	Sunflower	45,853977	0,334529	NGS
PC17-23	Random	Sunflower	45,864918	0,327176	NGS
PC17-24	Random	Sunflower	45,885123	0,290246	NGS
PC17-25	Random	Wheat stubble	45,598926	0,051204	NGS
PC17-26	Random	Sunflower	45,569000	0,033768	NGS
PC17-27	Random	Sunflower	45,564892	0,037870	NGS
PC17-28	Random	Wheat stubble	45,576583	0,057114	NGS
PC17-29	Random	Sunflower	45,576690	0,056728	NGS
PC17-30	Random	Wheat stubble	45,563426	0,061419	NGS
PC17-31	Random	Sunflower	45,559104	0,145552	NGS
PC17-32	Random	Wheat stubble	45,564853	0,150336	NGS
PC17-33	Random	Sunflower	45,539178	0,171303	NGS
PC17-34	Random	Wheat stubble	45,527466	0,193109	NGS
PC17-35	Random	Sunflower	45,541167	0,200019	NGS
PC17-36	Random	Sunflower	45,553572	0,204957	NGS
PC17-37	Random	Sunflower	45,546762	0,259037	NGS
PC17-38	Random	Millet	45,483924	0,275197	NGS
PC17-39	Random	Sunflower	45,476486	0,277393	NGS
PC17-40	Random	Sunflower	45,440067	0,311016	NGS
PC17-41	Random	Oilseed rape	45,426280	0,263124	NGS
PC17-42	Random	Meadow	45,431205	0,229602	NGS
PC18-01	Random	Wheat stubble	46,331783	0,198783	NGS
PC18-02	Random	Sunflower	46,245333	0,062683	NGS
PC18-03	Random	Sunflower	46,171483	0,131283	NGS
PC18-04	Random	Wheat stubble	46,034150	-0,011600	NGS
PLA	Random	Sunflower	46,996674	2,455291	NGS
ROU	Random	Wheat stubble	47,424010	4,102647	NGS
SEP	Random	Sunflower	47,942472	3,234622	NGS
SGB	Random	Sunflower	46,912707	2,453450	NGS
Suppl	Random	Sunflower	44,186343	1,006855	NGS
THU	Random	Wheat stubble	47,031101	4,529643	NGS
VOR	Random	Sunflower	46,944955	2,463546	NGS
ARA1	Targeted	Soybean	45,758139	5,161278	Sanger
ARA2	Targeted	Sunflower	45,800988	5,075818	Sanger
ARA3	Targeted	Soybean	45,794461	5,065597	Sanger
ARA4	Targeted	Soybean	45,101389	5,228056	Sanger
ARA5	Targeted	Soybean	45,725972	5,202361	Sanger

ARA6	Targeted	Soybean	45,601417	5,347583	Sanger
ARA7	Targeted	Soybean	45,638806	5,251528	Sanger
ARA8	Targeted	Soybean	45,792167	5,065716	Sanger
CVL1	Targeted	Sunflower	46,973859	2,447738	Sanger
CVL2	Targeted	Sunflower	47,075199	0,638983	Sanger
CVL3	Targeted	Sunflower	46,962162	2,930843	Sanger
CVL4	Targeted	Sunflower	46,844584	2,598025	Sanger
CVL5	Targeted	Sunflower	47,105292	0,553333	Sanger
NAQ1	Targeted	Sunflower	45,389672	-0,273181	Sanger
NAQ10	Targeted	Sunflower	45,452378	-0,147300	Sanger
NAQ11	Targeted	Sunflower	46,083350	0,008020	Sanger
NAQ12	Targeted	Sunflower	46,077970	0,007924	Sanger
NAQ13	Targeted	Sunflower	45,381495	0,019838	Sanger
NAQ14	Targeted	Sunflower	45,863923	0,326532	Sanger
NAQ15	Targeted	Sunflower	46,034848	-0,008566	Sanger
NAQ16	Targeted	Sunflower	45,351020	-0,361244	Sanger
NAQ2	Targeted	Sunflower	45,740740	0,437930	Sanger
NAQ3	Targeted	Sunflower	46,366602	-0,555944	Sanger
NAQ4	Targeted	Sunflower	46,067316	0,010980	Sanger
NAQ5	Targeted	Sunflower	45,572938	0,083355	Sanger
NAQ6	Targeted	Sunflower	45,437643	-0,169968	Sanger
NAQ7	Targeted	Sunflower	45,605556	0,336389	Sanger
NAQ8	Targeted	Sunflower	45,576690	0,056728	Sanger
NAQ9	Targeted	Sunflower	45,270260	0,004670	Sanger
OCC1	Targeted	Sunflower	44,275346	1,136493	Sanger
OCC10	Targeted	Soybean	44,184150	1,017917	Sanger
OCC11	Targeted	Soybean	43,622194	1,692528	Sanger
OCC12	Targeted	Soybean	44,347222	1,117244	Sanger
OCC13	Targeted	Soybean	44,229483	1,078733	Sanger
OCC2	Targeted	Soybean	44,262000	1,061700	Sanger
OCC3	Targeted	Sunflower	44,191361	1,045667	Sanger
OCC4	Targeted	Soybean	43,793889	1,819722	Sanger
OCC5	Targeted	Sunflower	44,187500	1,028400	Sanger
OCC6	Targeted	Soybean	43,094351	1,846913	Sanger
OCC7	Targeted	Sunflower	44,219931	1,026018	Sanger
OCC8	Targeted	Soybean	44,348739	1,081889	Sanger
OCC9	Targeted	Soybean	43,977512	0,988816	Sanger
PDL1	Targeted	Sunflower	47,787500	0,229200	Sanger

Résultats complémentaires au
Chapitre 1 : Évaluation de l'efficacité
de différents modes d'action sur une
population présentant des
mécanismes de RNLC au tribénuron

Dans le chapitre précédent (**Chapitre 1**), nous avons montré que la RNLC est le principal mécanisme en cause dans la résistance aux inhibiteurs de l'ALS de l'ambrosie en France. Une des particularités de la RNLC est qu'elle peut être non spécifique d'un mode d'action herbicide donné et peut engendrer des phénomènes de résistance croisée inter-modes d'action. Dans ce cas, un mécanisme de RNLC qui a évolué sous la pression sélective d'une substance active donnée engendre de la résistance à d'autres modes d'action. Ce phénomène imprévisible menace l'efficacité des solutions chimiques existantes et à venir (Gaines, Busi, et Küpper 2021). Il est donc intéressant d'évaluer si les mécanismes de résistance qui ont évolué pour une substance active donnée engendrent de la résistance croisée à d'autres substances actives.

Pour explorer cette hypothèse dans le cas de la RNLC ayant évolué chez l'ambrosie, des tests biologiques complémentaires ont été réalisés pour différents modes d'action sur une population, NAQ8, pour laquelle nous avons précédemment observé de la RNLC au tribénuron. De plus, cette population est celle pour laquelle nous avons mesuré la fréquence de résistance la plus élevée au tribénuron ([Tableau 2 Chapitre 1](#)). Nous avons donc supposé que dans cette population, par rapport aux autres, les mécanismes de RNLC sont plus évolués et peuvent conduire à des phénomènes de résistance croisée. Nous avons testé sur cette population :

- Deux autres substances actives du groupe des inhibiteurs de l'ALS, le metsulfuron, une autre sulfonylurée, et le florasulame, une triazolopyrimidine
- Un inhibiteur de l'EPSP synthase, le glyphosate
- Un herbicide « auxinique » (mimétique de l'auxine végétale naturelle) composé d'un mélange d'halauxifen et d'aminopyralide.

Les doses testées pour chacune de ces substances actives sont renseignées dans le tableau ci-après (Tableau 3). Les conditions expérimentales des tests biologiques réalisés sont identiques à celles présentées dans le **Chapitre 1**.

Les résultats présentés dans le Tableau 3 et la Figure 13 indiquent que dans cette population, les plantes testées sont exclusivement résistantes aux herbicides de la famille des sulfonylurées. Les niveaux de résistance mesurés sont élevés jusqu'à quatre fois la dose maximale recommandée pour le tribénuron et jusqu'à deux fois pour le metsulfuron (Tableau 3, Figure 13 (A)). Les mécanismes de RNLC qui ont évolué dans cette population ne confèrent pas de résistance aux doses testées d'imazamox ou de florasulame (Tableau 3, Figure 13 (B)), aux herbicides auxiniques (Tableau 3, Figure 13 (C)) ou au glyphosate (Tableau 3, Figure 13 (D)). De plus dans le cas du glyphosate, des plantes préalablement traitées au tribénuron à la dose maximale recommandée et identifiées comme résistantes à cette

substance ont par la suite été traitées à la dose recommandée de glyphosate. 100% des plantes résistantes au tribénuron sont sensibles au glyphosate (Figure 13, (D)). Les mécanismes de RNLC qui ont évolué dans cette population semblent spécifiques aux sulfonylurées.

Cette population a été prélevée dans une parcelle de tournesol de variété Express Sun. L'historique d'assolement indique une rotation courte, où cette variété est implantée tous les deux ans. L'application répétée du tribénuron au fil des ans est très vraisemblablement à l'origine de la sélection de ces mécanismes de RNLC et a conduit à un profil de résistance spécifique aux sulfonylurées.

Ce type de résultat a déjà été observé chez l'ambrosie au cours d'une expérience de sélection récurrente (Meyer et al. 2022). Dans leur expérience, l'application d'herbicides des familles des sulfonylurées et des imadazolinones a conduit à la sélection de mécanismes de RNLC en partie communs à ces deux familles (résistance à l'imazamox observée après deux cycles de sélection au metsulfuron) et en partie spécifiques (résistance au tribénuron et au metsulfuron uniquement après deux cycles de sélection à ces deux herbicides).

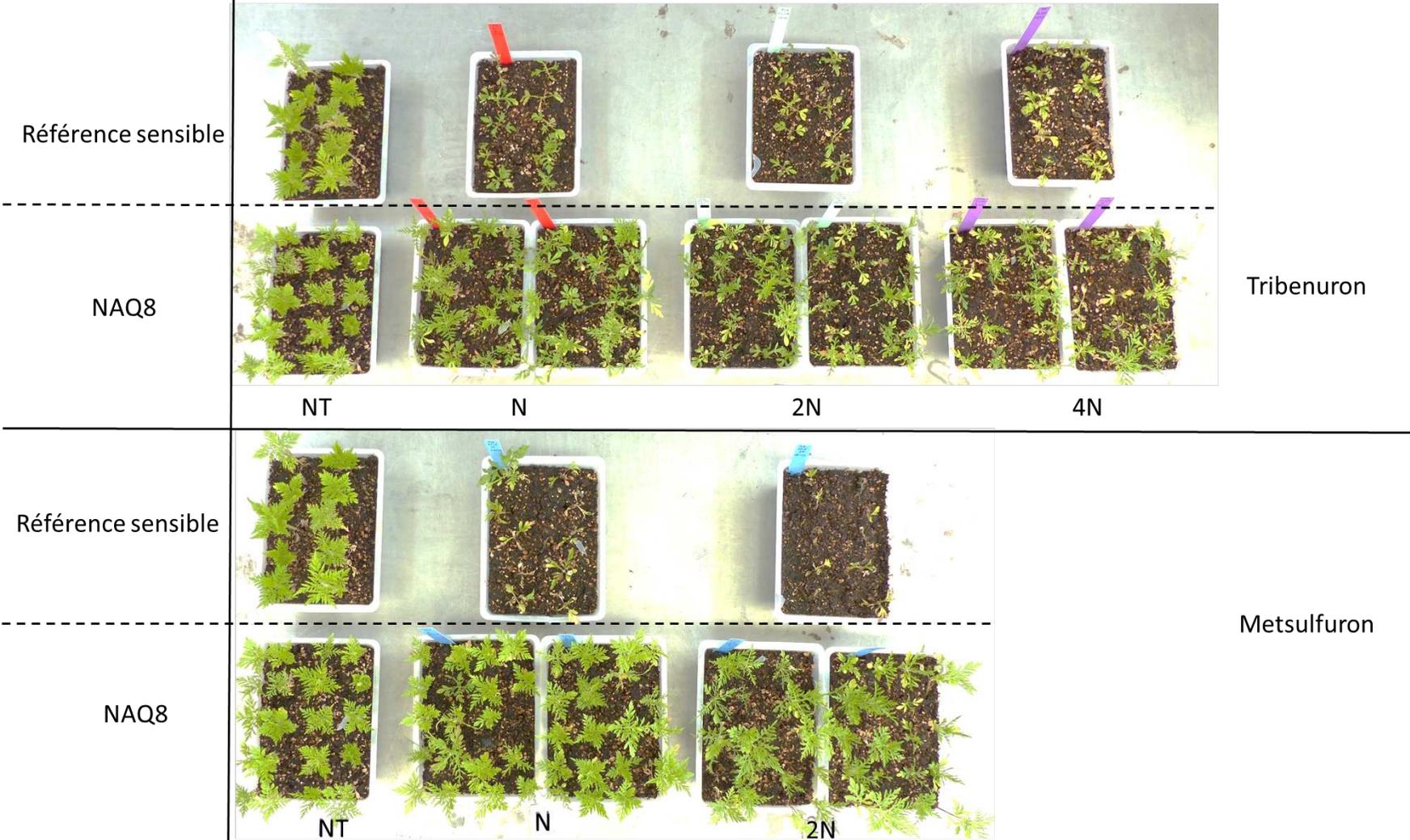
Tableau 3 : Efficacité de quatre inhibiteurs de l'ALS (tribénuron, imazamox, florasulame et metsulfuron), un inhibiteur de l'EPSP synthase (glyphosate) et un mélange d'herbicide auxinique (halauxifen/aminopyralide) sur une population d'ambrosie (NAQ8) présentant une forte fréquence de résistance au tribénuron en raison de mécanismes de RNLC.

SUBSTANCE ACTIVE	DOSE (G A.I./HA)	FREQUENCE DE RESISTANCE
TRIBENURON	30*	0,43
	60	0,36
	120	0,28
IMAZAMOX	50*	0
FLORASULAM	7.5 g*	0
METSULFURON-METHYL	4 g*	0,95
	8g	0,78
HALAUXIFEN/AMINOPYRALID	**	0
GLYPHOSATE	720 g**	0

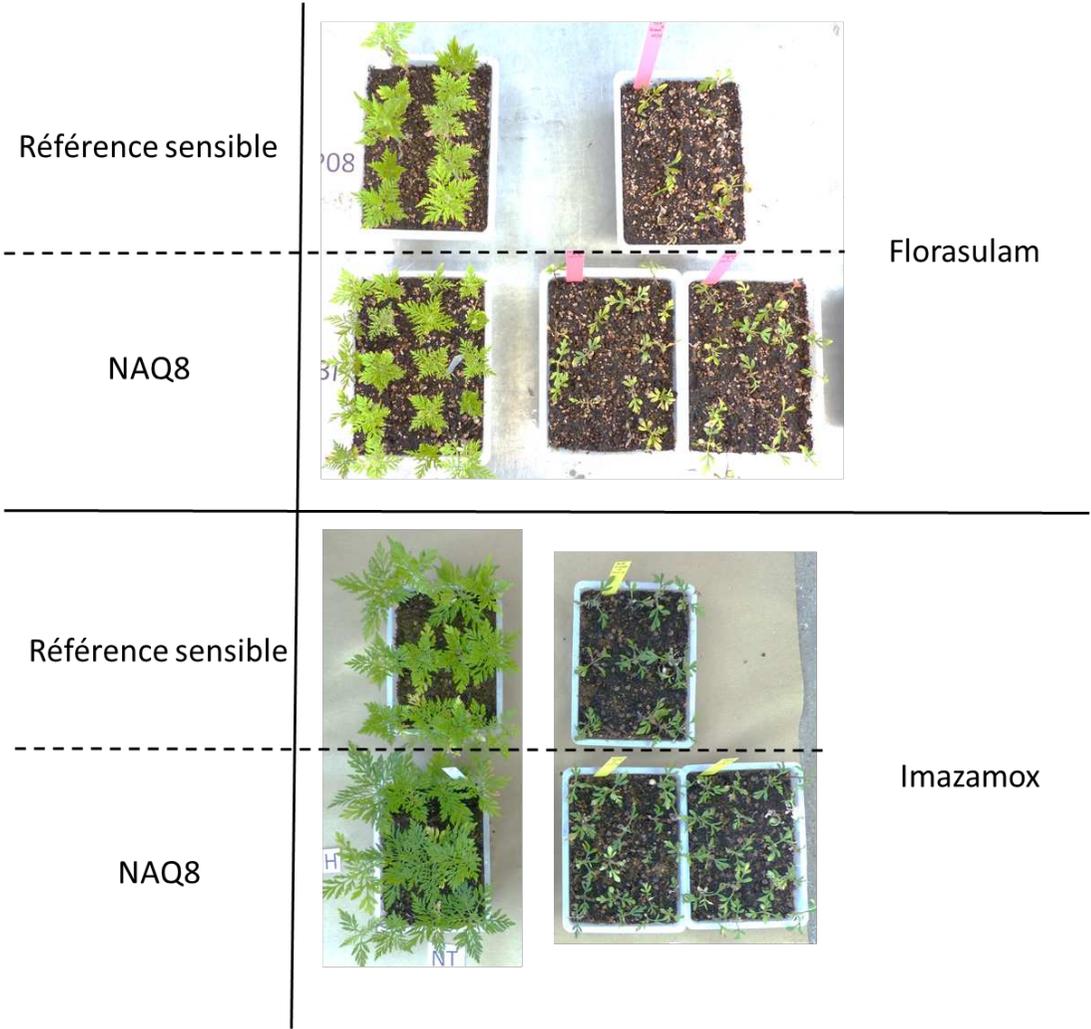
*dose maximale autorisée en France

** Dose recommandée pour contrôler l'ambrosie en France

(A)



(B)



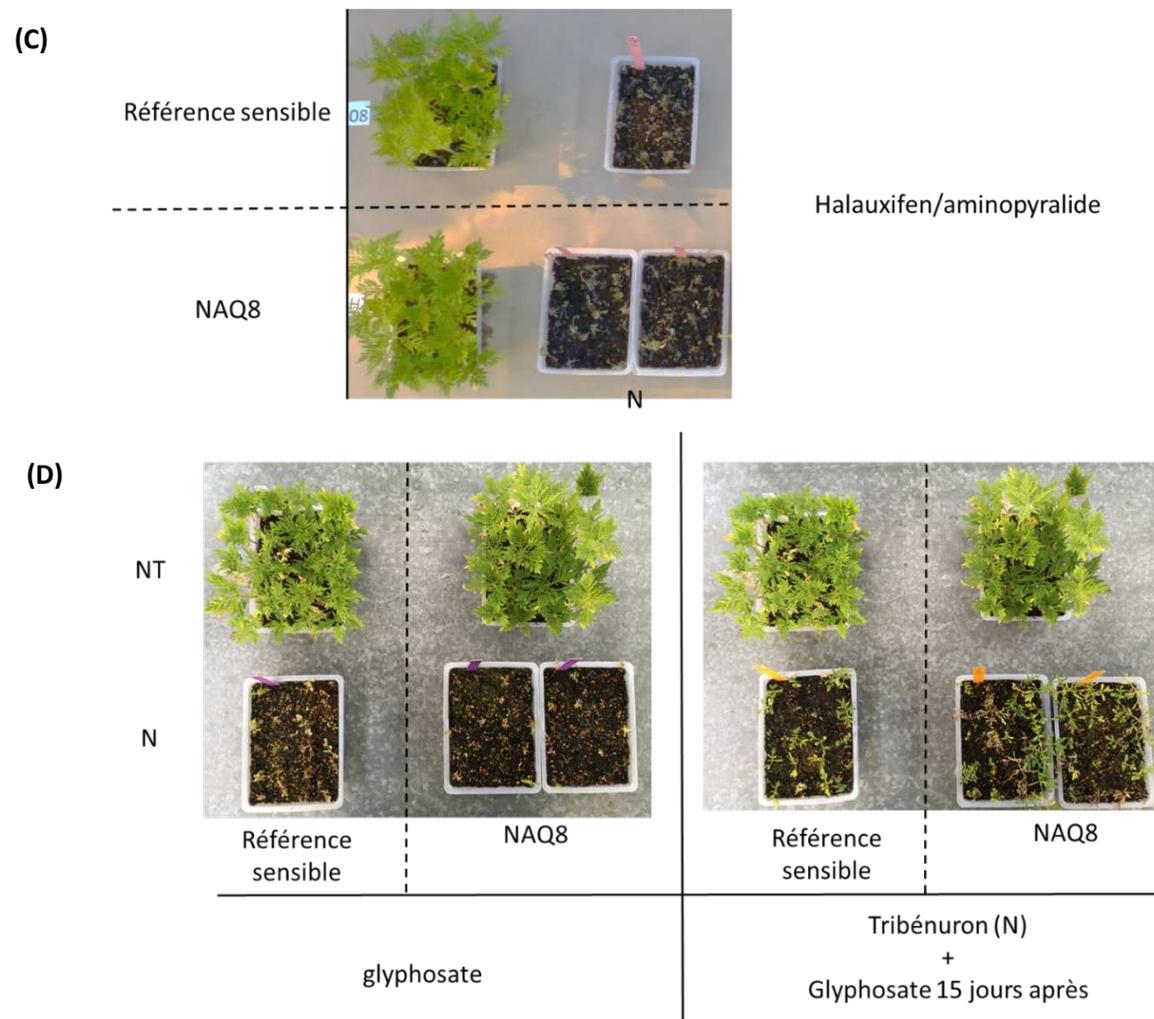


Figure 13 : Photos des tests d'efficacité de quatre inhibiteurs de l'ALS (tribénuron, imazamox, florasulame et metsulfuron), un inhibiteur de l'EPSP synthase (glyphosate) et un mélange d'herbicides auxiniques (halauxifen+aminopyralide) sur une population d'ambroisie (NAQ8) présentant une forte fréquence de résistance au tribénuron en raison de mécanismes de RNLC. NT : non traité, N : dose maximale autorisée au champ en France, xN : x fois la dose au champ

Points clés et transition

La résistance de l'ambrosie en France est une réalité du terrain qui menace l'efficacité des inhibiteurs de l'ALS, les herbicides post-levée les plus efficaces pour contrôler l'ambrosie dans les cultures d'été particulièrement vulnérables à son infestation que sont le tournesol et le soja. L'évolution de cette résistance semble récente et les fréquences de résistance mesurées demeurent en majorité faibles, indiquant que la résistance est encore en phase d'émergence. Les deux grandes catégories de résistance (RLC et RNLC) sont en cause. Dans le cas de la RLC, une très grande diversité d'allèles mutants de l'ALS a été détectée. Les origines évolutives de ce mécanisme sont multiples et indépendantes. La RNLC est cependant le mécanisme dominant sur le territoire. L'évaluation des profils de résistance des différentes populations montre que les mécanismes de RNLC qui ont évolué dans ces différentes populations peuvent être spécifiques à une substance active donnée.

Dans ce contexte de résistance émergente, son diagnostic est primordial afin d'éviter qu'elle ne se généralise. Si le diagnostic de la RLC est aujourd'hui possible et réalisable à grande échelle grâce au génotypage de l'ALS par séquençage à « haut-débit » comme nous l'avons montré, celui de la RNLC par séquençage « haut-débit » reste impossible par cette méthode en raison de l'absence de connaissances sur ses déterminismes génétiques.

Dans le chapitre suivant, nous avons donc cherché à identifier des gènes impliqués dans la RNLC de l'ambrosie aux inhibiteurs de l'ALS ainsi que des marqueurs moléculaires caractéristiques de sa présence. Cette étude nous permettra d'améliorer notre compréhension des mécanismes de RNLC pouvant évoluer chez l'ambrosie, mais également d'utiliser ces marqueurs à des fins de diagnostic. Nous nous sommes pour cela appuyés sur le transcriptome de l'ambrosie assemblé lors de précédents travaux de recherche. Comme nous l'avons démontré dans le cas de la RLC, il existe une diversité de trajectoires évolutives dans la résistance vis-à-vis des inhibiteurs de l'ALS chez l'ambrosie. Nous avons donc formulé l'hypothèse que cela pouvait également s'appliquer aux phénomènes de RNLC. C'est pourquoi, nous avons choisi l'approche originale d'étudier plusieurs populations provenant de différentes origines géographiques et présentant des profils de résistance différents à l'imazamox et au tribénuron.

Deuxième partie : recherche des déterminismes génétiques de la résistance non liée à la cible aux inhibiteurs de l'ALS chez *Ambrosia artemisiifolia* L. par une approche transcriptomique

Chapitre 2 : Déterminismes
génétiques de la résistance non liée à
la cible aux inhibiteurs de l'ALS chez
Ambrosia artemisiifolia L. : une
analyse transcriptomique révèle
l'évolution d'une diversité de
mécanismes au sein de multiples
populations en France

Ce chapitre rédigé avec la structure d'une publication scientifique, sera soumis prochainement à une revue internationale à comité de lecture.

Introduction

L'ambrosie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia* L.) est une espèce envahissante d'origine Nord-Américaine (Bassett & Crompton 1975), introduite en Europe et en France à de multiples reprises (Kiss et Béres 2006 ; Chauvel et al. 2006 ; Gladieux et al. 2011). En raison de son pollen hautement allergène et allergisant, la dissémination et la prolifération de l'ambrosie sont des préoccupations majeures pour la santé publique (Smith et al. 2013). Largement dispersée par les activités humaines à courte et à longue distance (Essl et al. 2015 ; Lemke, Kowarik, et Lippe 2019), l'ambrosie colonise différents milieux perturbés régulièrement par l'homme (Essl et al. 2015). Elle est notamment retrouvée en milieu agricole, dans les cultures d'été comme le maïs, le soja ou le tournesol où en tant qu'adventice, elle entre en compétition pour les ressources avec les cultures (Bassett & Crompton 1975). Appartenant à la même famille botanique que le tournesol, celle des *Asteraceae*, son contrôle y a été compliqué jusqu'à la commercialisation de variétés dites « tolérantes » aux inhibiteurs de l'ALS (Reisinger et al. 2014). En France, deux technologies sont commercialisées : Clearfield/ClearfieldPlus de BASF et ExpressSun de Dupont. Chacune de ces technologies associe une variété de tournesol avec un herbicide de la famille des inhibiteurs de l'ALS (l'imazamox et le tribénuron, respectivement). Si la mise en place de ces cultures a permis de faciliter le contrôle de l'ambrosie en tournesol, elle a également augmenté le risque de voir évoluer de la résistance à ce mode d'action herbicide en raison de la pression de sélection exercée par les applications récurrentes d'un même mode d'action (Bonny 2016 ; Vencill et al. 2012). En conséquence, trois ans après la commercialisation de ces variétés, les premiers cas de résistance ont été observés au champ (Meyer et al. 2022). Les deux types de mécanismes de résistance, lié à la cible (RLC) et non lié à la cible (RNLC) sont en cause (Loubet et al., 2021). La RLC est monogénique, le plus souvent liée à une mutation fonctionnelle dans le gène de l'ALS qui altère l'activité de l'acétolactate-synthase, une enzyme clé dans la synthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (Duggleby, McCourt, et Guddat 2008). Plusieurs mutations fonctionnelles dans le gène de l'ALS ont été identifiées dans des plantes originaires de différentes populations de France (Loubet et al., 2021). Cependant, la RLC n'est pas majoritaire, et il a été montré que la RNLC est le principal type de résistance en cause (Loubet et al. 2021 ; Meyer et al. 2022). De plus, il a été observé que des plantes originaires de différentes populations ne présentent pas le même profil de résistance à l'imazamox et au tribénuron : selon la population, la résistance à une seule des deux substances actives ou bien aux deux a pu être détectée (Loubet et al. 2021 ; Meyer et al. 2022). Ce résultat laisse penser que différents mécanismes de RNLC ont pu évoluer dans ces différentes populations. À l'opposé de la RLC, les déterminismes génétiques de la RNLC sont polygéniques et considérés comme le résultat de l'accumulation d'allèles d'expression et/ou structuraux permettant de réduire la quantité d'herbicide capable d'atteindre sa cible (Délye 2013).

Chapitre 2

L'essor des techniques « omiques » offre l'opportunité d'explorer les déterminismes génétiques de ce trait complexe (Patterson et al. 2019). En particulier, les approches de transcriptomique permettent de mesurer les différences d'expression entre les plantes résistantes et sensibles qui peuvent être à la base de mécanismes de RNLC constitutifs ou induits par l'herbicide (Délye 2013). De nombreuses études visant à identifier les déterminismes génétiques de la RNLC chez différentes espèces adventices pour différents herbicides ont été conduites (Tableau 4).

Chapitre 2

Tableau 4 : Études transcriptomiques conduites à ce jour visant à identifier les déterminismes génétiques de la RNLC chez différentes espèces adventices pour différents modes d'action herbicide

Weed - Scientific Name	Herbicide mode of action group	Active substance	Reference	Replicate Number	Treatment ^a	Origin	Number of population studied	Origin of plants used for validation experiment ^b	Number of additional plant material for validation ^c	Number of contigs selected for validation	Number of contig validated by statistics tests (T test, Wilcoxon test, correlation test)
<i>Alopecurus aequalis</i> Sobol.	ALS inhibitor	mesosulfuron	Zhao et al. 2019	3	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	RNaseq + additional material	NR	31	17
<i>Alopecurus myosuroides</i>	ACCcase inhibitor/inhibitor of tubulin assembly	pendimethalin, fenoxaprop	Franco-Ortega et al. 2021	5	BT	Field population, F1 population	3, 1 from field, 2 F1	None	None	0	0
<i>Alopecurus myosuroides</i>	ALS inhibitor	iodosulfuron + mesosulfuron	Gardin et al. 2015	1	BT, AT	F2 population	1	RNaseq + additional material	29	21	5
<i>Amaranthus tuberculatus</i>	HPPD inhibitor	mesotrione	Kohlhase et al. 2019	1	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	None	None	0	0
<i>Avena fatua</i>	ACCcase/ALS inhibitor	pinoxaden	Keith et al. 2017	3	BT	Recurrent selection, F2	1 R compared to 1 S	F2, F3	NR	23	no statistical analysis performed
<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCcase inhibitor	fenoxaprop	Bai et al. 2020	3	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	additional material	NR	12	10
<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCcase inhibitor	fenoxaprop	Pan et al. 2016	1	BT	Field populations	3 F1 R compared to 3 F1 S	RNaseq	None	15	15

Chapitre 2

<i>Beckmannia syzigachne</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Wang et al. 2021	3	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	RNASeq	None	11	4
<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Zhang et al. 2021	3	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	RNASeq + additional material	NR	37	11
<i>Conyza bonariensis</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Piasecki et al. 2019	3	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	RNASeq	None	19	19
<i>Conyza canadensis</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Yang et al. 2021	6 to 8	AT	Field populations	1 R compared to 1 S	RNASeq	None	8	5
<i>Descurainia sophia</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Yang et al. 2016	2	BT	Field populations	1 R compared to 1 S	RNASeq + additional material	12 per biotype	26	4
<i>Descurainia sophia L</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Yang et al. 2018	1	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	additional material	90	4	4
<i>Echinochloa colona</i>	ACCCase/ALS/photosynthese inhibitor/auxinic	imazamox, fenoxaprop, quinclorac and propanil	Wright, Rodriguez-Carres, et al. 2018	3	BT	Field populations	1 R compared to 1 S	RNASeq + additional material from 2 other populations	NR	16	4
<i>Echinochloa colona</i>	ALS inhibitor	imazamox	Wright, Sasidharan, et al. 2018	3	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	RNASeq + additional material from 2 other populations	5 to 6 per biotype	5	4
<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	Penoxsulam	Fang et al. 2019	3	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	additional material	NR	36	30
<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS and auxinic inhibitor	quinclorac, penoxsulam, bispyribac-sodium	Yang, Yu et Li 2013	1	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	None	None	0	0

Chapitre 2

<i>Eleusine indica</i>	Photosynthese inhibitors	paraquat	An et al. 2014	1	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	None	None	0	0
<i>Eleusine indica</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Chen et al. 2017	3	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	RNASeq	None	20	no statistical analysis performed
<i>Euphorbia esula</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Doğramacı et al. 2015	4	BT, AT	Uniform biotype	1 R compared to 1 S	RNASeq	None	16	no statistical analysis performed
<i>Ipomoea purpurea</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Leslie et Baucom 2014	3	BT, AT	Recurrent selection	1 R compared to 1 S	RNASeq	None	14	14
<i>Lolium multiflorum</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Cechin et al. 2020	3	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	RNASeq	None	13	13
<i>Lolium rigidum</i>	ALS inhibitor	pyroxsulam / iodosulfuron + mesosulfuron	Duhoux et al. 2015	1	BT, AT	Field populations	1	RNASeq + additional material from 15 field populations	212 plants from 15 fields populations	19	4
<i>Lolium rigidum</i>	ACCase inhibitor	diclofop	Gaines et al. 2014	4	BT, AT	Recurrent selection	1 R compared to 1 S	additional material	NR	28	4
<i>Lolium rigidum</i>	ACCase/ALS inhibitor	diclofop, chlorsulfuron, tralkoxydim, mesotrione, atrazine, chlorotoluron and pre-emergence herbicide trifluralin	Han et al. 2021	4	BT	Field populations F2 population	1 field population + 1 F2	parallel material + 8 others populations	5S, 4R, 6F2S, 10F2R + 5 or 3 / 8 populations	13	8
<i>Lolium sp.</i>	ALS inhibitor	pyroxsulam / iodosulfuron + mesosulfuron	Duhoux et al. 2017	8	BT	Field populations F1 population	2 fields population and 2 F1 populations	RNASeq + additional material	219	27	19

Chapitre 2

<i>Myosoton aquaticum</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Liu et al. 2018	3	BT, AT	F2 population	1 R compared to 1 S	RNASeq + additional material		34	14
<i>Myosoton aquaticum L.</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Bai et al. 2018	3	BT, AT	F1	1 R compared to 1 S	RNASeq + additional material	3/modalité	25	15
<i>Poa annua</i>	ALS inhibitor	trifloxysulfuron	Laforest et al. 2021	5	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	additional material	10 / modalité	3	2
<i>Polypogon fugax</i>	ACCase inhibitor	fenoxaprop	Zhao et al. 2021	3	BT, AT	Field populations	1 R compared to 1 S	RNASeq + additional material from F1 population	3 per modality	28	17

^a BT = before treatment; AT = after treatment

^b Origin of the plants selected for validation experiment of the RNASeq fold-change; None = no validation experiment was performed

^c NR = not reported

En ce qui concerne les mécanismes de résistance observés chez différentes espèces aux inhibiteurs de l'ALS (résumé par Gaines et al. 2020), la majorité des mécanismes de RNLC identifiés jusqu'ici pour ce mode d'action est due à une métabolisation exacerbée de l'herbicide, impliquant souvent des enzymes de plusieurs familles de cytochromes P450 (*e.g.* Duhoux et al. 2015 ; Yang et al. 2018 ; Wang et al. 2021 ; Han et al. 2021). Comme souligné par Gaines et al. (2020), la plupart des études se limitent à sélectionner les candidats les plus évidents qui sont souvent des gènes codants pour des enzymes du métabolisme de détoxification. En se limitant ainsi, seule une partie des mécanismes peut être identifiée. Rien n'indique que d'autres mécanismes ne soient pas impliqués dans le RNLC aux inhibiteurs de l'ALS. De plus, les expériences de RNASeq restant onéreuses, le nombre et la diversité de plantes étudiées sont souvent limités à une poignée d'individus (Tableau 4). Très peu d'études prouvent que les niveaux d'expression mesurés en RNASeq pour des plantes résistantes d'une population se généralisent à d'autres plantes résistantes provenant de populations différentes. Aussi, la plupart des études comparent les profils d'expression de plantes résistantes issues d'une population et de plantes sensibles d'une autre population qui n'ont pas évolué dans le même environnement (Tableau 4). Ce type de plan expérimental peut conduire à l'identification de gènes différemment exprimés liés à l'adaptation locale à l'environnement de chaque population et non à la RNLC (Giacomini et al. 2018). La validation des niveaux d'expression est donc une étape cruciale (Giacomini et al. 2018). Cependant, lorsqu'elle est effectuée, cette validation est rarement effectuée sur des échantillonnages importants de plantes provenant d'autres populations (Tableau 4). Ainsi les candidats identifiés par ces études sont difficilement généralisables à l'échelle d'une espèce ; ils ne permettent pas d'appréhender la diversité des mécanismes ayant pu évoluer dans différentes populations d'une espèce donnée en réponse à une pression de sélection herbicide.

Dans ce chapitre, nous proposons d'explorer les mécanismes de RNLC constitutifs et/ou induits par le traitement ayant évolué dans six populations d'ambrosie provenant de différentes origines géographiques en France et présentant des profils de résistance différents pour deux familles chimiques des inhibiteurs de l'ALS (imazamox, une imidazolinone, et tribénuron, une sulfonlurée). Après avoir assemblé le premier transcriptome d'ambrosie, les profils d'expression avant traitement et deux heures après traitement des plantes résistantes et sensibles de chaque population ont été comparés dans le but d'identifier les mécanismes de la RNLC ayant évolué dans chacune de ces populations. L'exploitation des résultats a permis d'identifier des gènes candidats dont le niveau d'expression est différent entre plantes résistantes et sensibles de manière constitutive et/ou induite par le traitement. Le diagnostic de la résistance sur le terrain avant l'application d'un traitement étant un élément crucial pour sa gestion, nos candidats constitutifs ont été évalués comme marqueurs de la RNLC grâce à un modèle statistique d'auto-apprentissage. Enfin, nous avons estimé la diversité intra-

population des mécanismes de résistance grâce à la mesure de l'expression des gènes candidats constitutifs sur un échantillonnage massif de plantes.

Matériel et méthodes

Assemblage d'un transcriptome de référence pour l'ambroisie : l'AMBELbase²

Séquençage PacBio

Le transcriptome a été séquencé à partir d'une plante provenant de la population P08, une population échantillonnée en France à Pluvet (Côte d'Or) qui n'a jamais subi de traitement herbicide (100 % de plantes sensibles à tout herbicide utilisé pour lutter contre l'ambroisie et appliqué à la dose recommandée en France). Les ARN totaux de trois plantes de cette population ont été extraits à l'aide du kit Direct-zol RNA MiniPrep (Zymo research) en suivant les instructions fournies. La concentration de l'ARN total et la pureté des échantillons (valeurs de ratios comprises en 1,8 et 2,2) a été vérifiée à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop (LABTECH, Luton, UK). L'intégrité des ARNs a été vérifiée par mesure du RIN (RNA Integrity Number > 7,5) à l'aide d'une puce Bioanalyser (Bioanalyser RNA 6000 Nano-Agilent). L'ARNm a été extrait avec le kit AMBION Purist Mag en suivant les instructions fournies. Les trois échantillons d'ARNm ont été envoyés à la plateforme GenoToul (INRAE Toulouse) pour le séquençage PacBio (Pacific BioSciences). Après un contrôle qualité, l'échantillon de meilleure qualité a été utilisé pour le séquençage. Le séquençage PacBio a été réalisé à l'aide du séquenceur RSII (Pacific BioScience).

Assemblage

L'assemblage *de novo* a été réalisé par la plateforme bio-informatique du LIPME, INRAE de Toulouse. La première étape a consisté à assembler les séquences obtenues pour les 8 cellules SMRT (Single Molecule Real Time sequencing) en triant les transcrits par tranche de taille et en supprimant la redondance à l'aide du pipeline PacBIO RS_IsoSeq.1. La redondance a été supprimée à l'aide du programme nrcl (identité minimale : 99 % ; chevauchement maximal = 50 nucléotides). Le cadre de lecture des contigs ont ensuite été prédits à l'aide de FrameDP, puis annotés en utilisant Uniprot-Plants, la base de données du protéome du tournesol (Badouin et al., 2017) et la base de données non redondante du NCBI (NR). Blast2GO a été utilisé pour l'annotation des domaines fonctionnels des peptides prédits par FrameDP en utilisant InterProScan (Quevillon et al., 2005) et en incluant les termes

² Le transcriptome de référence a été assemblé dans le cadre de la thèse de L. Meyer (2018). Nous l'avons incorporé à ce chapitre afin de le publier, en même temps que les données acquises pour ce chapitre.

de Gene Ontology (GO). Enfin, BUSCO (Version 3, Simão et al. 2015) a été exécuté pour vérifier l'exhaustivité du transcriptome assemblé.

Matériel végétal

Choix des populations, rappel des fréquences de résistance

Six populations échantillonnées en France et pour lesquelles la RNLC aux inhibiteurs de l'ALS (imazamox ou tribénuron) a été identifiée comme le seul type de résistance en cause (**Chapitre 1**, Loubet et al. 2021) ont été sélectionnées pour cette étude. Il s'agit des populations ARA2, ARA8, NAQ8, NAQ9, CVL5 et OCC13 dont les fréquences de résistances à l'imazamox et au tribénuron sont présentées dans le [Tableau 2 du Chapitre 1](#). Les déterminismes génétiques de la RNLC de la population ARA2 ont été recherchés pour l'imazamox et ceux des populations ARA8, NAQ8, NAQ9, CVL5, OCC13 pour le tribénuron. De plus, les plantes des populations ARA2, NAQ8, NAQ9 et CVL5 sont spécifiquement résistantes à l'imazamox ou au tribénuron à la dose testée ([Tableau 2, Chapitre 1](#)). Cet échantillonnage permet d'étudier à la fois les déterminismes génétiques de la RNLC ayant évolué pour deux substances actives et sur des populations provenant d'origines géographiques différentes, n'ayant probablement pas subi les mêmes pressions de sélection.

Production du matériel végétal

Du matériel végétal caractérisé (c'est-à-dire, pour lequel le phénotype résistant ou sensible est connu) pour chaque population de l'étude a été produit au cours de quatre années d'expérimentation (Tableau 5). Il a été produit de manière identique pour toutes les populations. L'ensemble des plantes ont été produites en serre, afin de contrôler au mieux les conditions environnementales.

Les graines ont été mises à stratifier à 4°C pendant un mois pour rompre leur dormance puis transférées en chambre climatique pour la germination (photopériode de 16 h, 20°C/15°C jour/nuit). Après la germination, les plantules au stade cotylédon ont été repiquées dans des plaques de 96 godets, permettant d'individualiser chaque plante. Le support utilisé était un mélange de sol limoneux, sable, perlite et de tourbe (60%, 15%, 15% et 10% respectivement). Après repiquage, les plantes ont été transférées en serre (20°C/15°C jour/nuit avec une photopériode de 16 h, arrosage au besoin). Les inhibiteurs de l'ALS ayant pour cible les tissus jeunes (Zhou et al., 2007), le bourgeon apical a été choisi comme matériel végétal pour l'extraction d'ARN. Au stade quatre feuilles, le bourgeon apical de chaque plante a individuellement été prélevé à l'aide d'un scalpel, puis immédiatement transféré dans un tube de 2mL contenant trois billes en acier de 3 mm. Chaque prélèvement a ensuite été immédiatement immergé dans l'azote liquide afin de conserver l'intégrité des ARNs. Après chaque prélèvement, la blessure créée par le prélèvement a été comblée par une goutte de gomme à masquer. Les bourgeons ainsi prélevés ont été stockés à -80°C jusqu'à extraction de l'ARN total.

Chapitre 2

Pour l'étude des mécanismes constitutifs (modalité avant traitement, AT), les bourgeons ont été prélevés vingt-quatre heures avant l'application du traitement herbicide. Pour l'étude des mécanismes induits, les bourgeons ont été prélevés deux heures après traitement (modalité deux heures après traitement, 2HAT). Les séries de plantes prélevées avant ou après traitement sont indépendantes. Les plantes ont été traitées avec l'herbicide correspondant au spectre de résistance de chaque population (ARA2 : imazamox ; ARA8, NAQ8, NAQ9, CVL5, OCC13 : tribénuron), à la dose maximale autorisée en France. Les traitements ont été réalisés comme décrit dans le **Chapitre 1** (Loubet et al. 2021).

Au total, quatre séries de tests ont été effectuées (Tableau 5). Chaque série incluait, en plus des populations testées, un lot témoin de dix plantes de la population de référence afin de vérifier l'efficacité de l'application des herbicides. Deux lots témoins non traités ont également été inclus (un lot pour la population étudiée et un lot pour la population de référence). Tous les bourgeons des lots de plantes témoins ont été prélevés dans les mêmes conditions que les plantes traitées. Ils ont permis de vérifier les conditions de culture en serre, que le prélèvement de bourgeon n'impactait pas le développement des plantes, et ont servi de référence visuelle pour l'établissement des phénotypes après traitement.

Quatre semaines après traitement, le phénotype de chaque plante traitée a été établi par une évaluation visuelle de la biomasse relativement à celle des plantes non traitées, comme décrit dans le **Chapitre 1** (Loubet et al. 2021).

Tableau 5 : Effectifs de plantes produites pour chacune des six populations et expérience correspondante

Phenotype	ARA2		ARA8		CVL5		NAQ8		NAQ9		OCC13		Year of production	RNASeq experiment	Validation experiment
	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S	R	S			
Sampling 1 (AT)	13	6											2017	RNASeq 1 sequencing	Validate fold change of RNASeq experiments
Sampling 2 (AT)			6	12			18	5			6	10	2019	RNASeq 2 sequencing	
Sampling 3a (AT)	6	19	15	12	9	9	18	8	14	16	9	9	2020	RNASeq 3 sequencing	
Sampling 3b (2HAT)	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	9	2020	RNASeq 3 sequencing	
Sampling 4 (AT)	42	51	63	66			57	57					2021		Evaluating candidate genes as markers

Séquençage de l'ARN

Trois expériences de séquençage de l'ARN (RNASeq) ont été conduites indépendamment. Pour chaque population et chaque phénotype, les échantillons d'ARN produits (Tableau 5) ont été mélangés selon le design expérimental renseigné dans le Tableau 6 ci-dessous.

Tableau 6 : Design expérimental appliqué pour les trois expériences de RNAseq

RNASeq experiment	ARA2	ARA8	CVL5	NAQ8	NAQ9	OCC13	Sampling	Year of sequencing
RNASeq 1 (AT ^a)	2 pools of 2 plants/phenotype						Sampling 1	2017
RNASeq 2 (AT ^a)		3 pools of 2 plants/phenotype		3 pools of 2 plants/phenotype		3 pools of 2 plants/phenotype	Sampling 2	2019
RNASeq 3a (AT ^a)	3 pools of 3 plants/phenotype	2 pools of 3 resistant plants and 3 pools of 3 sensitive plants	3 pools of 3 plants/phenotype	Sampling 3a	2020			
RNASeq 3b (2HAT ^a)	3 pools of 3 plants/phenotype	3 pools of 3 plants/phenotype	3 pools of 3 plants/phenotype	3 pools of 3 plants/phenotype	3 pools of 3 plants/phenotype	3 pools of 3 plants/phenotype	Sampling 3b	2020

^a AT : apical buds collected before treatment ; 2HAT : apical buds collected two hours after treatment

L'ARN total des bourgeons de plantes a été extrait selon la procédure décrite pour la constitution du transcriptome de référence. Les échantillons les plus concentrés en ARN et présentant un RIN > 8 ont été sélectionnés et mélangés en proportions équimolaires selon le design expérimental de chaque expérimentation (Tableau 6). Les échantillons des expériences de RNASeq 1 et 3 (Tableau 6) ont été envoyés pour préparation des bibliothèques et séquençage à la plateforme GenoToul INRAE de Toulouse. Les échantillons de l'expérience de RNASeq 1 (Tableau 6) ont été séquencés avec un séquenceur Illumina HiSeq 3000 avec des séquences appariées de 150 paires de base (pb) ; ceux de l'expérience de RNASeq 3 ont été séquencés sur un séquenceur Illumina NovaSeq 6000 avec des séquences appariées de 150 pb. Les échantillons du RNASeq 2 ont été envoyés à Fasteris (Plan-les-Ouates, Suisse) pour préparation des bibliothèques et séquençage sur un séquenceur Illumina HiSeq 3000 avec des séquences appariées de 150 pb.

L'alignement des séquences sur le transcriptome de référence a été réalisé par la plateforme bio-informatique LIPME à l'INRAE de Toulouse. L'aligneur Glint (version 1.0.rc12.826_833, 2018) a été utilisé et configuré pour ne conserver que les séquences appariées ayant obtenu le meilleur alignement et ne présentant pas de « trous » dans l'alignement (nombre maximal de mésappariement = 10 nucléotides, longueur minimale = 80 nucléotides, distance maximale autorisée entre chaque paire = 10 000). Les séquences ont été autorisées à s'aligner sur plusieurs contigs afin d'éviter un biais de

l'analyse par la redondance du transcriptome. Le nombre total de séquences alignées par contig et par échantillon a ensuite été renseigné dans un tableau afin de réaliser les analyses d'expression.

Analyses

Identification de gènes différemment exprimés entre phénotypes résistants et sensibles de manière constitutive

Les données de la modalité « avant traitement (AT) » des trois expériences de RNASeq ont été analysées indépendamment. Les données de comptage ont été normalisées et centrées réduites à l'aide du package EDASeq (Risso et al. 2011) disponible sur R (*R Core Team* 2021). La recherche de gènes candidats, c'est-à-dire, de gènes différemment exprimés (DE) entre les phénotypes résistants et sensibles, a été réalisée avec le package DESeq2 (Love et al. 2014). Pour chaque expérience de RNAseq, une première analyse opposant les phénotypes résistants et sensibles de toutes les populations combinées a systématiquement été conduite. Celle-ci avait pour but d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans des mécanismes de RNLC transversalement à toutes les populations. Comme il est possible que des gènes à l'origine de mécanismes de RNLC différents soient impliqués spécifiquement dans différentes populations, une analyse par population a également été conduite (exemple : ARA2-R vs. ARA2-S). Les analyses de DE ont été complétées par des analyses d'enrichissement Gene Ontology (GO). Nous avons supposé que si les gènes DE identifiés indépendamment dans chaque population présentent une annotation différente, il est tout de même possible qu'ils concourent à des fonctions moléculaires (MF) et/ou des procédés biologiques (BP) communs. Elles ont été réalisées à l'aide du package topGO (Alexa & Rahnenfuhrer 2021). La visualisation des profils d'expression des différentes populations a été réalisée grâce à des analyses en composantes principales (ACP). Elles ont été effectuées sur les données de comptage normalisées par le package DESeq2 avec le package FactoMineR (Lê et al. 2008) et visualisées avec le package FactoExtra (Kassambara & Mundt 2016).

Les gènes candidats ont été sélectionnés dans chacune des populations en fonction de leur niveau d'expression (Fold-Change, FC, inférieur ou supérieur à 2), de la valeur de la p -value ajustée pour les tests multiples en utilisant la méthode de Benjamini-Hochberg (Benjamini & Hochberg 1995) (p -adj < 0,1) et de l'annotation des contigs DE. Des contigs dont la fonction peut intervenir dans la détoxification des herbicides (*e.g.* cytochromes à P450, glucosyl transférases, ABC transporteurs) ont été sélectionnés, mais nous ne nous sommes pas limités à ce choix (*e.g.* protéines de résistances, facteurs de transcription, protéines de régulation, protéines dont la fonction est inconnue).

Identification de gènes différemment exprimés entre phénotypes résistants et sensibles de manière induite

Les données de comptage issues du séquençage des transcriptomes de bourgeons prélevés deux heures après traitement ont été analysées en deux étapes et indépendamment pour chaque population. Dans un premier temps, les différences d'expression entre les échantillons résistants et sensibles (R2HAT vs. S2HAT) de chaque population ont été évaluées comme décrit précédemment et comparées à celles observées en constitutif dans chaque population. Dans un second temps, la réponse de chaque phénotype au traitement (R2HAT vs. RAT et S2HAT vs. SAT) a été évaluée en mesurant la différence d'expression entre les échantillons prélevés avant et après traitement pour un phénotype donné. Des analyses d'enrichissement GO ont ensuite été conduites comme décrit précédemment afin de caractériser les BP associés à chaque phénotype et pour chaque population en réponse au traitement.

Validation des niveaux d'expression constitutifs mesurés en RNASeq par qPCR Fluidigm

Les niveaux d'expression des gènes candidats sélectionnés mesurés en RNASeq sont relatifs à seulement quelques plantes (Tableau 6) organisées en pools (de deux à trois pools de deux à trois plantes par phénotype et par population). Afin de les valider sur un échantillonnage plus important, ils ont été mesurés sur des plantes individuelles en qPCR Fluidigm (BioMark™ HD System, Fluidigm®, South San Francisco, CA, USA) sur les quatre échantillonnages de plantes prélevées avant traitement (Tableau 5). Deux expériences de qPCR Fluidigm ont été conduites et ont permis de cribler l'ensemble des gènes candidats constitutifs retenus. Les plantes produites pour les expériences de RNASeq 1 et 2 (échantillonnage 1 et 2, Tableau 5) ont été utilisées pour la première expérience. Cela inclut les plantes utilisées pour le RNASeq et des plantes supplémentaires (voir les effectifs, Tableau 5). Le niveau d'expression des gènes candidats sélectionnés à la suite des expériences de RNASeq 1 et 2 a été mesuré (91 candidats). Les plantes produites pour l'expérience de RNASeq 3, et dont les bourgeons ont été prélevés avant traitement, ont été utilisées pour la seconde expérience de qPCR (échantillonnage 3a, Tableau 5). Les niveaux d'expression des gènes retenus après la première expérience de qPCR Fluidigm (27 candidats) et celle des candidats issus des analyses du RNASeq 3 (30 candidats) ont été mesurés. Les données des deux expériences de qPCR Fluidigm ont été regroupées après avoir vérifié que le niveau d'expression des échantillons standards étaient identiques entre les deux.

Les ADNc ont été synthétisés à partir d'1 µg d'ARN à l'aide du kit Quantitect® Reverse Transcription Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France). La qPCR a été réalisée sur les ADNc à 5 ng/µL dilués dans du TE low EDTA (10mM tris-HCl, 0.1 mM EDTA, pH8). Une gamme de dilution au ½ en quatre points a été réalisée à partir d'un pool de dix échantillons afin de vérifier l'efficacité des couples d'amorces. Les amorces ont été diluées à 20 µM dans du TE low EDTA. Les plaques d'ADNc et les plaques d'amorces ont été

envoyées à la plateforme Gentyane INRAE de Clermont-Ferrand afin de procéder à la qPCR Fluidigm. Un mix a été préparé pour chacune des deux plaques envoyées. Les couples d'amorces et les ADNc ont été dilués 4 fois dans le mix préparé à cet effet pour chacun. Les puces IFC Dynamic Arrays 96.96 (Fluidigm®) ont ensuite été préparées manuellement à partir des plaques 96 puits contenant respectivement les échantillons d'ADNc et les couples d'amorces dilués dans leur mix respectif.

Les niveaux d'expression relatifs ont été calculés par la méthode du $2^{\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen 2001). Les données ont été normalisées à l'aide de trois gènes de référence (ubiquitine, filamine et GAPDH) et avec trois échantillons standards provenant de la population P08 de référence sensible. Les gènes de référence ont été validés lors d'une expérimentation préliminaire lors de laquelle l'expression relative de 10 gènes de référence candidats a été mesurée en qPCR sur 250 échantillons d'ADNc provenant de quatre populations d'ambrosie. Les gènes de référence candidats avaient été choisis sur la base des gènes de référence utilisés pour d'autres espèces adventices (Duhoux & Délye 2013 ; Petit et al. 2012) et des gènes identifiés comme stables en RNASeq. La stabilité des gènes de référence a été évaluée par rapport aux autres gènes (Bustin et al. 2009) à l'aide des algorithmes Genorm (Vandesompele et al. 2002) et Normfinder (Andersen et al. 2004) disponibles dans la fonction selectHKs du package NormqPCR (Perkins et al. 2012) disponible sur R et de la fonction tidy_normfinder disponible sur github (<https://github.com/dhammarstrom/generefer>). Les gènes DE entre les groupes de plantes résistantes et sensibles ont été évalués pour chaque population par comparaison de leur moyenne avec un test des rangs de Wilcoxon.

Généralisation du lien entre résistance et niveaux d'expression sur un échantillonnage indépendant par qPCR

Les gènes candidats pour lesquels la DE entre plantes résistantes et sensibles s'est vérifiée en qPCR Fluidigm ont été évalués sur un quatrième échantillonnage de plantes n'incluant aucune plante séquencée en RNASeq (Tableau 5, échantillonnage 4) et prélevées avant traitement. Seules les populations ARA2, ARA8 et NAQ8 pour lesquelles des gènes candidats ont été validés lors de la qPCR Fluidigm ont été étudiées ici. Les niveaux d'expression ont été évalués en qPCR « standard » (AppliedBiosystem™ QuantStudio™). Une gamme de dose au ½ en sept points a été réalisée pour vérifier l'efficacité des couples d'amorces. La préparation des échantillons (extraction ARN, synthèse ADNc), la normalisation pour le calcul du $2^{\Delta\Delta Ct}$ et l'évaluation de la DE entre les groupes de plantes résistantes et sensibles se sont déroulées comme décrit précédemment.

La mesure de l'expression relative des gènes candidats sur ce nouvel échantillonnage indépendant a montré une variabilité de la réponse des individus : les niveaux d'expression relatifs attendus n'ont pas été mesurés pour l'ensemble des échantillons. Pour décrire au mieux la variabilité des jeux de données, des analyses multivariées ont été conduites pour chacune des populations. Les ACP ont

permis, pour chaque population, de visualiser en deux dimensions le niveau d'expression de chaque échantillon et les relations entre les gènes. Elles ont ainsi permis d'identifier des groupes de plantes qui expriment de manière similaire un ou plusieurs gènes. Les classifications hiérarchiques sur composantes principales (HCPC) ont permis, par une classification non supervisée des individus, de décrire par la variable phénotype les différents groupes d'individus présentant des niveaux d'expression similaires pour certains gènes. Ces analyses ont été réalisées avec le package FactoMineR (Lê et al. 2008) disponible sur le logiciel R.

Évaluation de la capacité de prédiction des phénotypes à partir des niveaux d'expression des gènes candidats

Les niveaux d'expression des gènes candidats ont été évalués comme prédicteurs du phénotype dans les populations ARA2, ARA8 et NAQ8. Cette approche s'est déroulée en deux étapes. En premier lieu, les analyses ont été conduites sur les échantillonnages incluant les plantes qui ont permis d'identifier les gènes candidats (échantillonnage 1, 2, 3a, Tableau 5) puis en second lieu sur un échantillonnage indépendant de plantes (échantillonnage 4, Tableau 5).

Dans un premier temps, une analyse linéaire discriminante a été conduite sur l'ensemble des gènes candidats pour chaque population. Les gènes ont été classés par ordre d'importance pour leur contribution au phénotype. Les dix variables les plus importantes ont alors été utilisées pour construire le modèle d'auto-apprentissage en appliquant une technique de rééchantillonnage de type LOOCV (Leave-One-Out Cross Validation) pour évaluer les performances de ce modèle. Cette évaluation a été conduite huit fois, en supprimant à chaque étape la variable contribuant le moins au modèle précédent. Cette démarche a permis de sélectionner, par population, la meilleure combinaison de gènes permettant d'obtenir un taux de prédiction du phénotype maximal. Afin de tester ces combinaisons de gènes en conditions réelles, chacune de ces combinaisons a ensuite été testée sur les données d'expression de l'échantillonnage 4 (Tableau 5). Les fonctions « train » et « test » du package caret (Kuhn 2008) disponible sur le logiciel R ont permis de faire ces analyses. Le phénotype résistant a été pris comme référence du modèle. La sensibilité du modèle correspond donc à sa capacité à prédire qu'une plante résistante est résistante et sa spécificité à prédire qu'une plante sensible est sensible.

Bilan méthodologique

La synthèse de la méthodologie appliquée a été représentée sur la Figure 14 ci-après.

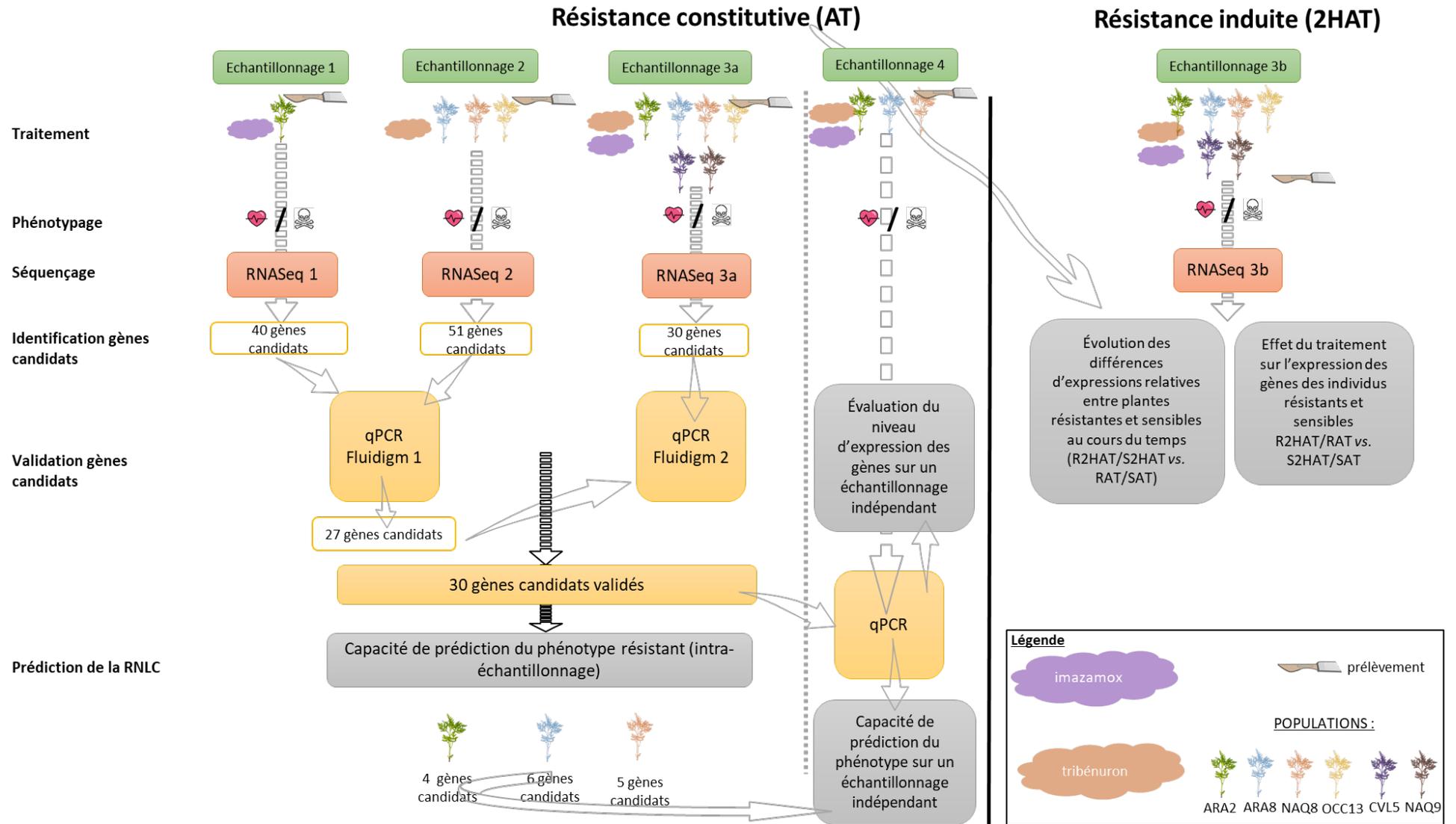


Figure 14 : schéma bilan méthodologique

Résultats

Assemblage d'un transcriptome de référence pour l'ambroisie : AMBELbase

Dans le but d'identifier les déterminismes génétiques de la RNLC, un transcriptome de référence de l'ambroisie a été assemblé. Cette base sert de référence pour l'alignement de toutes les données obtenues par séquençage de l'ARN d'ambroisie. D'une taille de 51242 transcrits (110,5 Mb) après élimination de la redondance, l'AMBELbase est estimée complète à 80,2% par l'analyse BUSCO. Elle regroupe 34,2% d'orthologues complets et à copie unique, 46% d'orthologues complets et dupliqués (séquences redondantes ou expressions des deux allèles de la plante utilisée pour le séquençage, qui est vraisemblablement fortement hétérozygote), 2,6% d'orthologues fragmentés et 17,2% d'orthologues manquants sur un total de 1440 groupes d'orthologues recherchés, avec un N50 égal à 2349 nucléotides (50% des contigs de l'AMBEL base ont une taille supérieure ou égale à 2349 nucléotides).

Sélection de gènes candidats à la RNLC exprimés de manière constitutive au sein de six populations résistantes à l'imazamox ou au tribénuron

Les déterminismes génétiques constitutifs de la RNLC ont été recherchés au sein de six populations provenant du terrain pour lesquelles la RNLC a été identifiée comme le seul type de résistance en cause (Loubet et al. 2021). Trois expériences de RNASeq indépendantes ont été réalisées et analysées indépendamment.

Afin de visualiser les profils d'expression de chacune de ces six populations, les données de comptage issues du RNASeq 3a (Tableau 6), normalisées par le package DESeq2, ont été utilisées pour réaliser une ACP (Figure 15). Les profils ségrégent sur les deux premiers axes de l'ACP qui expliquent 25,1% de la variance présente dans le jeu de données. En particulier, les profils d'expression des populations NAQ8, NAQ9, CVL5, OCC13 et ARA8 incluant toutes des plantes résistantes au tribénuron se séparent à la fois sur les axes 1 et 2. La population ARA2 incluant des plantes résistantes à l'imazamox se distingue des autres sur l'axe 1. Elle présente un profil d'expression global proche de celui de ARA8, échantillonnée dans la même zone géographique, et de NAQ9.

Les résultats de l'ACP montrent, tout d'abord, une ségrégation des profils par population, indiquant que les individus provenant d'une même population présentent un profil d'expression transcriptomique similaire. Les résultats mettent en évidence qu'il n'est pas possible de discriminer les phénotypes résistants des sensibles en prenant en compte toutes les populations. De plus, la résistance à des substances actives différentes ne semble pas discriminante, les groupes d'individus

résistants à l'imazamox de la population ARA2 n'étant pas particulièrement isolés vis-à-vis des autres groupes d'individus résistants au tribénuron des autres populations dans cette analyse.

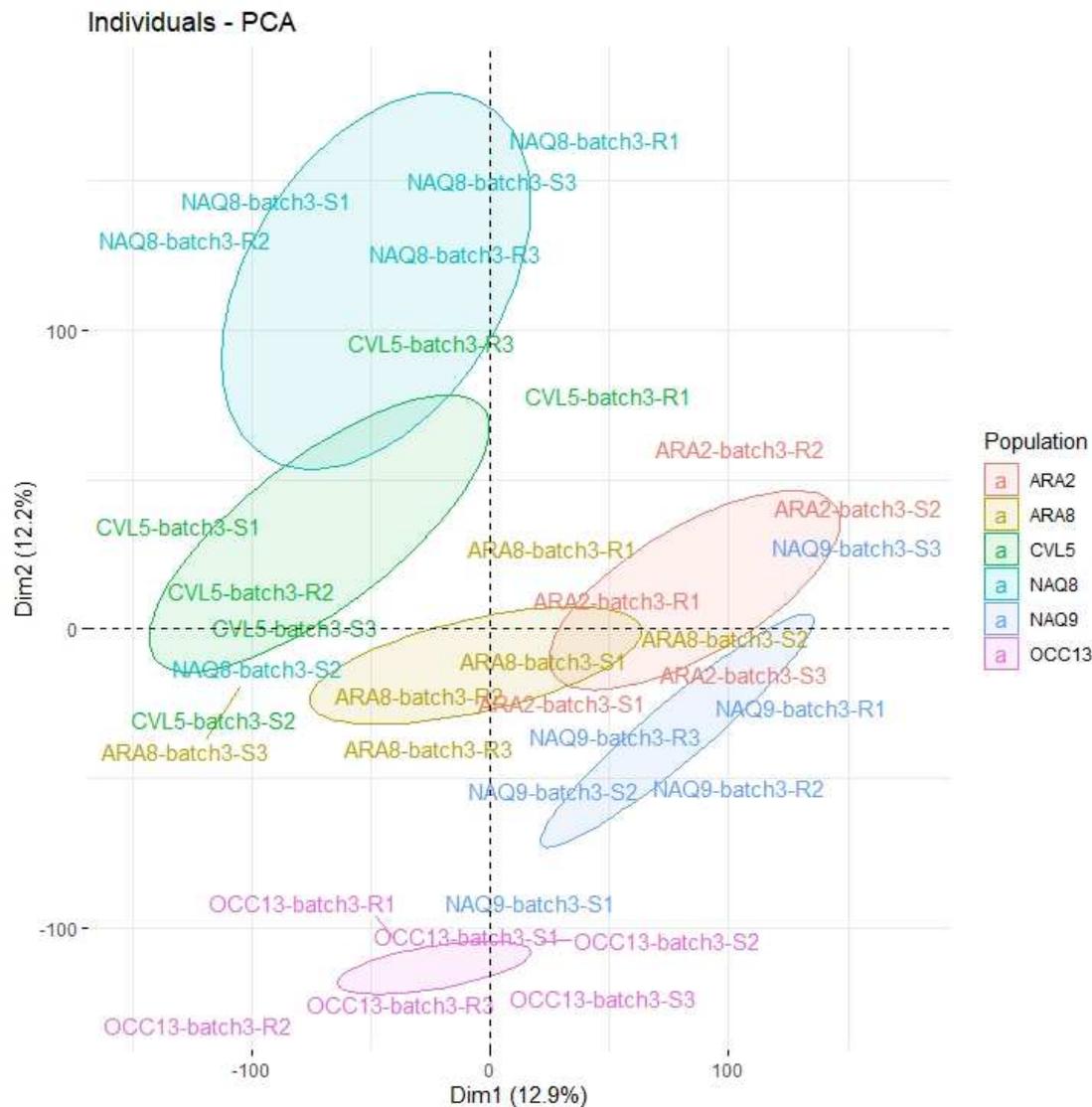


Figure 15 : Analyse en composante principale de l'ensemble des gènes exprimés par les populations ARA2, ARA8, NAQ8, NAQ9, OCC13 et CVL5

Étant donnée la différence entre les profils d'expression entre chaque population, la recherche des déterminants génétiques de la RNLC par l'étude de la différence d'expression entre les phénotypes d'intérêt a été conduite au sein de chacune des populations individuellement.

La variabilité observée entre les expériences semble également importante : la comparaison des gènes DE identifiés pour une population donnée, et entre les différentes expériences de RNASeq, indique que peu de gènes communs sont identifiés pour une population entre les expériences. Soixante-six gènes sont communs pour la population ARA2. Un gène est commun pour chacune des populations ARA8 et NAQ8. Treize sont communs pour la population OCC13. Les expériences de RNASeq ayant été conduites lors d'années différentes, sur des plantes différentes, les résultats

présentés ci-après proviennent d'analyses indépendantes (une analyse par expérience et par population).

Pour l'ensemble des échantillons séquencés de la population ARA2, un total de 3616 gènes présentant une DE significative entre les pools résistants et sensibles à l'imazamox a été identifié. Pour l'ensemble des échantillons séquencés des populations ARA8, CVL5, NAQ8, NAQ9 et OCC13, un total de 995 gènes DE entre les différents groupes résistants et sensibles au tribénuron de chaque population a été identifié. Précisément, 270 gènes DE ont été identifiés dans la population ARA8, 183 dans la population CVL5, 337 dans la population NAQ8, 64 dans la population NAQ9 et 141 dans la population OCC13. Le recoupement de ces données ne permet pas d'identifier de gène DE commun à toutes ces populations incluant des plantes résistantes au tribénuron (Figure 16). Trois gènes sont DE dans au moins quatre populations (Tableau supplémentaire 1), dont un cytochrome à P450 de la famille 71. Huit gènes sont DE dans au moins trois populations dont un cytochrome P450 de la famille 72 (Tableau supplémentaire 1). Trente-deux gènes sont DE dans au moins deux populations dont une protéine de défense et une protéine induite par la voie de l'acide jasmonique (Tableau supplémentaire 1). Parmi ces gènes DE au sein de plusieurs populations, peu présentent un profil d'expression identique entre les populations (Tableau supplémentaire 1). Par exemple, le cytochrome P450 de la famille 71 DE pour quatre des populations étudiées est fortement surexprimé chez les individus résistants de la population NAQ8 et fortement sous-exprimé chez les individus résistants des trois autres populations (Tableau supplémentaire 1).

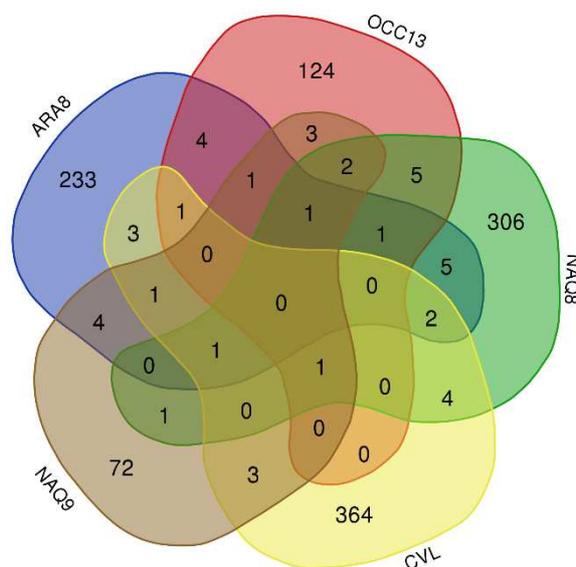


Figure 16 : diagramme de Venn représentant les gènes différemment exprimés au sein des cinq populations regroupant des plantes résistantes au tribénuron

Dans le but de déterminer si les gènes DE identifiés précédemment concourent à des procédés biologiques (BP) ou à des fonctions moléculaires (MF) communs aux différentes populations, une analyse d'enrichissement GO a été réalisée pour chacune des listes de gènes DE identifiés dans les six populations.

Les résultats de l'analyse d'enrichissement GO ne permettent pas d'identifier de BP ou de MF commun à toutes les populations étudiées. Au moins quatre populations expriment des contigs qui se regroupent dans deux MF et un BP, impliqués dans des mécanismes de régulation de l'expression des gènes ou de liaison de l'ATP (Tableau supplémentaire 2). Trois MF et six BP sont partagés par au moins trois populations comme des procédés de défense par modification de la cuticule ou un épaissement de la paroi cellulaire ou des procédés du métabolisme secondaire (Tableau supplémentaire 2). Vingt-et-une MF et 30 BP sont partagés par au moins deux populations. Ils regroupent des termes liés à la régulation de l'expression de gènes, le métabolisme des acides aminés (Tableau supplémentaire 2). D'autres termes, cohérents avec des mécanismes de RNLC, ont également été identifiés comme, la synthèse de métabolites secondaires, des activités de liaison (« drug binding »), des activités oxygénases ou oxydoréductases, différents gènes du métabolisme hormonal qui peuvent être liés à une réponse au stress (voies de l'éthylène et des gibbérellines), des activités de transports transmembranaire (« protein transmembrane transport, primary active transmembrane transporter, ATPase-coupled transmembrane transporter, drug transmembrane transport ») et des réponses à des stress biotiques ou abiotiques (« hydrogen peroxide biosynthetic process, response to molecule of bacterial origin ») (Tableau supplémentaire 2). D'autres termes, impliquant des activités glucosyltransférase, monooxygénase ou encore catalytique, ont été trouvés dans au moins une population.

L'analyse des profils d'expression issus des expériences de RNASeq n'a pas permis d'identifier de gènes DE communs à toutes les populations, ni de BP ou MF. Des gènes candidats, considérés comme potentiellement impliqués dans la RNLC, ont donc été sélectionnés dans chacune des populations indépendamment. Au total 121 candidats ont été retenus pour validation de leur niveau d'expression en qPCR Fluidigm. Ils ont été choisis sur la base de leur DE entre plantes résistantes et sensibles d'une population donnée (FC), la valeur de la p-value ajustée ($p\text{-adj} < 0,1$) et leur fonction. Quarante-cinq proviennent de la population ARA2, 12 de la population ARA8, 17 de la population OCC13, 42 de la population NAQ8, neuf de la population CVL5 et trois de la population NAQ9 (Tableau supplémentaire 3). Certains des candidats sélectionnés sont DE dans plusieurs populations (Tableau supplémentaire 3).

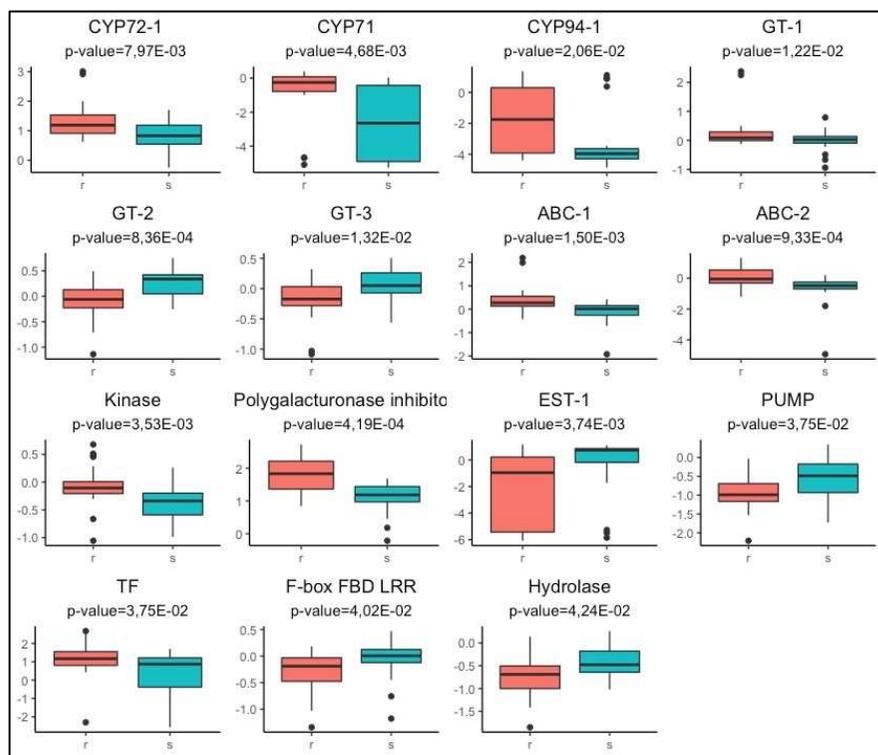
Validation des niveaux d'expression en qPCR fluidigm

Parmi les 121 gènes dont l'expression a été mesurée en qPCR, 30 présentent une DE significative entre plantes résistantes et plantes sensibles. Aucune DE significative n'a été validée pour les gènes sélectionnés dans les populations OCC13, CVL5 et NAQ9. Quinze gènes présentent une DE significative dans la population ARA2 (Figure 17, A). Deux ABC transporteurs (ABC-1 et ABC-2), une protéine de résistance (DRP-1), un récepteur LRR (F-box FBD LRR), un inhibiteur de la polygalacturonase (PGIP) et trois cytochromes P450 (CYP71-1, CYP72-1 et CYP94) des familles 71, 72 et 94 sont surexprimés par les plantes résistantes par rapport aux sensibles. Une pompe à efflux (PUMP), une hydrolase (HDL) et une estérase (EST-1) sont sous-exprimés chez les plantes résistantes par rapport aux sensibles. Parmi ces 15 gènes, sept présentent une DE significative inattendue par rapport aux données de RNASeq. Il s'agit de F-box FBD LRR, EST-1, PGIP, GT-3, CYP71-1 (sélectionnés pour leur DE dans la population NAQ8, Tableau supplémentaire 3), PUMP (sélectionné pour sa DE dans la population CVL5, Tableau supplémentaire 3) et l'hydrolase (sélectionné dans la population ARA8 pour sa DE, Tableau supplémentaire 3).

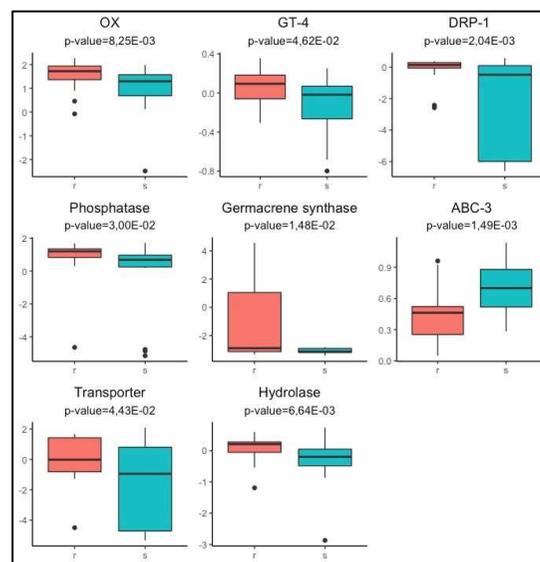
Huit gènes présentent une DE d'expression significative dans la population ARA8 (Figure 17, **BErreur ! Source du renvoi introuvable.**). Une protéine de résistance (DRP-1), une phosphatase (Phs), une oxidoréductase (OX), une glycosyltransférase (GT-3), une hydrolase (HDL), un transporteur (TBC) et une enzyme impliquée dans la synthèse des terpènes (GMC) sont surexprimés par les plantes résistantes par rapport aux sensibles. Un ABC transporteur (ABC-3) est sous-exprimé. Cinq de ces candidats ne présentaient pas de DE entre les individus résistants et sensibles utilisés pour le RNASeq. Il s'agit de ABC-3, OX, GT-3, TBC (DE dans la population NAQ8, Tableau supplémentaire 3) et de DRP-1 (DE dans la population OCC13, Tableau supplémentaire 3).

Sept gènes présentent une DE significative entre les individus résistants et sensibles de la population NAQ8 (Figure 17, C). Une protéine de résistance (DRP-2), une oxidoréductase (OX), une phosphatase (Phs), une déhydrogénase (DH) et une enzyme impliquée dans la synthèse des terpènes (GMC) sont surexprimés significativement chez les plantes résistantes par rapport aux sensibles. Un ABC transporteur (ABC-4) et une protéase (PROT) sont sous-exprimés. Trois de ces candidats n'étaient pas DE entre les plantes résistantes et sensibles utilisées pour le RNASeq (ABC-4 DE dans la population NAQ9, PROT DE dans la population CVL5 et DH dans la population OCC13, Tableau supplémentaire 3). Les candidats GT-3 et hydrolase présentent un DE significative entre les individus résistants et sensibles des populations ARA2 et ARA8. OX, GMC et Phs sont surexprimés chez les individus résistants par rapport aux sensibles dans les populations ARA8 et NAQ8.

A



B



C

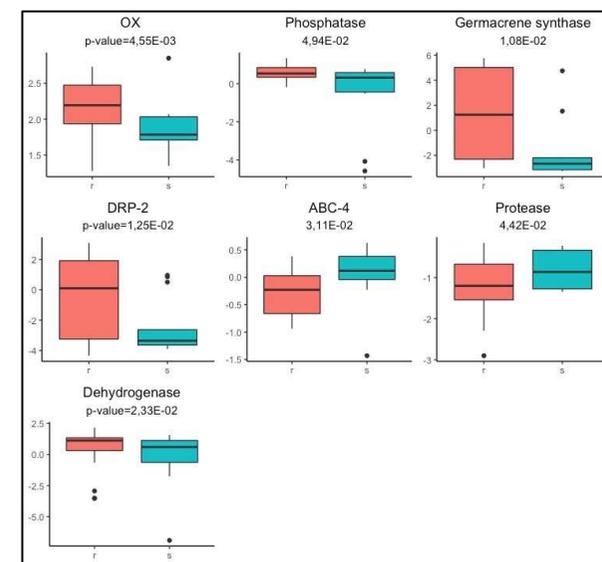


Figure 17 : Niveaux d'expression moyens observés chez les plantes résistantes (rouge) et chez les plantes sensibles (bleu) à l'imazamox ou au tribénuron dans les populations (A) ARA2 pour les 15 gènes présentant une DE significative, (B) ARA pour les 8 gènes présentant une DE significative, (C) NAQ8 tribénuron pour les 7 gènes présentant une DE significative

Évaluation de la capacité du niveau d'expression des gènes candidats à prédire le phénotype

Dans le but d'évaluer les gènes candidats comme potentiels marqueurs de la résistance, leur niveau d'expression a été évalué comme prédicteur du phénotype (résistant ou sensible). Dans les populations ARA2, ARA8 et NAQ8, huit modèles ont été testés afin de déterminer la combinaison de gènes permettant de prédire le phénotype avec un taux de prédiction maximal (Figure 18). Le taux de prédiction résulte de la sensibilité du modèle (capacité du modèle à détecter les plantes résistantes comme résistantes) et de la spécificité du modèle (capacité à détecter les plantes sensibles comme sensibles).

Dans la population ARA2, le taux de prédiction des différents modèles varie de 80% à 87,5%, la sensibilité de 75 à 85% et la spécificité de 74 à 95% (Figure 18, A). Les gènes retenus comme meilleurs marqueurs de cette population sont PGI+GT-2+ABC-2+Ki-1 qui permettent de maximiser ces paramètres (Figure 18). Cette combinaison de gènes permet d'obtenir un taux de prédiction moyen du phénotype de 87,5% (sensibilité de 85%, spécificité de 90%) (Figure 18, A). Ces quatre candidats présentent une DE significative entre les individus résistants et sensibles.

Dans la population ARA8, le taux de prédiction varie entre 67 et 74%, la sensibilité entre 67 et 90%, la spécificité entre 55 et 78% (Figure 18, B). La combinaison retenue est celle qui permet de maximiser l'ensemble de ces paramètres, ABC-3+DRP-1+GMC+OX+Phs+GT-3. Elle permet d'obtenir un taux de prédiction de 74% avec une sensibilité de 76% et une spécificité de 72%. Ces six gènes présentent une DE significative entre les individus résistants et sensibles.

Dans la population NAQ8, le taux de prédiction varie de 59 à 69%, la sensibilité de 72 à 89%, spécificité de 36 à 55% (Figure 18, C). La combinaison de gènes retenus est GMC+DRP-2+ABC-4+OX+PROT qui permet d'obtenir un taux de prédiction de 69%, avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 36%. Ces quatre gènes présentent une DE significative entre les individus résistants et sensibles de cette population.

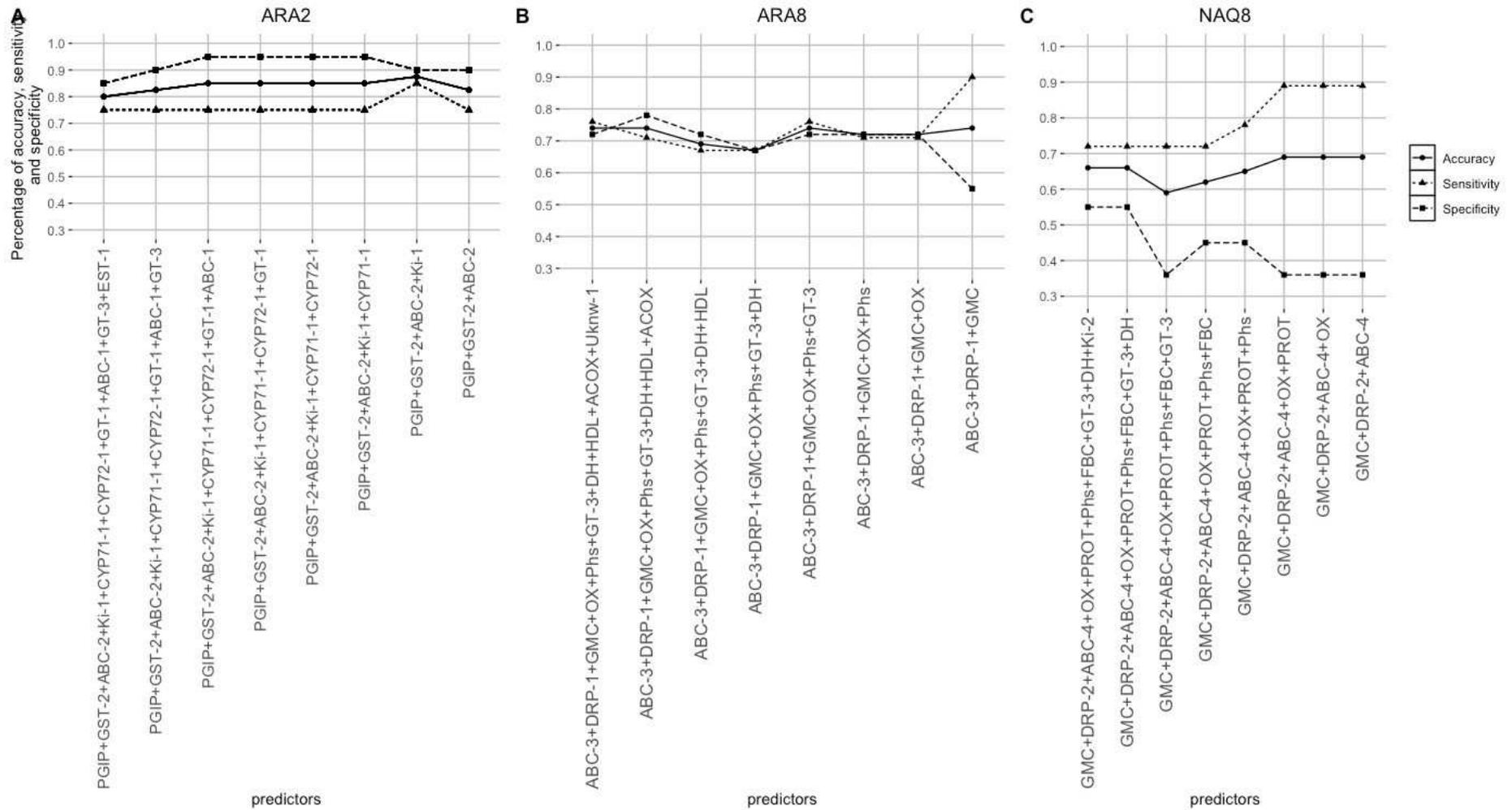


Figure 18 : Variation du taux de prédiction correct du phénotype (accuracy), de la sensibilité (sensitivity) et de la spécificité (specificity) pour les huit modèles testés dans les populations ARA2, ARA8 et NAQ8

Évaluation de la capacité du niveau d'expression des gènes candidats à prédire le phénotype sur un échantillonnage indépendant.

Les modèles incluant les combinaisons de gènes sélectionnées ci-dessus ont été testés sur un échantillonnage indépendant de plantes (échantillonnage 4, Tableau 5). Cet échantillonnage n'inclut pas les plantes séquencées qui ont permis de sélectionner les gènes candidats. Ce test permet d'évaluer les candidats comme potentiels marqueurs de la résistance en mimant des conditions réelles. Pour les populations ARA2, ARA8 et NAQ8, les combinaisons PGI+GT-2+ABC-2+Ki-1, ABC-3+DRP-1+GMC+OX+PHS+GT-3 et GMC+DRP-2+ABC-4+OX+Protease ont respectivement été évaluées.

Pour la population ARA2, le taux de prédiction obtenu sur ce nouveau jeu de données est de 61% (soit une différence de 26,5% avec le jeu de données ayant permis d'établir le modèle) avec une sensibilité de 86% (+1%) et une spécificité de 42% (-48%). Pour la population ARA8, le taux de prédiction obtenu est de 46% (-28%) avec une sensibilité de 70% (-6%) et une spécificité de 26% (-46%). La forte baisse des taux de prédiction pour ces deux populations est liée à la chute de la spécificité des modèles respectifs. Les niveaux d'expression des gènes contribuant à ces modèles ne permettent pas d'établir avec justesse le phénotype des individus sensibles de ces deux populations. Pour la population NAQ8, le taux de prédiction obtenu est de 62% (-7%) avec une sensibilité de 74% (-15%) et une spécificité de 51% (+15%).

Évaluation du niveau d'expression des gènes candidats validés sur un nouvel échantillonnage indépendant

Le niveau d'expression des gènes candidats pour lesquels une DE a été validée en qPCR fluidigm a été évalué sur un échantillonnage indépendant de plantes (échantillonnage 4, Tableau 5).

Peu des gènes dont les niveaux d'expression ont été validés sur les échantillonnages 1, 2 et 3 sont validés sur l'échantillonnage 4. Seulement deux des 15 gènes validés en qPCR Fluidigm présentent une DE moyenne significative entre les individus résistants et sensibles de la population ARA2 (ABC-2, CYP72A, Tableau 7). Ces deux gènes avaient été sélectionnés pour leur DE dans cette population (Tableau supplémentaire 3). Un seul des huit gènes validés de la population ARA8 présente une DE moyenne significative dans ce nouvel échantillonnage (OX, Tableau 7). À l'origine, ce gène avait été sélectionné pour sa DE dans la population NAQ8 (Tableau supplémentaire 3). Aucun des sept gènes validés dans la population NAQ8 ne présente de DE significative dans ce nouvel échantillonnage.

Les différences d'expression ne se validant que peu en moyenne d'un échantillonnage à l'autre, les analyses multivariées ont permis d'évaluer l'hétérogénéité des niveaux d'expression au sein de chaque jeu de données. L'ACP sur les individus de chaque population de l'échantillonnage 4 permet

de visualiser leur répartition en fonction de leur niveau d'expression pour les différents gènes. L'HCPC a été réalisée dans le but d'établir un lien entre les groupes d'individus présentant des profils d'expression proche et le phénotype de ces individus.

Les deux premières dimensions de l'ACP de la population ARA2 expliquent 45,8% de la variance du jeu de données (Figure 19, A). Le barycentre de l'ensemble des individus résistants et celui des individus sensibles s'opposent sur la première dimension (18,8% de la variance). Les gènes se différencient en trois groupes qui s'opposent sur les deux axes (Figure 19, A). L'HCPC regroupe les individus en six clusters, dont deux présentant un lien avec les phénotypes. Les gènes GT-1, CYP72-1 et ABC-2 sont surexprimés par rapport à la moyenne de l'ensemble du jeu de données par un sous-échantillon de 22% des individus résistants et 4% des individus sensibles (p -value = $1,33e-05$; $3,68e-05$; $7,55e-04$ respectivement), ce qui est cohérent avec les niveaux d'expression précédemment observés dans cette population (Figure 17, A, Tableau 7). Les gènes GT-2 et Ki-1 sont surexprimés par 13% des individus sensibles (p -value = $2,15e-13$ et $6,85e-11$ respectivement), ce qui est cohérent avec les niveaux d'expression précédemment observés dans cette population (Figure 17, A, Tableau 7). Les niveaux d'expression des candidats GT-1, CYP72-1, ABC-2, GT-2 et Ki-1 sont cohérents avec les précédentes observations pour une partie des individus de cet échantillonnage.

Pour la population ARA8, les barycentres des individus résistants et sensibles s'opposent sur les deux dimensions (37,8 % de la variance) et les intervalles de confiance à 95% autour du barycentre se recoupent (Figure 19, B). Les gènes se différencient en quatre groupes qui s'opposent sur les deux axes. Les cinq groupes d'individus identifiés par l'HCPC ne sont pas caractérisés par un phénotype en particulier.

Dans la population NAQ8, les barycentres des individus résistants et sensibles s'opposent sur les deux dimensions (50,5 % de la variance). Les intervalles de confiance à 95% autour du barycentre se recoupent. Le niveau d'expression de ces gènes ne permet pas d'opposer totalement les phénotypes. Les gènes se différencient en cinq groupes sur les deux dimensions (Figure 19, C). L'HCPC identifie trois groupes d'individus. Le premier regroupe une majorité d'individus sensibles (41,5% des individus sensibles, 17,8 % des individus résistants). Il se caractérise par une surexpression par rapport à la moyenne de tous les individus du gène PROT (p -value = $6,00e-10$) et une sous-expression des gènes GMC, DRP-2, Phs, ABC-4 et DH, (p -value = $2,30e-03$; $5,90e-04$; $6,37e-06$; $6,07e-07$ et $1,48e-07$ respectivement) ce qui correspond au profil d'expression déjà observé pour ces gènes (Figure 17, C, Tableau 7). Le second regroupe une majorité des individus résistants (73,3% et 52,8 % des individus sensibles). Il est caractérisé par une surexpression des gènes DH et DRP-2 par rapport à la moyenne de tous les individus (p -value = $1,81e-03$ et $1,74e-02$) et une sous-expression du gène PROT (p -value = $1,76e-09$). 41,5% des individus sensibles de cet échantillonnage et 73.3% des individus résistants présentent un niveau d'expression cohérent avec ce qui avait été observé précédemment (Figure 17,

Chapitre 2

C, Tableau 7). Le troisième groupe n'est pas caractérisé par un phénotype en particulier (8,9% des individus résistants, 5,7% des individus sensibles) et est caractérisé par une surexpression des gènes Phs, ABC-4, DH, OX (p -value = 1,84e-09 ; 2,63e-09 ; 4,13e-04 et 5,31e-03 respectivement) et une sous-expression du gène GMC (p -value = 2,62e-02).

Tableau 7 : Niveau d'expression des gènes DE validés en qPCR Fluidigm et leur niveau d'expression correspondant en qPCR « classique » sur l'échantillonnage 4

Gene code	Contig annotation	Fold-change (R/S) sampling 1,2,3a	p-value (wilcoxon test)	Fold-change sampling 4	p-value (wilcoxon test)
ARA2					
ABC-1	ABC transporter	13,09	1,50E-03*	0,86	6,87E-01
ABC-2	ABC transporter	6,79	9,33E-04*	452,66	5,02E-02*
CYP71-1	cytochrome P450, family 71	3,47	4,68E-03*	4,70	7,45E-01
CYP72-1	cytochrome P450, family 72	9,20	7,97E-03*	2,10	9,58E-03*
EST-1	phosphodiesterase	0,40	3,74E-03*	0,60	1,86E-01
Pump	hydroxybenzoic acid efflux pump	0,39	3,75E-02*	NA	
F-box FBD LRR	F-box FBD LRR-repeat At1g13570	0,62	4,02E-02*	NA	
GT-1	anthocyanidin glucosyltransferase	18,92	1,22E-02*	2,74	1,79E-01
GT-2	UDP-glycosyltransferase 74	0,50	8,36E-04*	51,60	1,72E-01
GT-3	UDP-glycosyltransferase 87	0,58	1,32E-02*	1,32	4,67E-01
Kinase - Ki-1	LRR receptor-like serine threonine- kinase	2,31	3,53E-03*	3,38	9,03E-01
Polygalacturonase inhibitor - PGI	polygalacturonase inhibitor	6,16	4,19E-04*	0,49	3,43E-01
TF-1	Transcription factor WRKY7	6,02	3,75E-02*	6,97	9,90E-01
CYP94	cytochrome P450, family 94	2,05	2,06E-02*	NA	
Hydrolase - HDL	bifunctional epoxide hydrolase 2-like	0,77	4,24E-02*	NA	
ARA8					
ABC-3	ABC transporter	0,54	1,49E-03*	1,09	7,45E-01
DRP-1	disease resistance	1,99	2,04E-03*	1,31	9,48E-01
Germacrene synthase - GMC	germacrene D synthase	6044188,89	1,48E-02*	0,07	9,14E-01
GT-3	UDP-glycosyltransferase 87	1,36	4,62E-02*	1,15	7,41E-01
OX	quinone oxidoreductase	2,57	8,25E-03*	1,71	1,66E-03*
Phosphatase - Phs	pseudouridine-5 - monophosphatase	1,77	3,00E-02*	2,57	6,19E-02
Hydrolase - HDL	bifunctional epoxide hydrolase 2-like	1,54	6,64E-03*	NA	
Transporter - TBC	TBC1 domain family member 8B	1,20	4,43E-02*	1,12	4,31E-01
NAQ8					
ABC-4	ABC transporter	0,44	3,11E-02*	2,52	1,79E-01

Chapitre 2

DRP-2	Disease resistance	106,14	1,25E-02*	3,29	6,57E-02
Germacrene synthase - GMC	germacrene D synthase	19,59	1,08E-02*	2,94	7,42E-02
OX	quinone oxidoreductase	1,69	4,55E-03*	1,41	7,18E-01
Phosphatase - Phs	pseudouridine-5 - monophosphatase	2,42	4,94E-02*	5,51	1,96E-01
Protease - PROT	Aspartic protease	0,56	4,42E-02*	0,71	6,89E-02
Dehydrogenase - DH	secoisolariciresinol dehydrogenase-like	3,00	2,33E-02*	2,76	5,67E-02

*p-value < 0,05

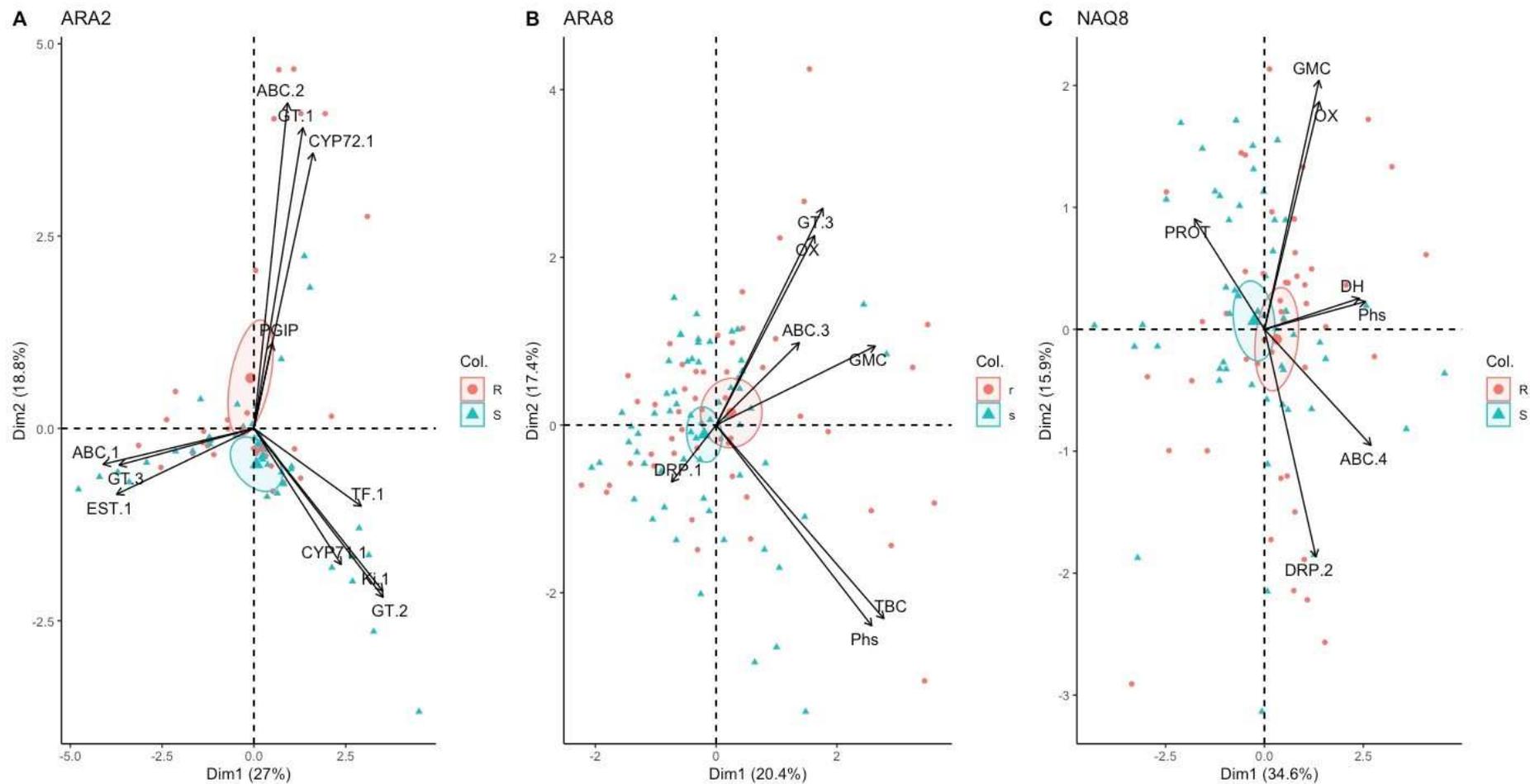


Figure 19 : Analyse en composante principale des niveaux d'expression obtenus pour les gènes DE validés en qPCR fluidigm sur l'échantillonnage 4

Comparaison de l'expression relative des gènes entre plantes résistantes et sensibles avant et deux heures après traitement

Les plantes prélevées avant traitement (AT) ou deux heures après traitement (2HAT) ont été produites indépendamment. Le suivi de l'expression des gènes entre ces deux modalités a donc été réalisé à l'échelle de la population et non à l'échelle individuelle.

Le niveau d'expression relatif des gènes entre plantes résistantes et sensibles a été mesuré en RNASeq après traitement (R2HAT/S2HAT) pour chacune des six populations. Comme observé pour la modalité avant traitement, pour les populations ARA8, CVL5, NAQ8 et NAQ9, peu de gènes sont DE entre les deux phénotypes après traitement (de 47 à 896, Tableau 8). Dans la population ARA2, alors que 3616 gènes ont été identifiés comme DE avant traitement, seulement 68 le sont après traitement (Tableau 8). Au contraire, pour la population OCC13, alors que seulement 141 gènes DE ont été identifiés avant traitement, 896 sont DE après traitement. La comparaison des listes de gènes DE avant traitement (RAT/SAT) et après traitement (R2HAT/S2HAT) pour chacune des six populations indique que peu de gènes sont DE à la fois avant et après traitement (de 1 à 13, Tableau 8). Parmi les 121 candidats sélectionnés précédemment pour validation en qPCR Fluidigm (Tableau supplémentaire 2), tous étaient surexprimés avant traitement. Quatorze sont sur ou sous-exprimés significativement après traitement (Tableau 9), soit dans la même population où ils ont été identifiés comme DE avant traitement, soit dans une autre. Deux sont sous-exprimés après traitement dans la population OCC13 où ils avaient été identifiés comme sur-exprimés constitutivement (Tableau 9). Douze ont été identifiés comme DE après traitement dans d'autres populations que celle pour laquelle ils avaient été sélectionnés avant traitement, cinq sont surexprimés après traitement, six sont sous-exprimés et un est sur ou sous exprimé selon la population dans laquelle il est DE (Tableau 9). Les candidats surexprimés avant traitement dans une population donnée puis après traitement dans une autre, deux cytochromes des familles 71 et 72, une oxidoréductase, une germacrène synthase et une protéine induite par la voie de l'acide jasmonique pourraient être des acteurs des mécanismes de RNLC de manière constitutive ou induite selon la population.

Tableau 8 : Comparaison du nombre de gènes DE entre phénotype résistant et sensible avant et après traitement pour chacune des populations de l'étude

Population	Number of DE genes between R and S samples before treatment (RAT/SAT)	Number of DE genes between R and S samples 2 hours after treatment (R2HAT/S2HAT)	Number of DE genes between R and S samples before and 2 hours after treatment
ARA2	3616	68	11
ARA8	270	86	3
CLV5	181	276	13
NAQ8	337	84	8
NAQ9	64	47	1
OCC13	141	896	6

Tableau 9 : Évolution de l'expression relative des gènes candidats constitutifs sélectionnés pour leur DE avant traitement et également DE après traitement en RNASeq

Accession	code	Description	Before treatment (AT)			2 hours after treatment (2HAT)					
			Popul ation	Log2FC RAT/SA T	padj	Popul ation	Log2FC R2HAT /S2HA T	padj	Popul ation	Log2FC R2HAT/ S2HAT	padj
AMBELPO 8A3r1t_4 4453	CYP71 -2	cytochrome P450, family 71, subfamily B	NAQ8	12,06	4,73E-04	OCC13	15,81	1,03E-02	ARA8	10,28	3,19E-04
AMBELPO 8A3r1t_3 8863	OX	probable quinone oxidoreductase	NAQ8	1,97	1,55E-03	CVL5	-4,10	1,78E-02	ARA8	7,06	5,42E-04
AMBELPO 8A3r1t_4 6903	Jsm	23 kDa jasmonate- induced -like	ARA8	24,36	1,42E-09	NAQ8	10,87	2,97E-02			
AMBELPO 8A3r1t_2 6309	GMC	germacrene D synthase	NAQ8	16,36	6,06E-05	ARA2	23,02	1,85E-07			
AMBELPO 8A3r1t_2 7615	CYP72 -2	cytochrome P450/ CYP 72A	NAQ8	7,80	5,06E-11	ARA8	10,04	1,83E-05			
AMBELPO 8A3r1t_4 8133	Dhs2	alcohol dehydrogenase- like 7	OCC13	7,81	5,12E-16	NAQ9	12,81	3,45E-02			
AMBELPO 8A3r1t_4 0047	HDL	bifunctional epoxide hydrolase 2-like	ARA8	2,25	8,96E-06	NAQ8	-2,39	1,83E-03			
AMBELPO 8A3r1t_3 1733	Tptr	uncharacterized transporter	ARA2	6,57	2,80E-25	NAQ8	-3,86	8,89E-04			
AMBELPO 8A3r1t_2 9358	GT-4	7-deoxyloganetin glucosyltransfera se-like	ARA2	5,32	1,47E-27	OCC13	-2,25	4,12E-02			
AMBELPO 8A3r1t_4 2447	GST-1	glutathione S- transferase T3- like	OCC13	1,99	8,71E-02	OCC13	-2,38	1,87E-02			
AMBELPO 8A3r1t_1 3971	MeT	homocysteine S- methyltransferas e 2 isoform X1	OCC13	5,72	5,36E-14	OCC13	-5,76	1,76E-02			
AMBELPO 8A3r1t_2 6652	GT-5	UDP- glycosyltransfera se 73C3-like	ARA2	7,78	1,18E-26	OCC13	-2,43	3,40E-02			
AMBELPO 8A3r1t_4 3085	CYP71 -3	cytochrome P450/ CYP 71B	ARA8	22,53	2,24E-02	ARA2	-15,21	3,71E-02			
AMBELPO 8A3r1t_4 4569	Dhs3	glycerate dehydrogenase	ARA8	9,12	1,2E-08	ARA2	-18,66	1,71E-07			

Caractérisation de l'effet du traitement sur l'expression des gènes des individus résistants et sensibles de chaque population

La réponse de chaque phénotype au traitement (R2HAT/RAT et S2HAT/SAT) a ensuite été évaluée pour chaque population (Tableau 10). Le nombre de gènes DE identifiés entre les deux modalités de traitement pour un phénotype et une population donnée est supérieur à celui obtenu pour la comparaison entre phénotypes de chaque population (Tableau 9 et Tableau 10). De plus, les DE mesurées pour le phénotype sensible sont plus importantes que pour le phénotype résistant (de 3734 à 10174 selon la population, Tableau 10). Enfin, le nombre de gènes induits à la fois chez les plantes sensibles et résistantes est également important, variant de 652 gènes pour la population ARA8 à 4139 pour la population NAQ9 (Tableau 10).

Tableau 10 : comparaison du nombre de gènes DE entre les deux modalités de traitement pour chaque phénotype et population de l'étude

Population	Number of DE genes between R samples before and 2 hours after treatment (R2HAT/RAT)	Number of DE genes between S samples before and 2 hours treatment (S2HAT/SAT)	Number of DE genes in R and S samples (both R2HAT/RAT and S2HAT/SAT)
ARA2	4287	8196	3000
ARA8	1329	3734	652
CLV5	1642	5824	1631
NAQ8	1152	6012	1344
NAQ9	1840	5036	4139
OCC13	795	10174	2594

Afin d'établir quels BP sont associés à ces gènes DE pour chaque phénotype et population, une analyse d'enrichissement GO a été conduite sur ces différentes listes de gènes DE. Les gènes induits par le traitement à la fois pour les phénotypes résistant et sensible appartiennent en majorité à des procédés biologiques liés à la perception du stress engendré par l'application de l'herbicide (« response to biotic stimulus », « response to external stimulus », « response to endogenous stimulus », « response to stress ») et se retrouvent pour cinq des six populations étudiées (Figure 20). Des voies de régulation sont également activées à la fois chez les plantes de phénotypes résistant et sensible (« regulation of gene expression, epigenetic », « phosphorelay signal transduction system », « signal transduction », « signaling », « cell communication ») pour quatre des six populations étudiées (Figure 20).

Ces BP liés à la perception du stress et aux changements de régulation sont également associés aux gènes induits chez les plantes résistantes uniquement (Figure 20) dans cinq des six populations étudiées. Une autre partie des gènes induits par le traitement uniquement chez les plantes résistantes

sont associés à des BP du métabolisme secondaire des plantes. Cela concerne, des activités de transport (« transport », « organophosphate ester transport », « transmembrane transport ») pour les populations NAQ8 et 9 et ARA8, des BP liés au catabolisme de molécules complexes comme les herbicides (« heterocycle/organic cyclic coupound catabolic process ») dans la population ARA8, des modifications protéiques (« protein modification process », « cell protein modification ») dans les populations OCC13 et NAQ9.

Concernant les gènes induits chez les plantes sensibles uniquement, des termes majoritairement associés à des BP du métabolisme primaire (« growth », « cell cycle », « photosynthesis », « reproduction ») (Figure 20) ont été identifiés dans toutes les populations. Des gènes impliqués dans la traduction des protéines sont également induits par le traitement pour quatre des six populations.

La perception du stress herbicide est donc enregistrée dans toutes les plantes quel que soit leur phénotype mais la mise en place d'une réponse du métabolisme secondaire est exclusive aux plantes résistantes.

Le recouplement des listes de gènes DE entre les échantillons prélevés avant et après traitement de chaque population pour le phénotype R a permis d'identifier des gènes induits par le traitement dans plusieurs populations (Tableau supplémentaire 4). Au total, 132 gènes sont induits par le traitement chez des plantes résistantes d'au moins trois populations (Tableau supplémentaire 4). Aucun gène n'est induit communément chez toutes les plantes résistantes de toutes les populations. Des gènes identifiés comme surexprimés avant traitement sont également induits par le traitement chez les plantes résistantes de plusieurs populations. C'est le cas de CYP71-3, identifié dans la population OCC13 et surexprimé après traitement dans la population CVL5, CYP71-2, identifié dans la population NAQ8 et surexprimé après traitement dans les populations ARA2 et NAQ9, DH2, identifié dans la population ARA2 et surexprimé après traitement dans les populations ARA8 et OCC13 et NAQ9, DH3, identifié dans la population NAQ8 et surexprimé après traitement dans les populations ARA2 et NAQ9 (Tableau supplémentaire 4). Ainsi, des gènes pouvant contribuer à la détoxification de l'herbicide pourraient être régulés à la hausse dès les deux heures qui suivent le traitement.

Chapitre 2

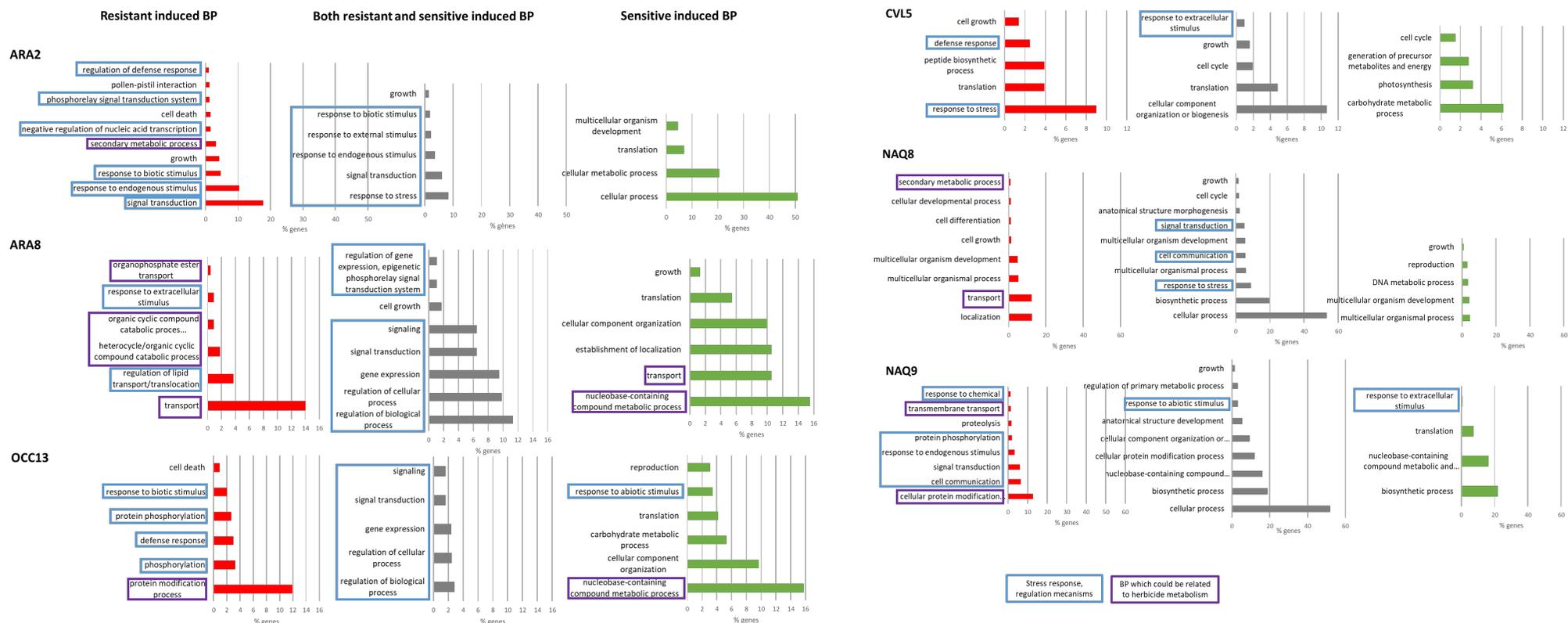


Figure 20 : Résultat de l'analyse d'enrichissement GO pour les gènes DE identifiés entre échantillons prélevés après et avant traitement (R2HAT/RAT et S2HAT/SAT) pour chacune des six populations. Les termes représentés sont significatifs au test elimFisher (p -value < 0,05) et représentent au moins 1 % des gènes induits dans la population concernée. En rouge sont représentés les termes associés aux gènes induits chez les plantes résistantes, en gris les termes associés aux gènes induits chez les plantes résistantes et sensibles ; en vert, les termes associés aux gènes induits chez les plantes sensibles.

Discussion

Cette étude conduite sur l'ambrosie est la première à avoir cherché à identifier les mécanismes de RNLC aux inhibiteurs de l'ALS constitutifs ou précocement induits ayant évolué chez une adventice dicotylédone en utilisant de très grands effectifs issus de multiples populations du terrain d'origines géographiques diverses. Elle est également la première à avoir entrepris d'identifier les mécanismes de RNLC dès leur émergence sur le terrain.

Une grande diversité de mécanismes a évolué entre les différentes populations d'ambrosie de cette étude

Les résultats de cette étude ont montré qu'une très grande diversité de mécanismes de RNLC a évolué entre différentes populations d'ambrosie échantillonnées dans différentes régions de France. En effet, aucun des gènes DE identifiés ne l'est communément à toutes les populations, aussi bien avant traitement qu'après traitement. De plus, les gènes constitutivement DE identifiés indépendamment dans chacune des populations ne concourent pas aux mêmes procédés biologiques ou fonctions moléculaires, ce qui suggère l'implication de voies métaboliques différentes dans chacune des populations. La comparaison des résultats obtenus avant et après traitement suggère également que les mécanismes de RNLC peuvent être davantage constitutifs ou induits selon la population étudiée. Les populations provenant de différentes zones géographiques, la variabilité entre populations peut résulter de phénomènes d'adaptation locale en réponse à des pressions de sélection différentes (Whitehead & Crawford 2006). Dans leur étude, Franco-Ortega et al. (2021) ont démontré par une expérience de sélection récurrente sur *Alopecurus myosuroides* que les plantes d'une même population soumises à différents schémas de sélection développent des mécanismes de RNLC distincts. La RNLC est le résultat de l'association de plusieurs voies métaboliques contribuant à éliminer l'herbicide avant qu'il n'atteigne sa cible (Gaines et al. 2020). Si la finalité de réduction de la quantité de substance active atteignant la cible est commune, il existe théoriquement de multiples voies pour arriver à ce résultat (Délye 2013). Différents schémas de sélection peuvent donc contribuer à sélectionner ces voies multiples. Cette théorie s'est par exemple vérifiée dans l'étude de Han et al. (2021) où les auteurs apportent la preuve de l'implication d'un gène CYP81 à métaboliser des herbicides de la famille de inhibiteurs de l'ALS, mais montrent également que la surexpression de ce gène ne se vérifie pas dans toutes les plantes résistantes étudiées, et ainsi que de multiples mécanismes ont évolués au sein des plantes des différentes populations. Aussi, par une approche génomique, Van Etten et al. (2020) indiquent que l'évolution de la RNLC au glyphosate dans différentes populations d'*Ipomoea purpurea* suit un schéma évolutif à la fois convergent pour certains des loci

Chapitre 2

identifiés, et divergent pour d'autres. La caractérisation des mécanismes de RNLC ayant évolué chez différentes espèces adventices et pour différents herbicides est un défi auquel beaucoup d'études se sont intéressées (Tableau 4). La diversité des gènes et des familles de gènes ainsi identifiés entre espèces, entre herbicides et entre populations d'une même espèce (Tableau 11) souligne bien toute la complexité et la diversité des mécanismes de RNLC possibles. D'ailleurs, cette diversité de mécanismes a déjà été observée pour l'ambrosie lorsque des mécanismes de RLC sont sélectionnés par les inhibiteurs de l'ALS. Tranel et al. (2004) et nos précédents travaux (Loubet et al. 2021) ont mis en évidence d'une part, un fort taux de polymorphisme présent dans le gène de l'ALS de différentes populations d'ambrosie et d'autre part, une grande diversité de mutations dans ce gène qui conduisent à de la RLC aux inhibiteurs de l'ALS dans différentes populations.

La plupart des études se concentrant sur l'identification des déterminismes génétiques de la RNLC chez une espèce adventice (Tableau 4) se limitent à valider leurs gènes candidats au sein de la population dans laquelle ils ont été identifiés, et souvent sur des effectifs indépendants mais réduits de plantes (de 3 à 12 plantes majoritairement, Tableau 4). Notre étude est une des seules à avoir évalué les DE mesurées en RNASeq sur un échantillonnage massif de plantes provenant de différentes populations (de 42 à 66 plantes par phénotype et par population dans six populations, soit 336 plantes au total). Quelques études font cependant exception, comme le cas de l'étude de la RNLC aux inhibiteurs de l'ALS chez *Lolium sp.* en France (Duhoux et al. 2017). Dans cette étude, les différences de niveaux d'expression entre plantes résistantes et sensibles ont été validées sur des échantillonnages massifs de plantes (au total, 219 plantes) provenant de 18 populations, et ont démontré l'évolution redondante d'un même jeu de mécanismes de RNLC chez les différentes populations étudiées chez cette espèce. Comme pour l'ambrosie, la résistance de *Lolium sp.* aux inhibiteurs de l'ALS a évolué rapidement en France, environ cinq ans après les premières applications de ces herbicides. Mais chez *Lolium sp.*, l'étude a été conduite en situation de résistance déjà généralisée à toute la France, avec des fréquences élevées de plantes résistantes dans les populations étudiées (Duhoux et al. 2017). Au contraire, chez l'ambrosie, la résistance est encore en émergence et reste pour le moment confinée à quelques foyers. Les populations étudiées présentent essentiellement de faibles fréquences de plantes résistantes (Loubet et al. 2021). Cette évolution peu marquée pour l'ambrosie, et apparemment, non redondante, peut résulter premièrement de la pression de sélection récente exercée par les inhibiteurs de l'ALS sur cette espèce dans les cultures où elle s'exprime. De plus, l'ambrosie ne se développe pas dans toutes les cultures d'une rotation complète, et n'est donc pas nécessairement soumise à la pression de sélection annuellement. Deuxièmement, cette évolution de la résistance moins marquée peut provenir d'une dilution de la résistance par un flux de gènes élevé entre populations (Chun et al. 2010). L'ambrosie étant une espèce monoïque principalement pollinisée par le vent à courte et à longue distance (Bassett & Crompton 1975; Clot et al. 2002), et présente en quantité importante dans

les zones étudiées, les flux génétiques entre plantes sensibles et résistantes provenant de différentes populations non soumises à la pression de sélection pourraient contribuer à diluer la résistance (Jasieniuk et al. 1996).

Tableau 11 : diversité des gènes possiblement impliqués dans la RNLC identifiés chez différentes adventices pour différents herbicides

	Specie	Mode of action	Active substance	Reference
Cytochrome P450				
CYP704B1	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Wang et al. 2021
CYP71	<i>Alopecurus aequalis Sobol.</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Zhao et al. 2017
	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ALS inhibitor	iodosulfuron + mesosulfuron	Gardin et al. 2015
	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ACCCase inhibitor/inhibitor of tubulin assembly resistance	pendimethalin, fenoxaprop	Franco-Ortega et al. 2021
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Pan et al. 2016
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Bai et al. 2020
	<i>Descurainia sophia</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Yang et al. 2016
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	Penoxsulam	Fang et al. 2019
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	tribenuron	this study
CYP72	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ACCCase inhibitor/inhibitor of tubulin assembly resistance	pendimethalin, fenoxaprop	Franco-Ortega. 2021
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Bai et al. 2020
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	Penoxsulam	Fang et al. 2019
	<i>Lolium rigidum</i>	ACCCase inhibitor	diclofop	Gaines et al. 2014
	<i>Lolium rigidum</i>	ALS inhibitor	pyroxsulam / iodosulfuron + mesosulfuron	Duhoux et al. 2015
	<i>Lolium sp.</i>	ALS inhibitor	pyroxsulam / iodosulfuron + mesosulfuron	Duhoux et al., 2017
	<i>Myosoton aquaticum</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Liu et al. 2018
	<i>Echinochloa phyllopogon</i>	ALS inhibitor	Bispyribac	Iwakami et al. 2014
	<i>Amaranthus palmeri</i>	Inhibition of glutamine synthetase	glufosinate	Salas-Perez et al. 2018
		<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox
CYP73	<i>Alopecurus aequalis Sobol.</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Zhao et al. 2017
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	Penoxsulam	Fang et al. 2019
	<i>Myosoton aquaticum</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Liu et al. 2018
CYP74	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	Penoxsulam	Fang et al. 2019

Chapitre 2

CYP76	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ACCCase inhibitor/inhibitor of tubulin assembly resistance	pendimethalin, fenoxaprop	Franco-Ortega. 2021	
	<i>Myosoton aquaticum</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Liu et al. 2018	
CYP77	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Zhang et al. 2021	
CYP78	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	penoxsulam	Fang et al. 2019	
CYP81	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ALS inhibitor	iodosulfuron + mesosulfuron	Gardin et al. 2015	
	<i>Avena fatua</i>	ACCCase/ALS inhibitor	pinoxaden	Keith et al. 2017	
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	Penoxsulam	Fang et al. 2019	
	<i>Lolium rigidum</i>	ALS inhibitor	pyroxsulam / iodosulfuron + mesosulfuron	Duhoux et al. 2015	
	<i>Lolium rigidum</i>	ACCCase/ALS inhibitor	pyroxsulam / iodosulfuron + mesosulfuron	Han et al. 2021	
	<i>Lolium sp.</i>	ALS inhibitor	pyroxsulam / iodosulfuron + mesosulfuron	Duhoux et al. 2017	
	<i>Echinochloa phyllopogon</i>	ALS inhibitor	bensulfuron and penoxsulam	Iwakami, Endo, et al. 2014	
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ACCCase/ALS inhibitors	Penoxsulam, cyhalofop-butyl and metamifop	Pan et al. 2022	
CYP82	<i>Echinochloa phyllopogon</i>	ALS et ACCCase inhibitors	diclofop, tralkoxydim, pinoxaden, bensulfuron	Iwakami et al. 2019	
	<i>Ipomoea purpurea</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Leslie et Baucom 2014	
	CYP86	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ACCCase inhibitor/inhibitor of tubulin assembly resistance	pendimethalin, fenoxaprop	Franco-Ortega. 2021
		<i>Beckmannia syzigachne</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Wang et al. 2021
		<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Zhang et al. 2021
		<i>Myosoton aquaticum</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Liu et al. 2018
		<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Pan et al. 2016
		<i>Poa annua</i>	ALS inhibitor	trifloxysulfuron	Laforest et al. 2021
	CYP87	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ACCCase inhibitor/inhibitor of tubulin assembly resistance	pendimethalin, fenoxaprop	Franco-Ortega. 2021
CYP89	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Wang et al. 2021	
CYP90	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	penoxsulam	Fang et al. 2019	
CYP93	<i>Alopecurus aequalis Sobol.</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Zhao et al. 2017	
CYP94	<i>Avena fatua</i>	ACCCase/ALS inhibitor	pinoxaden	Keith et al. 2017	
	<i>Polypogon fugax</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Zhao et al. 2021	
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox	this study	
CYP96	<i>Descurainia sophia</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Yang et al. 2016	
	<i>Descurainia sophia L</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Yang et al. 2018	
	<i>Polypogon fugax</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Zhao et al. 2021	

	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	Penoxsulam	Fang et al. 2019
CYP98	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	Penoxsulam	Fang et al. 2019
CYP99	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Bai et al. 2020
CYP05AK	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Zhang et al. 2021
CYP7090	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ACCCase inhibitor/inhibitor of tubulin assembly resistance	pendimethalin, fenoxaprop	Franco-Ortega. 2021
Gluthatione-s-transferase				
GST-Tau	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ACCCase inhibitor/inhibitor of tubulin assembly resistance	pendimethalin, fenoxaprop	Franco-Ortega. 2021
	<i>Avena fatua</i>	ACCCase/ALS inhibitor	pinoxaden	Keith et al. 2017
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Pan et al. 2016
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Wang et al. 2021
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Zhang et al. 2021
	<i>Lolium multiflorum</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Cechin et al. 2020
GST-Phi	<i>Alopecurus aequalis Sobol.</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Zhao et al. 2017
	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ACCCase inhibitor/inhibitor of tubulin assembly resistance	pendimethalin, fenoxaprop	Franco-Ortega. 2021
	<i>Avena fatua</i>	ACCCase/ALS inhibitor	pinoxaden	Keith et al. 2017
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Bai et al. 2020
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	Penoxsulam	Fang et al. 2019
GST-lambda	<i>Avena fatua</i>	ACCCase/ALS inhibitor	pinoxaden	Keith et al. 2017
GST-Theta	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	penoxsulam	Fang et al. 2019
GST	<i>Eleusine indica</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Wright, Sasidharan, et al. 2018
	<i>Eleusine indica</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Chen et al. 2018
	<i>Amaranthus palmeri</i>	Inhibition of glutamine synthetase	glufosinate	Salas-Perez et al, 2019
	<i>Conyza bonariensis</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Piasecki, Yang, et al. 2019
Glycosyl transférase				
	<i>Avena fatua</i>	ACCCase/ALS inhibitor	pinoxaden	Keith et al. 2017
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Bai et al. 2020
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Zhang et al. 2021
	<i>Lolium multiflorum</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Cechin et al. 2020
	<i>Lolium rigidum</i>	ACCCase inhibitor	diclofop	Gaines et al. 2014
	<i>Lolium rigidum</i>	ALS inhibitor	pyroxsulam / iodosulfuron + mesosulfuron	Duhoux et al. 2015
	<i>Lolium sp.</i>	ALS inhibitor	pyroxsulam / iodosulfuron + mesosulfuron	Duhoux et al. 2017

	<i>Conyza bonariensis</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Piasecki et al. 2019
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox and tribenuron	this study
Glucosyl transférèse				
	<i>Myosoton aquaticum L.</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Bai et al. 2018
	<i>Avena fatua</i>	ACCCase/ALS inhibitor	pinoxaden	Keith et al. 2017
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox and tribenuron	this study
Glucuronosyltransferase				
	<i>Alopecurus aequalis Sobol.</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Zhao et al. 2017
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Zhang et al. 2021
ABC transporter				
Family A	<i>Lolium multiflorum</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Cechin et al. 2020
Family B	<i>Alopecurus aequalis Sobol.</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Zhao et al. 2017
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Pan et al. 2016
	<i>Myosoton aquaticum L.</i>	ALS inhibitor	Tribenuron	Bai et al. 2018
Family C	<i>Alopecurus aequalis Sobol.</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Zhao et al. 2017
	<i>Avena fatua</i>	ACCCase/ALS inhibitor	pinoxaden	Keith et al. 2017
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	penoxsulam	Fang et al. 2019
	<i>Myosoton aquaticum</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Liu et al. 2018
	<i>Myosoton aquaticum L.</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Bai et al. 2018
	<i>Echinochloa colona</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Pan et al. 2021
	<i>Conyza bonariensis</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Piasecki et al. 2019
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox and tribenuron	this study
Family G	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Zhang et al. 2021
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	Penoxsulam	Fang et al. 2019
	<i>Myosoton aquaticum L.</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Bai et al. 2018
	<i>Poa annua</i>	ALS inhibitor	trifloxysulfuron	Laforest et al. 2021
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox	this study
Family I	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	penoxsulam	Fang et al. 2019
Oxidases				
	<i>Alopecurus aequalis Sobol.</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Zhao et al. 2017
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Pan et al. 2016
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Bai et al. 2020
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Zhang et al. 2021
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	penoxsulam	Fang et al. 2019

	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	tribenuron	this study
	<i>Lolium multiflorum</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Cechin et al. 2020
Peroxidase				
	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ALS inhibitor	iodosulfuron + mesosulfuron	Gardin et al. 2015
	<i>Capsella bursa-pastoris</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Zhang et al. 2021
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Bai et al. 2020
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	Penoxsulam	Fang et al. 2019
	<i>Myosoton aquaticum</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Liu et al. 2018
	<i>Myosoton aquaticum L.</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Bai et al. 2018
	<i>Conyza bonariensis</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Piasecki et al. 2019
Hydrolase				
	<i>Alopecurus aequalis Sobol.</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Zhao et al. 2017
	<i>Echinochloa crus-galli</i>	ALS inhibitor	penoxsulam	Fang et al. 2019
	<i>Myosoton aquaticum L.</i>	ALS inhibitor	tribenuron	Bai et al. 2018
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox and tribenuron	this study
	<i>Lolium sp.</i>	ALS inhibitor	pyroxulam / iodosulfuron + mesosulfuron	Duhoux et al. 2017
Esterase				
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox and tribenuron	this study
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCCase inhibitor	fenoxaprop	Pan et al. 2016
Catalase				
	<i>Poa annua</i>	ALS inhibitor	trifloxysulfuron	Laforest et al., 2021
	<i>Conyza bonariensis</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Piasecki et al. 2019
Disease resistance protein				
	<i>Alopecurus myosuroides</i>	ALS inhibitor	iodosulfuron + mesosulfuron	Gardin et al. 2015
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox and tribenuron	this study
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Wang et al. 2021
Leucine rich repeat domain				
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox and tribenuron	this study
At4g08850	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Wang et al. 2021
Transcription factor				
WRKY25, WRKY7, NAC, PLATZ, BTF3	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox and tribenuron	this study
MYC3	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Wang et al. 2021
O-methyltransferase				
	<i>Eleusine indica</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Wright et al. 2018

	<i>Conyza canadensis</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Yang et al. 2021
Kinase				
	<i>Alopecurus aequalis Sobol.</i>	ALS inhibitor	mesosulfuron	Zhao et al. 2017
	<i>Conyza canadensis</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Yang et al. 2021
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox and tribenuron	this study
FBOX				
	<i>Eleusine indica</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Wright et al. 2018
	<i>Beckmannia syzigachne</i>	ACCase inhibitor	fenoxaprop	Pan et al. 2016
	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	imazamox and tribenuron	this study
Other (few examples)				
Glucan endo-1,3-beta-glucosidase-GLC1	<i>Lolium multiflorum</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Cechin et al. 2020
germacrène d synthase	<i>Ipomoea purpurea</i>	EPSPS inhibitors	glyphosate	Leslie and Baucom 2014
germacrène d synthase	<i>Ambrosia artemisiifolia</i>	ALS inhibitor	tribenuron	this study

Une grande diversité de mécanismes a évolué au sein de chacune des populations

S'il ne semble pas exister de mécanismes de RNLC communs à toutes les populations étudiées, une diversité de mécanismes semble également avoir évolué au sein même des populations. En effet, les résultats ont révélé une absence de mécanismes de RNLC communs à toutes les plantes au sein de chaque population. Les combinaisons de gènes candidats constitutifs évaluées dans un premier temps comme les meilleures pour prédire la RNLC ont été testées sur un échantillonnage massif et indépendant de plantes. Les résultats ont montré que le niveau d'expression des gènes choisis ne permet pas de prédire avec justesse le phénotype des plantes sensibles. De plus, les analyses multivariées réalisées sur ce nouvel échantillonnage ont montré que seule une partie de ce nouvel échantillonnage présente les DE attendues. Ces résultats indiquent que le RNASeq a seulement permis de décrire une partie des mécanismes impliqués dans la RNLC de chacune des populations et que ceux-ci sont très probablement très variés au sein d'une population. Ce constat a été réalisé par Murphy, Beffa, et Tranel (2021) qui ont également observés au sein d'une population d'*Amaranthus tuberculatus* avec des plantes résistantes aux inhibiteurs de l'HPPD que plusieurs mécanismes ont évolués. La diversité de mécanismes de RNLC pouvant évoluer au sein d'une population d'ambrosie avait déjà été appréciée par J. Parrish (2015) lors de l'étude des mécanismes de RNLC au glyphosate. Cette diversité de mécanismes peut résulter de la diversité génétique présente au sein de chaque population, celle-ci étant clé dans le processus d'évolution de résistance aux herbicides (Neve et al.

2009). C'est cette diversité qui va lui offrir la possibilité de s'adapter à différents environnements et à une pression de sélection donnée (Jump et al. 2009). D'ailleurs, la diversité génétique des espèces sauvages est largement exploitée en sélection végétale afin de chercher des traits naturels de résistance aux maladies (Laine 2004), ou bien encore aux herbicides (*e.g.* variétés de tournesol tolérantes aux imidazolinones développées à partir de populations sauvages ayant évolué une résistance au champ (Sala et al. 2012)). En tant qu'espèce envahissante, l'ambrosie a été étudiée à plusieurs reprises en génétique des populations (Genton, Shykoff, et Giraud 2005 ; Chun et al. 2010 ; Hodgins et al. 2013 ; Gallien et al. 2016 ; Martin et al. 2016 ; Meyer et al. 2017). Toutes ces études ont observé une grande diversité génétique au sein des populations d'ambrosie qui lui permet de s'adapter à des environnements variés et donc potentiellement à la pression de sélection exercée par l'application d'herbicides.

Un autre élément d'explication de l'observation de cette diversité de mécanismes sélectionnée au sein de chacune des populations est que, comme discuté précédemment, la résistance de l'ambrosie aux inhibiteurs de l'ALS en France est encore en émergence. Ainsi, les mécanismes de RNLC les plus avantageux ne sont probablement pas encore fixés et évoluent encore.

Une grande diversité de familles de gènes a été identifiée

En raison de cette diversité observée inter et intra population, il est fort probable que seule une partie des gènes pouvant être impliqués dans la RNLC ait été identifiée par notre approche. Cependant, une grande partie des fonctions assignées aux gènes-candidats identifiés par les résultats sont cohérents avec les connaissances existantes sur les mécanismes pouvant conférer la RNLC. Délye (2013) décrit la RNLC comme un ensemble de mécanismes déclenchés par le stress lié à l'herbicide et qui conduisent à l'expression de gènes protecteurs et régulateurs. C

es deux types de gènes ont été identifiés dans cette étude.

En ce qui concerne les gènes régulateurs, les résultats de notre analyse GO suggèrent que des mécanismes de régulation de l'expression des gènes interviennent dans plusieurs populations de manière constitutive et induite. De plus, les DE mesurées avant traitement de deux potentiels gènes régulateurs ont été validés en qPCR fluidigm. Il s'agit d'un facteur de transcription (TF-1) et d'une protéine kinase (Ki-1). Les DE mesurées après traitement montrent également pour chacune des populations que des gènes de régulation sont induits par le traitement. Les changements de régulation de l'expression des gènes peuvent intervenir chez les plantes en réponse à un stress (Shalem et al. 2008). Les gènes régulateurs sont impliqués dans la signalisation et la régulation de la réponse au stress (Délye, 2013). En réponse à l'application de l'herbicide, le signal de stress est amené jusqu'aux gènes

Chapitre 2

régulateurs et déclenche la ou les cascades de réaction permettant à la plante de survivre (Markus et al. 2018).

Les gènes protecteurs quant à eux contribuent à réduire l'efficacité de l'herbicide par détoxification (par exemple, cytochromes à P450, oxydases, réductases, peroxydases, estérases, hydrolases, glutathion-s-transférases, transporteurs) (Délye 2013). Ce sont les gènes les plus décrits dans la littérature comme potentiels acteurs de la RNLC aux inhibiteurs de l'ALS chez différentes espèces adventices (Gaines et al. 2020 ; Délye, 2013). Notre étude a enregistré des DE pour ce type de gènes, aussi bien avant traitement qu'après traitement où certains sont spécifiquement induits chez les plantes résistantes.

Les fonctions moléculaires des termes GO identifiés avant traitement dans plusieurs populations de l'étude peuvent être associés à certains de ces gènes protecteurs. C'est le cas des termes reliés à des activités oxygénases, oxydoréductases et de transport transmembranaire. De plus, parmi les 30 gènes dont les niveaux d'expression avant traitement ont été validés en qPCR Fluidigm, 16 sont de potentiels gènes protecteurs codant pour des familles de gènes déjà identifiés dans la métabolisation d'herbicides (cytochromes à P450, oxydoréductase, estérases, hydrolases, gluco/glycosyltransférases, ABC transporteurs). En particulier, le gène CYP72-1, validé dans la population ARA2, appartient à la même famille qu'un gène identifié comme DE entre des plantes résistantes et sensibles au glufosinate d'*A. palmeri* (Salas-Perez et al. 2018) et entre des plantes résistantes et sensibles au tribénuron de *Myosoton aquaticum* (Liu et al. 2018). Les séquences les plus proches de celles de ces deux gènes ont chacune été recherchées dans le transcriptome de référence de l'ambrosie. Les deux gènes sont homologues à 77% (e -value $5,6^E-07$) et 77,4% (e -value $9,74^E-11$) respectivement au contig correspondant au gène-candidat CYP72-1. Cette famille de cytochrome P450 a également été détectée comme potentiellement impliquée dans la détoxification du diclofop par *L. rigidum* (Gaines et al. 2014) et dans une population d'*E. phyllopogon* avec des plantes résistantes aux inhibiteurs de l'ALS (Iwakami, Endo, et al. 2014). Le gène CYP71-1, identifié dans la population ARA2, appartient à une famille de gènes dont le rôle dans la détoxification d'herbicides de la famille des inhibiteurs de l'ALS a été démontré pour des cultures (résistance au triasulfuron et chlorsulfuron chez le soja et le blé, (Ohkawa et Inui 2015 ; Xiang, Wang, et Ren 2006)) et pour *Descurainia sophia* (Yang et al. 2018). Le gène CYP94, aussi identifié dans la population ARA2, appartient à une famille de gènes signalée dans une population d'*E. phyllopogon* avec des plantes résistantes aux inhibiteurs de l'ALS (Iwakami, Endo, et al., 2014) (homologie de 79% avec le contig CYP94, e -value 0,005) et dans une population d'*A. palmeri* avec des plantes résistantes au glufosinate (Salas-Perez et al. 2018) (homologie de 70,8% avec le contig de CYP94, e -value $2,08^E-25$). Les gènes identifiés codant pour des activités gluco/glycosyltransférases (GT1 à 4) peuvent contribuer à métaboliser l'herbicide par l'ajout d'un composant gluco/glycosyl qui réduira son activité et facilitera ensuite son transport (gènes ABC-

1 à 4) pour sa neutralisation (Gaines et al. 2020). De nombreux gènes de ces familles ont été identifiés chez d'autres espèces de mauvaises herbes résistantes aux inhibiteurs de l'ALS (Yu et Powles 2014).

Alors que beaucoup d'études se focalisent sur quelques gènes pouvant être directement impliqués dans la détoxification des herbicides pour expliquer la RNLC, nous avons également sélectionné certains gènes candidats dont le lien direct avec la RNLC est moins facile à établir mais dont le niveau d'expression semblait corrélé à la RNLC, et donc pouvant être des marqueurs de la présence de RNLC. Par exemple, nous avons sélectionné comme candidats des protéines de résistance aux maladies (DRP1 et 2), une enzyme impliquée dans la synthèse des terpènes (GMC) ou encore des domaines riches en leucine (F-box LRR) dont la surexpression a été vérifiée pour une partie de l'échantillonnage. D'autres études ont révélé la surexpression de protéines de résistance aux maladies chez des espèces adventices dont des individus sont résistants aux herbicides (Franco-Ortega et al. 2021 ; Gardin et al. 2015 ; Wang et al. 2021). Le gène codant pour la germacrène D synthase a également été identifié par Leslie et Baucom (2014) chez des plantes résistantes au glyphosate d'*Ipomoea purpurea*. Les protéines de résistance chez les plantes ainsi que les domaines riches en leucine sont impliqués dans la réponse des plantes à un stress pathogènes ou aux maladies (Demissie 2016). La germacrène synthase est associée à la réponse des plantes aux insectes ou aux micro-organismes (Arimura et al. 2000). Ces protéines pourraient aussi être liées aux cascades de régulation qui contrôlent l'expression de la RNLC, et donc être de potentiels marqueurs de sa présence.

Plus largement, parmi les termes GO identifiés associés à des gènes DE avant traitement dans plusieurs populations de l'étude, des gènes contribuant à la photosynthèse ont été mis en évidence. Or il a été montré que les inhibiteurs de l'ALS perturbent les systèmes de photosynthèse et de respiration cellulaire (Zhou et al. 2007). Ainsi, certaines des plantes résistantes pourraient présenter une photosynthèse plus importante que les plantes sensibles, contribuant au maintien de la photosynthèse chez les plantes résistantes par rapport aux plantes sensibles. Cette observation avait déjà été faite chez une population d'*Alopecurus aequalis* avec des plantes résistantes au mesosulfuron-methyl (Zhao et al. 2019). De plus, des termes reliés à la biosynthèse des acides aminés ont été relevés dans au moins deux populations de l'étude. Rappelons que les inhibiteurs de l'ALS ciblent l'ALS, une enzyme clé dans la synthèse des acides aminés à chaîne ramifiée (Zhou et al. 2007).

Réponse des plantes au traitement

Si l'étude de l'expression des gènes induits par le traitement montre l'implication de différents mécanismes entre les populations, leur regroupement par procédés biologiques lors de l'analyse GO a montré des similitudes dans la réponse des différentes populations. D'une part, nous avons constaté l'activation de voies de régulation du métabolisme pour les plantes résistantes et sensibles de toutes

Chapitre 2

les populations, mais également l'activation précoce du métabolisme secondaire spécifiquement chez les plantes résistantes, impliquant divers procédés pouvant contribuer à la dégradation des herbicides. De plus, nous avons constaté que les plantes résistantes et sensibles des différentes populations présentent un changement dans l'expression des gènes liés à la croissance des plantes. Également, le métabolisme primaire des plantes sensibles des différentes populations est affecté par le traitement. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature. En effet, les premiers symptômes apparaissant suite à l'application d'un inhibiteur de l'ALS sont l'arrêt de la croissance de la plante qui à terme, conduit à sa mort (Zhou et al. 2007). Nos résultats montrent que cet arrêt de croissance survient très rapidement après l'application du produit. De plus, l'application de l'herbicide est suivie par l'activation de voies spécifiques de réponse au stress ainsi que de l'activation de voies de détoxification des composés xénobiotiques (Manabe et al. 2007) ou de réduction du stress oxydatif généré par le traitement (Laforest et al. 2021), comme nous l'avons constaté dans cette étude. Les dommages oxydatifs liés à l'application de l'herbicide peuvent en effet perturber le métabolisme primaire des plantes (Zhou et al. 2007), comme c'est le cas ici pour les plantes sensibles.

Conclusion

Notre étude illustre parfaitement l'implication de mécanismes multiples pouvant conférer la RNLC à des plantes adventices. Nos précédents travaux (Loubet et al. 2021) ont montré l'implication d'une grande diversité de mécanismes de RLC pour différentes populations d'ambrosie. Cette étude montre également la capacité des plantes de cette espèce à mobiliser une diversité de mécanismes leur permettant de résister par RNLC aux inhibiteurs de l'ALS. Une de nos explications est que la résistance de l'ambrosie en France est encore peu évoluée et que les mécanismes de RNLC les plus optimaux ne se sont pas encore fixés au sein de chacune des populations. L'identification de gènes marqueurs généraux de la RNLC, pouvant permettre un diagnostic rapide de son évolution sur le terrain quelle que soit la population, reste donc encore impossible à ce stade.

Comme suggère Dyer (2018), une étude se focalisant sur les régulateurs primaires et les marqueurs physiologiques du stress lié à l'application de l'herbicide pourrait permettre d'identifier des gènes ou des marqueurs en amont de cette multitude de mécanismes. L'étude des réseaux de gènes co-régulés pourrait ainsi apporter des éléments de compréhension sur les éléments régulateurs de ces mécanismes. De plus, notre étude s'est limitée au suivi de l'expression des gènes seulement deux heures après traitement. Une cinétique plus complète incluant des points de suivi au-delà de ces deux heures (quatre, six, huit, 24 et 48 heures) permettrait d'évaluer si les mécanismes mobilisés par les plantes résistantes finissent par converger entre les différentes populations. Enfin, la présente étude ne s'est intéressée qu'à l'analyse quantitative du transcriptome de l'ambrosie. L'étude qualitative des

Chapitre 2

séquences issues du séquençage de l'ARN pourrait permettre d'identifier des marqueurs nucléotidiques liés à un phénotype, comme présenté par Giacomini et al. (2020).

Informations supplémentaires

Tableau supplémentaire 1 : Gènes différemment exprimés entre les plantes sensibles et résistantes identifiés en RNASeq communément à quatre, trois ou deux populations ; les niveaux d'expression relatifs surlignés en orange correspondent aux gènes surexprimés par les plantes résistantes, en vert à ceux sous-exprimés par les plantes résistantes, en gris, ceux pour lesquelles la différence d'expression n'est pas significative ; les accessions en gras correspondent aux candidats figurant sur cette liste et qui ont été sélectionnés pour validation des niveaux d'expression en qPCR.

Accession	Description	ARA8		CVL5		NAQ8		NAQ9		OCC13	
		Log2FC	Padj								
differentially expressed contigs in at least 4 population											
AMBELPO8A3r1t_18495	alpha-latrocrustotoxin-Lt1a	23,04	2,77E-09			19,34	1,63E-06	15,22	8,72E-04	21,99	1,62E-08
AMBELPO8A3r1t_04556	Transposon TX1	-15,05	6,72E-03	28,50	6,48E-12	-35,01	2,10E-21	5,76	3,40E-13		
AMBELPO8A3r1t_44453	cytochrome P450 71BL1			-31,45	2,61E-23	12,06	4,73E-04	-13,33	5,83E-04	-13,35	1,59E-03
differentially expressed contigs in at least 3 populations											
AMBELPO8A3r1t_11044	argonaute 4-like	-2,41	1,21E-02			3,13	4,43E-02			2,75	2,35E-02
AMBELPO8A3r1t_43169	Unknown	-11,87	4,70E-02					183,46	1,53E-35	31,62	1,18E-19
AMBELPO8A3r1t_20360	Unknown	-18,29	8,39E-03	-46,93	1,13E-24					-15,36	2,76E-02
AMBELPO8A3r1t_23123	SURP and G-patch domain-containing 1	15,50	4,50E-04	-16,47	4,28E-05	-15,50	2,33E-04				
AMBELPO8A3r1t_26309	germacrene D synthase	25,04	2,21E-08	-14,00	3,15E-03	16,36	6,06E-05				
AMBELPO8A3r1t_37504	uncharacterized mitochondrial g00810-like	-12,74	7,93E-03	-41,43	3,17E-47			-38,42	1,50E-39		
AMBELPO8A3r1t_27257	cytochrome P450 72A					9,94	7,56E-07	-10,97	8,83E-08	-7,14	1,37E-02

Chapitre 2

AMBELPO8A3r1t_42670	(+)-neomenthol dehydrogenase-like			7,59	6,95E-04	-6,64	1,55E-02	-7,13	1,02E-02
differentially expressed contigs in at least 2 populations									
AMBELPO8A3r1t_05870	transcription initiation factor TFIID subunit 5	5,39	2,17E-02					-6,02	3,88E-05
AMBELPO8A3r1t_00034	AF525305_2 AP endonuclease reverse transcriptase	-20,03	3,51E-02					-31,81	2,42E-04
AMBELPO8A3r1t_07657	probable sucrose-phosphate synthase 1	-7,86	2,56E-02					-9,26	3,10E-02
AMBELPO8A3r1t_46903	23 kDa jasmonate-induced - like	24,36	1,42E-09					-16,30	3,50E-03
AMBELPO8A3r1t_49318	---NA---	-21,10	7,10E-06			44,39	8,23E-32		
AMBELPO8A3r1t_49437	ribonuclease H	22,75	5,75E-03			24,36	1,85E-03		
AMBELPO8A3r1t_22928	ATP binding site-containing	21,56	1,39E-02			-22,24	8,10E-03		
AMBELPO8A3r1t_14770	H+-transporting two-sector alpha beta central related	-5,75	1,30E-03			-4,51	3,63E-02		
AMBELPO8A3r1t_17786	transcription factor ICE1-like	-4,36	4,86E-03			-4,90	1,04E-03		
AMBELPO8A3r1t_29565	polyadenylate-binding RBP45-like	-0,40	1,62E-02					-0,45	5,02E-03
AMBELPO8A3r1t_43625	secoisolariciresinol dehydrogenase-like	-16,18	4,86E-03	-40,29	6,91E-23				
AMBELPO8A3r1t_05223	---NA---	22,46	4,15E-09	19,50	1,39E-06				
AMBELPO8A3r1t_01192	calcium-transporting ATPase plasma membrane-type					16,45	4,96E-03	17,86	3,50E-03
AMBELPO8A3r1t_03581	subtilisin-like protease					-2,16	1,76E-03	2,47	8,53E-03
AMBELPO8A3r1t_13914	ankyrin repeat-containing -like					21,14	2,77E-12	17,09	3,38E-03
AMBELPO8A3r1t_03092	---NA---					-3,48	1,80E-02	-6,32	3,13E-02

Chapitre 2

AMBELPO8A3r1t_11584	Ankyrin repeat-containing			20,97	4,71E-11			22,03	4,48E-12
AMBELPO8A3r1t_32115	Enolase					24,01	2,07E-04	21,18	5,67E-03
AMBELPO8A3r1t_28387	zinc finger BED domain-containing RICESLEEPER 2-like					18,68	7,94E-11	22,38	8,91E-17
AMBELPO8A3r1t_19753	---NA---					-20,80	1,00E-05	16,26	1,26E-02
AMBELPO8A3r1t_08249	Disease resistance			0,92	4,22E-02	1,12	2,03E-03		
AMBELPO8A3r1t_30841	---NA---			-14,96	3,19E-02	16,54	3,32E-03		
AMBELPO8A3r1t_12057	beta-amyrin synthase			22,03	4,03E-12			-26,84	8,47E-19

Chapitre 2

Tableau supplémentaire 2 : Procédés biologiques et fonctions moléculaires associés aux listes de gènes identifiés comme différemment exprimés dans les six populations ARA2, ARA8, CVL5, NAQ8, NAQ9 et OCC13 et communs à quatre, trois ou deux de ces populations

		Biological process					
GO.ID	Term	Imazamox resistant plants		Tribenuron resistant plants			
		ARA2	ARA8	NAQ8	NAQ9	OCC13	CVL5
		Shared by 4 population					
GO:0006278	RNA-dependent DNA biosynthetic process	3,10E-07	4,60E-06	0,04058	0,04058		
		Shared by 3 populations					
GO:0015074	DNA integration	1,40E-06	0,0134			0,00796	
GO:0015074	DNA integration	1,40E-06	0,0134			0,00796	
GO:0015979	photosynthesis				0,01452	0,0252	2,50E-08
GO:0019748	secondary metabolic process	5,60E-05		0,02022	0,02022		
GO:0052482	defense response by cell wall thickening	0,04857	0,0238		0,02732		
GO:0052542	defense response by callose deposition	0,04857	0,0238		0,02732		
GO:0052544	defense response by callose deposition in cell wall	0,04857	0,0238		0,02732		
		Shared by 2 populations					
GO:0000027	ribosomal large subunit assembly		0,0023		0,00304		
GO:0001944	vasculature development		0,0377		0,04335		
GO:0002237	response to molecule of bacterial origin		0,0331		0,03804		
GO:0006310	DNA recombination	2,50E-05	0,037				
GO:0006413	translational initiation		0,0023			0,02543	
GO:0006468	protein phosphorylation	0,0026	0,0048				
GO:0006508	proteolysis	0,03345	0,0023				
GO:0006656	phosphatidylcholine biosynthetic process	0,00043			9,10E-05		
GO:0006833	water transport				0,02732	0,04769	
GO:0006855	drug transmembrane transport	0,03929			0,01516		
GO:0006952	defense response	5,60E-08		3,60E-08			
GO:0007131	reciprocal meiotic recombination	0,01434			0,00018		

Chapitre 2

GO:0009408	response to heat	0,03447			0,004
GO:0009625	response to insect		0,0048		0,00552
GO:0009690	cytokinin metabolic process		0,0238		0,02732
GO:0009727	detection of ethylene stimulus		0,0048		0,00552
GO:0009739	response to gibberellin		0,0331		0,03804
GO:0010105	negative regulation of ethylene-activated signaling pathway		0,0331		5,70E-06
GO:0030422	production of siRNA involved in RNA interference	0,04178	0,0033		
GO:0034754	cellular hormone metabolic process		0,0331		0,03804
GO:0042044	fluid transport				0,02732
GO:0044550	secondary metabolite biosynthetic process	3,00E-05		0,01117	0,04769
GO:0050665	hydrogen peroxide biosynthetic process		0,0096		3,00E-05
GO:0055114	oxidation-reduction process	0,00106	0,0443		
GO:0071806	protein transmembrane transport		0,0189		0,02466
GO:0071897	DNA biosynthetic process			0,0173	0,0173
GO:0072358	cardiovascular system development		0,0377		0,04335
GO:0072359	circulatory system development		0,0377		0,04335
GO:0090305	nucleic acid phosphodiester bond hydrolysis		0,0082	0,02022	
GO:1900140	regulation of seedling development		0,0238		0,02732

Molecular function						
GO.ID	Term	Imazamox resistant plants		Tribenuron resistant plants		
		ARA2	ARA8	NAQ8	NAQ9	OCC13
Shared by 4 populations						
GO:0003964	RNA-directed DNA polymerase activity	1,40E-07	6,60E-06	0,0442	0,0321	
GO:0005524	ATP binding	0,04173	0,00183		0,01842	0,0277
Shared by 3 populations						
GO:0004672	protein kinase activity	0,01187	0,00649		0,03567	
GO:0035639	purine ribonucleoside triphosphate bindi,,			0,0426	0,0285	0,04724

Chapitre 2

GO:0043531 ADP binding	1,30E-07	2,10E-08	0,0477
Shared by 2 populations			
GO:0003677 DNA binding	0,04285	0,00333	
GO:0003743 translation initiation factor activity		0,00273	0,02195
GO:0003824 catalytic activity	0,01146		5,70E-05
GO:0004029 aldehyde dehydrogenase (NAD+) activity	0,01841		0,04131
GO:0004030 aldehyde dehydrogenase [NAD(P)+] activity	0,01841		0,04131
GO:0004190 aspartic-type endopeptidase activity	4,00E-12	0,01114	
GO:0004252 serine-type endopeptidase activity		0,00047	0,00437
GO:0004519 endonuclease activity		0,00435	0,0345
GO:0004674 protein serine/threonine kinase activity		0,03682	0,0115
GO:0008080 N-acetyltransferase activity		0,0367	0,0049
GO:0008144 drug binding			0,02283 0,03608
GO:0008353 RNA polymerase II CTD heptapeptide repeat kinase activity	0,00012		0,04131
GO:0015399 primary active transmembrane transporter activity	0,02214		0,0345
GO:0016630 protochlorophyllide reductase activity	0,01647		0,00028
GO:0016705 oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	0,01595		0,0119
GO:0016707 gibberellin 3-beta-dioxygenase activity		0,01578	0,0178
GO:0016709 oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen, NAD(P)H as one donor, and incorporation of one atom of oxygen	0,01179		0,0105
GO:0032559 adenylyl ribonucleotide binding			0,03985 0,04998
GO:0034061 DNA polymerase activity			0,0179 0,01168
GO:0038199 ethylene receptor activity		0,02616	1,40E-06
GO:0042626 ATPase-coupled transmembrane transporter activity	0,0199		0,0335
GO:0042802 identical protein binding			0,0387 0,00261
GO:0051740 ethylene binding		0,03131	2,80E-06

Chapitre 2

Tableau supplémentaire 3 : Liste des 121 gènes candidats identifiés comme différemment exprimés entre plantes résistantes et sensibles et sélectionnés indépendamment dans les populations ARA2, ARA8, CVL5, NAQ8, NAQ9 et OCC13 pour validation en qPCR Fluidigm ; les accessions surlignées en vert correspondent aux accessions identifiées dans plusieurs populations

Experiment	Accession	Contig code	Description	Log2FC RAT/SAT	p-value adjusted
			ARA 2		
	AMBELPO8A3r1t_03227	ABC-1	ABC transporter C family member 3-like - multidrug resistance-associated protein	5,69	1,49E-44
	AMBELPO8A3r1t_03505	DRP-3	disease resistance At4g27190-like isoform X2	2,69	4,15E-02
	AMBELPO8A3r1t_05513	RNAi	argonaute 2-like (RNA silencing)	3,67	3,95E-21
	AMBELPO8A3r1t_06270	ATPbind	ATP binding site-containing	6,18	7,27E-46
	AMBELPO8A3r1t_06566	LRR-1	Leucine-rich repeat-containing	4,71	6,94E-02
	AMBELPO8A3r1t_08466	DRP-4	Disease resistance	5,16	2,08E-27
	AMBELPO8A3r1t_10380	EF	elongation factor	5,06	2,88E-23
	AMBELPO8A3r1t_16881	TF-2	Transcription factor, LHY-like isoform X3	4,47	7,93E-24
	AMBELPO8A3r1t_18733	Uknw-9	unnamed protein product	7,94	4,51E-36
	AMBELPO8A3r1t_19591	TF-3	Transcription factor, scarecrow 14	5,20	2,89E-38
RNASeq 1	AMBELPO8A3r1t_23324	Ank	ankyrin repeat-containing At5g02620-like/protein phosphorylation	2,23	7,98E-03
	AMBELPO8A3r1t_23585	MetaCyc	ATP-dependent zinc metalloprotease -like	5,37	1,28E-23
	AMBELPO8A3r1t_24051	TF-4	probable WRKY transcription factor 25	4,41	4,96E-21
	AMBELPO8A3r1t_24599	CBS	CBS domain-containing CBSCBSPB5-like	3,54	0,00000816
	AMBELPO8A3r1t_24625	GT-2	UDP-glycosyltransferase 74G1-like -	4,44	1,84E-21
	AMBELPO8A3r1t_26065	Clmd	Calmodulin binding	5,73	1,92E-45
	AMBELPO8A3r1t_26646	CYP72-1	cytochrome P450 CYP72A219-like	4,35	2,66E-28
	AMBELPO8A3r1t_26652	GT-5	UDP-glycosyltransferase 73C3-like	7,78	1,18E-26
	AMBELPO8A3r1t_28129	GT-6	anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 2-like	8,02	7,66E-34
	AMBELPO8A3r1t_28888	TF-1	WRKY 7 transcription	3,18	1,02E-08
	AMBELPO8A3r1t_29175	GT-1	anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 2-like	6,13	3,45E-49

Chapitre 2

	AMBELPO8A3r1t_29204	Plm	probable inactive poly [ADP-ribose] polymerase SRO5/response to stress	4,50	2,40E-20
	AMBELPO8A3r1t_29358	GT-4	7-deoxyloganetin glucosyltransferase-like	5,32	1,47E-27
	AMBELPO8A3r1t_31352	OX-2	ubiquinol oxidase mitochondrial	8,47	4,18E-44
	AMBELPO8A3r1t_31733	Tptr	uncharacterized transporter	6,57	2,80E-25
	AMBELPO8A3r1t_33286	CYP94	cytochrome P450 94A2-like	2,25	4,21E-03
	AMBELPO8A3r1t_33456	HDL-2	Acyl hydrolase	1,38	2,98E-02
	AMBELPO8A3r1t_34804	NAC-1	NAC transcription factor	4,32	9,73E-14
	AMBELPO8A3r1t_38671	ACOX-2	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase	4,12	4,29E-23
	AMBELPO8A3r1t_38884	NAC-2	NAC domain-containing	4,15	5,19E-30
	AMBELPO8A3r1t_39517	NAC-3	NAC transcription factor	7,31	1,25E-55
	AMBELPO8A3r1t_40213	CYP72-3	cytochrome P450/ CYP72A	5,75	4,50E-50
	AMBELPO8A3r1t_40970	Red1	D-galacturonate reductase-like	1,82	6,01E-02
	AMBELPO8A3r1t_40995	TF-5	PLATZ transcription factor family	6,00	4,01E-30
	AMBELPO8A3r1t_41593	MetPept	Metallopeptidase	7,38	3,41E-27
	AMBELPO8A3r1t_45488	Dehydrogenase - DH2	secoisolariciresinol dehydrogenase-like	8,36	7,31E-36
	AMBELPO8A3r1t_45904	Uknw-2	PREDICTED: uncharacterized protein LOC107001718	6,87	3,07E-24
	AMBELPO8A3r1t_48311	GST-1	probable glutathione S-transferase	5,30	4,09E-15
	AMBELPO8A3r1t_50424	Clmd-2	calmodulin	6,26	7,89E-23
	AMBELPO8A3r1t_50442	Allerg-1	Allergen protein/Bet v I domain-containing	6,72	4,98E-37
	AMBELPO8A3r1t_02883	ABC-2	ABC transporter G family member 29-like	1,53	4,95E-06
	AMBELPO8A3r1t_38830	Est-1	GDSL esterase lipase At1g29670-like	1,57	3,64E-04
RNASeq 3a	AMBELPO8A3r1t_09064	Kinase - Ki-1	probable LRR receptor-like serine threonine- kinase At1g06840 isoform X1	2,18	1,51E-03
	AMBELPO8A3r1t_08616	DRP-5	TMV resistance N-like	3,15	6,02E-02
	AMBELPO8A3r1t_37749	Uknw-3	---NA---	2,19	6,31E-02

ARA8

Chapitre 2

	AMBELPO8A3r1t_00807	DRP-9	Disease resistance	1,98	2,33E-03
	AMBELPO8A3r1t_06566	LRR-1	Leucine-rich repeat-containing	1,86	8,18E-03
RNASeq 2	AMBELPO8A3r1t_19926	Met-Transf	mRNA cap guanine-N7 methyltransferase 1-like	3,66	1,49E-02
	AMBELPO8A3r1t_21520	ubb	polyubiquitin-C isoform X3	6,89	6,81E-10
	AMBELPO8A3r1t_28888	TF-1	WRKY 7 transcription	2,51	5,58E-02
	AMBELPO8A3r1t_40047	Hydrolase - HDL	bifunctional epoxide hydrolase 2-like	2,25	8,96E-06
	AMBELPO8A3r1t_44569	Dhs3	glycerate dehydrogenase	9,12	1,20E-08
	AMBELPO8A3r1t_50009	Uknw-4	---NA---	7,20	3,08E-05
RNASeq 3a	AMBELPO8A3r1t_46903	Jsm	23 kDa jasmonate-induced -like	24,36	1,42E-09
	AMBELPO8A3r1t_43539	Phs-2	inorganic pyrophosphatase 1-like	2,38	4,53E-03
	AMBELPO8A3r1t_37022	Phosphatase - Phs	pseudouridine-5 -monophosphatase	2,51	4,79E-02
	AMBELPO8A3r1t_26309	Germacrene synthase - GMC	germacrene D synthase	10,82	5,12E-02
OCC13					
RNASeq 2	AMBELPO8A3r1t_01217	ABC-5	ABC transporter C family member 8	1,96	4,19E-02
	AMBELPO8A3r1t_06336	DRP-7	TMV resistance N-like	2,96	2,26E-09
	AMBELPO8A3r1t_07300	Nt-Tp	mitochondrial adenine nucleotide transporter ADNT1-like	4,42	3,86E-06
	AMBELPO8A3r1t_07301	DRP-6	Disease resistance	2,78	5,46E-08
	AMBELPO8A3r1t_09208	DRP-1	disease resistance At4g27190-like	3,09	7,55E-13
	AMBELPO8A3r1t_11284	Uknw-1	Uncharacterized protein	10,22	8,65E-20
	AMBELPO8A3r1t_12637	Uknw-5	---NA---	10,79	1,28E-04
	AMBELPO8A3r1t_13971	MeT	homocysteine S-methyltransferase 2 isoform X1	5,72	5,36E-14
	AMBELPO8A3r1t_19418	Cat-Tp	cation transport regulator 2	4,53	7,20E-09
	AMBELPO8A3r1t_23299	HDL-4	Glycoside hydrolase catalytic domain-containing	2,13	4,56E-10
	AMBELPO8A3r1t_28353	GT-7	anthocyanidin 3-O-glucosyltransferase 2-like	3,68	4,59E-05

Chapitre 2

	AMBELPO8A3r1t_34767	Ki-2	adenylate kinase 4	4,15	1,48E-09
	AMBELPO8A3r1t_42447	GST-2	glutathione S-transferase T3-like	1,99	8,71E-02
	AMBELPO8A3r1t_43085	CYP71-3	cytochrome P450/ CYP 71B	22,53	2,24E-02
	AMBELPO8A3r1t_47575	Dehydrogenase - DH	secoisolariciresinol dehydrogenase-like	1,76	3,54E-03
	AMBELPO8A3r1t_48133	Dhs-2	alcohol dehydrogenase-like 7	7,81	5,12E-16
	AMBELPO8A3r1t_50455	Uknw-6	---NA---	11,39	6,40E-05
NAQ8					
	AMBELPO8A3r1t_01118	DRP-2	Disease resistance	3,47	3,47E-02
	AMBELPO8A3r1t_02502	Ki-3	Cysteine-rich receptor kinase 29	2,40	1,15E-04
	AMBELPO8A3r1t_03505	DRP-3	disease resistance At4g27190-like isoform X2	2,19	4,08E-04
	AMBELPO8A3r1t_07591	DRP-8	TMV resistance N-like	3,20	1,53E-07
	AMBELPO8A3r1t_08441	LRR-2	probably inactive leucine-rich repeat receptor kinase At3g28040	1,97	9,31E-05
	AMBELPO8A3r1t_11896	EST-3	glycerophosphodiester phosphodiesterase GDPDL3-like	2,92	6,31E-06
	AMBELPO8A3r1t_12695	BT1	BTB POZ and TAZ domain-containing 1-like/ protein modification	2,99	1,89E-05
	AMBELPO8A3r1t_13045	LRR-3	Leucine-rich repeat-containing	1,96	2,74E-03
	AMBELPO8A3r1t_15696	Transporter - TBC	TBC1 domain family member 8B	3,75	5,53E-04
RNASeq 2	AMBELPO8A3r1t_16445	gyp1	Ypt Rab-GAP domain of gyp1p superfamily isoform 2/ GTPase activity	3,01	1,77E-04
	AMBELPO8A3r1t_16836	HDL-3	Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase isoform 1	1,93	3,34E-02
	AMBELPO8A3r1t_19678	GT-8	phosphatidylinositol n-acetylglucosaminyltransferase subunit	2,39	8,00E-02
	AMBELPO8A3r1t_20192	SCP	serine carboxypeptidase-like 34	1,47	5,74E-04
	AMBELPO8A3r1t_23324	Ank	ankyrin repeat-containing At5g02620-like	2,71	2,48E-06
	AMBELPO8A3r1t_31358	Uknw-7	UPF0481 At3g47200-like	3,62	1,66E-04
	AMBELPO8A3r1t_34524	Pept	Peptidase SUMO Sentrin Ubl1	3,03	2,68E-04
	AMBELPO8A3r1t_34554	F-box FBD LRR	F-box FBD LRR-repeat At1g13570	1,43	5,54E-04
	AMBELPO8A3r1t_34804	NAC-1	NAC transcription factor	1,86	4,72E-02
	AMBELPO8A3r1t_35717	ACOX-3	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1-like	1,82	1,73E-02

Chapitre 2

	AMBELPO8A3r1t_38863	OX	probable quinone oxidoreductase	1,97	1,55E-03
	AMBELPO8A3r1t_40970	Red1	D-galacturonate reductase-like	2,27	6,04E-11
	AMBELPO8A3r1t_46998	LRR-4	F-box LRR-repeat At5g63520-like	1,84	1,62E-02
	AMBELPO8A3r1t_47317	Uknw-8	DUF2996 family	1,98	7,33E-05
	AMBELPO8A3r1t_47551	TF-7	transcription factor BTF3 homolog 4-like	6,23	1,77E-04
	AMBELPO8A3r1t_49186	PCBD1	pterin-4-alpha-carbinolamine dehydratase	1,38	2,35E-04
	AMBELPO8A3r1t_50756	Ank-2	Ankyrin repeat-containing	2,78	1,07E-03
	AMBELPO8A3r1t_51221	AOP1	probable 2-oxoglutarate-dependent dioxygenase AOP1	5,31	6,47E-03
	AMBELPO8A3r1t_09396	ABC-3	ABC transporter C family member 3-like	1,12	5,61E-03
	AMBELPO8A3r1t_11284	Uknw-1	---NA---	13,18	1,72E-06
	AMBELPO8A3r1t_14942	CYP71-1	cytochrome P450/ CYP71A	2,76	2,16E-05
	AMBELPO8A3r1t_24408	Ki-4	CDPK-related kinase 5-like	2,31	8,79E-03
	AMBELPO8A3r1t_26309	Germacrene synthase - GMC	germacrene D synthase	16,36	6,06E-05
	AMBELPO8A3r1t_27615	CYP72-2	cytochrome P450/ CYP 72A	7,80	5,06E-11
	AMBELPO8A3r1t_31899	GT-3	UDP-glycosyltransferase 87A1-like	-2,43	7,24E-12
	AMBELPO8A3r1t_36623	ACOX	1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homolog 1-like	3,34	1,42E-04
RNASeq 3a	AMBELPO8A3r1t_37719	Est-2	GDSL esterase lipase At5g45670-like	1,22	8,22E-02
	AMBELPO8A3r1t_37749	Uknw-3	---NA---	7,73	2,12E-03
		Polygalacturonase inhibitor -			
	AMBELPO8A3r1t_39160	PGI	polygalacturonase inhibitor-like	2,17	5,86E-03
	AMBELPO8A3r1t_40817	Coat	coatomer subunit beta -2-like	4,87	1,06E-02
		Dehydrogenase - DH3			
	AMBELPO8A3r1t_42670		(+)-neomenthol dehydrogenase-like	7,59	6,95E-04
	AMBELPO8A3r1t_44453	CYP71-2	cytochrome P450, family 71, subfamily B	12,06	4,73E-04
	AMBELPO8A3r1t_47638	TF-6	ethylene-responsive transcription factor 2	4,11	1,13E-03

CVL5					
	AMBELPO8A3r1t_12716	PUMP	Para-hydroxybenzoic acid efflux pump subunit fusaric acid resistance	2,13	6,28E-02
	AMBELPO8A3r1t_25442	CYP76	cytochrome P450 / CYP76C	2,14	8,90E-02
	AMBELPO8A3r1t_29031	SCP-2	serine carboxypeptidase-like	2,35	3,22E-02
	AMBELPO8A3r1t_30787	OX-3	1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase	4,11	4,17E-02
RNASeq 3a	AMBELPO8A3r1t_31392	Protease - PROT	Aspartic protease in guard cell-2-like	2,98	2,76E-02
	AMBELPO8A3r1t_32917	FBC	fructose-bisphosphate cytoplasmic isozyme 1	2,89	9,71E-03
	AMBELPO8A3r1t_37545	CYP b561	cytochrome b561 and DOMON domain-containing At3g07570-like	2,71	2,93E-02
	AMBELPO8A3r1t_40970	Red1	D-galacturonate reductase-like	2,47	4,54E-02
	AMBELPO8A3r1t_43880	CAH	carbonic anhydrase 3	3,72	9,00E-03
NAQ9					
	AMBELPO8A3r1t_19681	ABC-4	ABC transporter C family member 14-like	4,40	3,07E-02
RNASeq 3a	AMBELPO8A3r1t_28567	CYP71-4	cytochrome P450, 71A24	1,80	8,60E-03
	AMBELPO8A3r1t_05664	GCR	lanC GCR2 /ABA binding	8,73	2,75E-04

Chapitre 2

Tableau supplémentaire 4 : Gènes différemment exprimés avant et après traitement chez les plantes résistantes communément à deux ou trois populations ; les accessions surlignées en bleu correspondent à celles identifiées comme différemment exprimées entre plantes résistantes et sensibles avant traitement ; les niveaux d'expression surlignés en orange et en vert correspondent respectivement aux gènes surexprimés et sous-exprimés ; les fonctions surlignées en jaune correspondent à celles identifiées avant traitement

Contig accession	Log2FC (R2HAT/RAT)-ARA2		Log2FC (R2HAT/RAT)-ARA8		Log2FC (R2HAT/RAT)-OCC13		Log2FC (R2HAT/RAT)-CVL5		Log2FC (R2HAT/RAT)-NAQ8		Log2FC (R2HAT/RAT)-NAQ9		Description
	Log2FC	padj-	Log2FC	padj-	Log2FC	padj-	Log2FC	padj-	Log2FC	padj-	Log2FC	padj-	
differentially expressed contigs in at least 3 population													
AMBELPO8A3r1t_43085	-17,79	6,23E-04	24,50	1,94E-08			15,23	3,27E-03					cytochrome P450/CYP 71B
AMBELPO8A3r1t_43169	-15,44	5,15E-03	24,06	1,13E-08	-15,07	7,96E-03							---NA---
AMBELPO8A3r1t_36509	-25,07	3,93E-11	24,90	6,28E-13					14,77	5,96E-04			---NA---
AMBELPO8A3r1t_25815	-23,60	4,62E-10	23,78	3,86E-12					14,61	3,26E-04			
AMBELPO8A3r1t_30592	17,30	1,95E-08	21,89	6,16E-18							7,27	1,66E-02	serine threonine-kinase RIO1-like
AMBELPO8A3r1t_38532	-16,04	2,60E-05	28,10	2,60E-21							9,99	1,14E-03	premnaspirodiene oxygenase-like
AMBELPO8A3r1t_04354	3,23	1,34E-02					2,82	2,19E-02			3,00	7,19E-03	ATP binding site-containing
AMBELPO8A3r1t_18437	3,59	1,59E-03			2,95	1,86E-02					2,41	4,95E-02	probable L-type lectin-domain containing receptor kinase
AMBELPO8A3r1t_44453	8,48	2,77E-03					-18,30	6,50E-12			6,93	6,87E-03	cytochrome P450, family 71, subfamily B
AMBELPO8A3r1t_48551					6,86	5,19E-03	7,04	1,92E-03			6,33	3,59E-03	Myb protein - DNA binding
AMBELPO8A3r1t_45488			3,67	3,46E-02	3,60	3,87E-02					4,50	9,46E-04	secoisolaricresinol dehydrogenase-like

Chapitre 2

	differentially expressed contigs in at least 2 populations								
AMBELPO8A3r1t_04927	-3,46	3,00E-02	3,60	1,82E-02					subtilisin-like protease
AMBELPO8A3r1t_10046	-10,35	7,82E-03	10,45	7,81E-03					---NA---
AMBELPO8A3r1t_16079	5,97	1,57E-03	4,39	1,97E-02					cytochrome P450 family 72
AMBELPO8A3r1t_28017	21,59	1,69E-09	22,42	6,28E-13					UPF0481 At3g47200-like
AMBELPO8A3r1t_33408	-22,76	1,98E-02	22,70	1,98E-02					F-box interaction domain
AMBELPO8A3r1t_13389	23,05	3,81E-11				19,01	2,07E-09		ankyrin repeat-containing At5g02620-like
AMBELPO8A3r1t_15092	2,43	6,83E-03				2,72	1,63E-03		Actin cross-linking
AMBELPO8A3r1t_17716	34,24	4,07E-16				-45,18	3,11E-41		---NA---
AMBELPO8A3r1t_28052	3,51	1,80E-02				3,01	3,52E-02		Acyl hydrolase
AMBELPO8A3r1t_28695	2,81	3,18E-02				4,15	1,00E-03		AAA-ATPase At2g46620-like
AMBELPO8A3r1t_32147	3,54	2,33E-02				4,19	1,99E-03		G-type lectin S-receptor-like serine threonine-kinase SD2-5
AMBELPO8A3r1t_34364	3,54	5,40E-03				2,72	2,49E-02		heat stress transcription factor A-4a
AMBELPO8A3r1t_34466	2,95	3,95E-02				3,11	1,78E-02		probable purple acid phosphatase 20
AMBELPO8A3r1t_36336	3,40	2,97E-02				3,89	4,14E-03		G-type lectin S-receptor-like serine threonine-kinase SD2-5

Chapitre 2

AMBELPO8A3r1t_42612	15,16	1,22E-02			14,75	7,17E-03			---NA---
AMBELPO8A3r1t_46596	3,07	3,51E-02			3,46	9,74E-03			Myb protein - DNA binding
AMBELPO8A3r1t_01310	2,26	4,76E-02		-2,19	4,99E-02				vacuolar amino acid transporter 1
AMBELPO8A3r1t_02706	2,55	4,16E-02		3,02	1,50E-02				TMV resistance N-like isoform X1
AMBELPO8A3r1t_07424	2,23	1,06E-02		2,20	1,63E-02				cysteine-rich receptor kinase 2
AMBELPO8A3r1t_08133	1,82	3,43E-02		2,11	1,33E-02				LRR receptor-like serine threonine-kinase FLS2
AMBELPO8A3r1t_12980	2,05	4,45E-03		2,52	3,70E-04				U-box domain-containing 4-like homeobox-DDT domain RLT1 isoform X2
AMBELPO8A3r1t_13962	7,11	2,94E-02		-5,78	3,16E-02				endoribonuclease Dicer homolog 1 sulfate transporter - like
AMBELPO8A3r1t_17346	-4,95	5,15E-03		-3,96	4,62E-02				ankyrin repeat-containing At5g02620-like
AMBELPO8A3r1t_18835	2,28	4,97E-02		2,85	2,12E-02				pectinesterase-like
AMBELPO8A3r1t_24076	5,32	8,41E-03		7,32	4,41E-03				serine carboxypeptidase-like 18
AMBELPO8A3r1t_26323	3,65	5,26E-03		4,40	8,69E-03				LRR receptor-like kinase
AMBELPO8A3r1t_29653	-2,46	3,40E-02		-2,58	3,65E-02				Ankyrin repeat-containing
AMBELPO8A3r1t_45874	2,08	1,41E-02		2,26	1,02E-02				
AMBELPO8A3r1t_02599	-2,53	4,92E-02					-2,37	4,70E-02	

Chapitre 2

AMBELPO8A3r1t_12992	4,63	2,33E-02				-5,01	5,70E-03		TLD-domain containing nucleolar isoform 2	
AMBELPO8A3r1t_16958	-1,72	7,82E-03				-2,58	6,67E-07		stromal 70 kDa heat shock-related chloroplastic	
AMBELPO8A3r1t_24897	8,31	3,53E-03				-5,00	2,22E-02		ribonuclease H	
AMBELPO8A3r1t_25363	5,53	2,34E-02				-6,48	2,22E-03		TLD-domain containing nucleolar isoform 2	
AMBELPO8A3r1t_27603	19,36	5,18E-10				-10,33	1,11E-03		UPF0481 At3g47200	
AMBELPO8A3r1t_49071	2,52	1,21E-02				-2,18	2,49E-02		plastid-targeted 2	
AMBELPO8A3r1t_00653	3,14	3,66E-02						2,98	1,58E-02	probable leucine-rich repeat receptor-like serine threonine-kinase At3g14840
AMBELPO8A3r1t_03041	4,78	1,65E-02						3,31	3,17E-02	AC099402_4 22 kDa kafirin cluster Ty3-Gypsy type
AMBELPO8A3r1t_04556	24,73	3,86E-06						-28,20	1,94E-10	Transposon TX1 uncharacterized
AMBELPO8A3r1t_10104	1,72	4,85E-02						-2,43	2,60E-04	subtilisin-like serine protease
AMBELPO8A3r1t_10534	3,67	4,66E-02						-3,08	4,75E-02	Phox-associated domain-containing G-type lectin S-receptor-like serine threonine-kinase CES101
AMBELPO8A3r1t_12461	5,24	1,97E-03						3,02	4,61E-02	
AMBELPO8A3r1t_14949	-2,33	3,23E-02						-2,47	9,45E-03	cyclic pyranopterin monophosphate synthase accessory mitochondrial

Chapitre 2

AMBELPO8A3r1t_15655	4,11	2,49E-02					-3,93	4,11E-03	probable E3 ubiquitin- ligase LOG2
AMBELPO8A3r1t_16632	3,55	1,76E-02					2,85	3,29E-02	cysteine-rich receptor kinase 2
AMBELPO8A3r1t_19483	2,52	3,68E-02					3,87	7,00E-04	Protein kinase
AMBELPO8A3r1t_19722	4,78	2,06E-02					-3,59	4,96E-02	cysteine-rich receptor kinase 2
AMBELPO8A3r1t_23309	3,57	4,77E-02					3,93	7,62E-03	ATP binding site-containing
AMBELPO8A3r1t_24332	2,36	2,60E-02					2,27	1,26E-02	cytochrome P450/ CYP76B
AMBELPO8A3r1t_26957	4,35	5,60E-05					2,89	3,31E-03	---NA---
AMBELPO8A3r1t_28689	1,80	1,67E-02					2,55	2,20E-05	G-type lectin S-receptor-like serine threonine- kinase At4g27290
AMBELPO8A3r1t_30014	8,05	1,44E-03					5,37	1,62E-02	---NA---
AMBELPO8A3r1t_32460	2,30	3,79E-02					2,41	8,28E-03	Aspartic protease in guard cell-2-like
AMBELPO8A3r1t_37374	3,00	1,69E-02					2,44	4,49E-02	dehydration-responsive element-binding 2A-like
AMBELPO8A3r1t_37836	4,18	1,32E-04					2,98	2,29E-03	---NA---
AMBELPO8A3r1t_39971	27,18	1,05E-05					-26,74	7,34E-07	unnamed protein product
AMBELPO8A3r1t_40418	2,90	6,71E-03					2,32	1,45E-02	elongation factor 1-gamma-like
AMBELPO8A3r1t_46423	4,54	1,27E-02					4,00	1,07E-02	chlorophyll a-b binding chloroplastic-like
AMBELPO8A3r1t_48526	5,18	1,32E-02					3,18	3,51E-02	hypothetical protein Ccrd_016064

Chapitre 2

AMBELPO8A3r1t_49430	16,44	1,48E-05						9,26	5,46E-03	ribonuclease H	
AMBELPO8A3r1t_49772	5,18	2,24E-03						3,63	3,42E-02	---NA---	
AMBELPO8A3r1t_03422			-19,55	4,39E-04			40,17	4,35E-18		ATP binding site-containing	
AMBELPO8A3r1t_08243			3,83	6,33E-03			3,22	1,66E-02		Leucine-rich repeat-containing	
AMBELPO8A3r1t_50509			-2,49	7,77E-03			-3,25	5,32E-05		ribonuclease Y-like	
AMBELPO8A3r1t_00629			-19,28	4,41E-06	-39,83	2,33E-22				calcium-transporting ATPase plasma membrane-type-like	
AMBELPO8A3r1t_03036			3,32	2,12E-02	4,16	3,48E-03				pleiotropic drug resistance 1	
AMBELPO8A3r1t_06096			2,22	4,55E-02	2,37	4,62E-02				E3 ubiquitin- ligase LIN-1	
AMBELPO8A3r1t_22473			-14,24	1,09E-05	49,05	7,38E-70				Calcium-binding EF-hand	
AMBELPO8A3r1t_22833			18,29	5,73E-04	-17,96	2,11E-03				---NA---	
AMBELPO8A3r1t_26633			3,41	1,49E-02	3,70	1,07E-02				drug resistance transporter-like ABC domain	
AMBELPO8A3r1t_30251			10,16	3,49E-02	-23,62	8,27E-09				---NA---	
AMBELPO8A3r1t_47464			-12,77	1,20E-04	43,77	2,52E-56				elicitor-responsive 1-like	
AMBELPO8A3r1t_50700			3,91	1,55E-02	3,83	2,52E-02				hypothetical protein Ccrd_012416	
AMBELPO8A3r1t_02453			5,51	2,94E-02				5,13	3,69E-02	AT hook motif-containing	
AMBELPO8A3r1t_31934			22,58	6,28E-13				-17,59	1,62E-07	---NA---	
AMBELPO8A3r1t_16522			-17,53	6,07E-06					-40,84	1,77E-33	---NA---

Chapitre 2

AMBELPO8A3r1t_23778	-20,49	7,45E-09						41,75	1,42E-39	Peptidase SUMO Sentrin Ubl1
AMBELPO8A3r1t_27257	7,14	4,25E-03						10,24	5,57E-07	cytochrome P450/ CYP72A
AMBELPO8A3r1t_40197	-4,37	3,57E-02						-3,64	3,98E-02	sialyltransferase 1
AMBELPO8A3r1t_42670	6,20	6,51E-03						5,69	4,09E-03	(+)-neomenthol dehydrogenase-like
AMBELPO8A3r1t_42981	-2,61	4,72E-02						-2,57	1,79E-02	C-terminal domain-containing
AMBELPO8A3r1t_50450	3,45	2,10E-02						2,57	4,81E-02	diacylglycerol kinase theta-like
AMBELPO8A3r1t_01483			2,62	1,34E-02	2,67	4,05E-03				kinase chloroplastic
AMBELPO8A3r1t_20360			-14,88	1,03E-02	17,51	2,03E-04				---NA---
AMBELPO8A3r1t_24571			2,92	1,35E-02	2,80	7,16E-03				Calmodulin binding
AMBELPO8A3r1t_34168			4,82	4,48E-02	3,68	2,89E-02				delta12-fatty acid acetylenase
AMBELPO8A3r1t_34207			2,81	3,08E-03	2,28	9,09E-03				WRKY transcription factor 46
AMBELPO8A3r1t_40014			6,53	7,60E-03	4,56	3,67E-02				shikimate O-hydroxycinnamoyltransferase
AMBELPO8A3r1t_42077			3,78	1,89E-02	3,18	2,17E-02				RING-H2 finger ATL2-like
AMBELPO8A3r1t_42083			4,66	6,94E-03	3,89	7,60E-03				BON1-associated 2-like
AMBELPO8A3r1t_45098			4,38	5,16E-03	3,76	6,81E-03				hypothetical protein KK1_011241
AMBELPO8A3r1t_47742			3,98	3,53E-02	3,84	9,36E-03				---NA---
AMBELPO8A3r1t_26603					3,01	4,89E-05	2,26	5,38E-03		TMV resistance N-like

Chapitre 2

AMBELPO8A3r1t_49648				-5,28	1,64E-03	-4,13	2,61E-02		ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase small subunit (chloroplast)	
AMBELPO8A3r1t_51086				-3,84	1,95E-05	-4,16	1,55E-06		ribonuclease Y-like	
AMBELPO8A3r1t_48407				5,02	3,01E-02			5,50	1,44E-02	ankyrin repeat-containing At5g02620-like
AMBELPO8A3r1t_25666				8,07	9,13E-03			8,09	4,71E-03	---NA---
AMBELPO8A3r1t_46711				16,98	9,52E-08			14,97	5,86E-06	probable aldehyde dehydrogenase
AMBELPO8A3r1t_22535				4,45	4,77E-03			3,31	4,60E-02	LURP-one-related 10-like
AMBELPO8A3r1t_16740				-3,22	4,34E-03			-4,02	1,51E-02	Regulator of chromosome condensation repeat-containing isoform 1
AMBELPO8A3r1t_47182			2,88	8,24E-03				-2,81	2,97E-03	glutathione S-transferase zeta class-like
AMBELPO8A3r1t_07512			-18,36	3,63E-06				19,73	3,45E-10	TMV resistance N-like
AMBELPO8A3r1t_08199			5,64	1,20E-04				4,21	8,71E-04	Disease resistance
AMBELPO8A3r1t_10270			5,35	6,63E-05				3,84	1,09E-03	probable disease resistance At5g66900
AMBELPO8A3r1t_18669			3,79	4,40E-02				3,08	4,90E-02	extra-large guanine nucleotide-binding 1-like
AMBELPO8A3r1t_20191			9,01	2,38E-02				-7,39	3,42E-02	Calcium-binding EF-hand
AMBELPO8A3r1t_22935			-15,86	2,29E-04				-16,46	6,03E-07	---NA---

Chapitre 2

AMBELPO8A3r1t_25314			3,20	8,78E-03			2,15	4,93E-02	Calmodulin binding	
AMBELPO8A3r1t_25981			-22,31	2,27E-03			28,85	1,30E-07	retroelement pol poly	
AMBELPO8A3r1t_31879			3,55	4,90E-03			2,29	4,77E-02	probable WRKY transcription factor 70	
AMBELPO8A3r1t_33671			-26,43	2,71E-21			20,42	2,01E-17	---NA---	
AMBELPO8A3r1t_41269			20,08	7,02E-14			-15,32	6,26E-08	ethylene-responsive transcription factor 1A	
AMBELPO8A3r1t_46386			17,88	6,12E-07			16,00	1,06E-06	LURP-one-related 10-like	
AMBELPO8A3r1t_50754			4,12	3,64E-02			4,12	1,11E-02	late blight resistance homolog R1B-19	
AMBELPO8A3r1t_14257						5,00	7,88E-03	3,87	2,65E-02	unnamed protein product
AMBELPO8A3r1t_17970						4,15	4,76E-02	3,78	3,80E-02	plant T31B5-30
AMBELPO8A3r1t_20477						-9,68	7,39E-05	-7,08	6,59E-04	ATP binding site-containing
AMBELPO8A3r1t_21366						4,80	1,95E-02	2,91	3,18E-02	---NA---
AMBELPO8A3r1t_26850						2,83	4,22E-03	2,20	2,25E-02	catalase isozyme 1
AMBELPO8A3r1t_41220						-12,75	5,56E-04	14,02	1,07E-05	---NA---
AMBELPO8A3r1t_47047						2,21	1,92E-02	2,49	2,54E-03	Uncharacterized protein family UPF0114, partial

Points clés et transition

Dans le chapitre précédent, nous avons cherché à identifier des gènes impliqués dans la RNLC de l'ambrosie aux inhibiteurs de l'ALS. Cette recherche a été effectuée par une approche transcriptomique (RNASeq) appliquée à six populations d'ambrosie collectées sur le terrain, provenant de différentes origines géographiques et/ou présentant des profils de résistance différents à l'imazamox et au tribénuron. Notre travail reposait sur l'hypothèse que des gènes ou des marqueurs impliqués dans la RNLC sont différemment exprimés entre les plantes résistantes et sensibles des différentes populations.

Nos résultats ont d'abord révélé une diversité des mécanismes ayant évolué entre les différentes populations. De nombreuses familles de gènes pouvant contribuer à la RNLC ont été identifiées comme surexprimées constitutivement chez les plantes résistantes indépendamment dans chaque population : des gènes codant pour des enzymes pouvant contribuer à la détoxification de l'herbicide (cytochromes à P450, gluco et glycosyltransférases, oxydases, ABC transporteurs, hydrolases, pompes à efflux, protéases, déshydrogénases) ou pouvant contribuer aux processus de régulation qui surviennent suite à la perception par la plante de l'application de l'herbicide (facteurs de transcription, protéines kinases, domaines riches en leucine). D'autres gènes dont le rôle potentiel dans la RNLC est moins évident ont également été identifiés (enzymes impliquées dans la synthèse des terpènes, protéines de résistance aux maladies). Cent-vingt-et-un gènes candidats constitutifs ont été sélectionnés pour validation des niveaux d'expression mesurés en RNASeq. Trente de ces candidats provenant de trois des six populations ont été validés. Leur niveau d'expression relatif entre plantes résistantes et sensibles a ensuite été mesuré sur un échantillonnage massif et indépendant de plantes provenant de ces populations. Nos résultats ont alors révélé une diversité de mécanismes ayant évolué au sein de chaque population, soulignant le déterminisme génétique multiple de la RNLC.

Egalement, nos résultats suggèrent que selon la population, la RNLC pourrait être davantage constitutive ou induite. L'étude des mécanismes induits précocement par le traitement (deux heures après traitement) a montré que des gènes appartenant au métabolisme secondaire des plantes résistantes des différentes populations sont induits par le traitement.

Cette diversité observée à tous les niveaux rend complexe le développement d'un outil de diagnostic sur la base des niveaux d'expression, qui nécessiterait la réalisation d'un nombre irréalisable de PCR quantitatives. Dans le chapitre suivant, nous proposons donc d'utiliser les données de RNASeq par une approche différente, à savoir identifier des polymorphismes de séquences associés à la RNLC, soit de potentiels marqueurs qui pourraient être recherchés par génotypage par séquençage à des fins de diagnostic.

Chapitre 3 : identification de variants
de séquences corrélés à la résistance
non liée à la cible de multiples
populations
d'*Ambrosia artemisiifolia* L. aux
inhibiteurs de l'ALS par une approche
de recherche de variants à l'échelle
du transcriptome

Introduction

L'apparition des technologies de séquençage dites « à haut-débit » a permis d'accroître considérablement les débits de séquençage et ainsi de diminuer drastiquement les coûts de séquençage par rapport à des technologies plus anciennes comme le séquençage Sanger (Perez-de-Castro et al. 2012). Cette avancée technologique a permis l'acquisition de ressources génétiques comme le génome ou le transcriptome pour des espèces non-modèles à un coût abordable. Dans le domaine de la malherbologie, le développement de ces ressources offre la possibilité d'étudier à l'échelle génomique ou transcriptomique les mécanismes de résistance aux herbicides qui est une des principales préoccupations de la communauté scientifique (Ravet et al. 2018). En particulier, le développement d'outils de diagnostic moléculaire de la résistance est une application directe de cette avancée de connaissances. De tels outils pourraient permettre d'avertir de la présence de résistance avant un traitement et d'assurer un suivi de l'évolution de la résistance dès ses premiers stades (Ravet et al. 2018). Ils contribueraient ainsi à l'adaptation des programmes de désherbage afin de minimiser le risque de voir la résistance évoluer en raison de pratiques non adaptées.

Les outils de diagnostic moléculaire basés sur les technologies de séquençage « haut-débit » ont aujourd'hui montré leurs performances pour le diagnostic rapide et à grande échelle de la résistance liée à la cible (RLC) (Délye et al. 2015 ; Loubet et al. 2021 ; Kutasy et al. 2021). Des outils similaires permettant le diagnostic de la résistance non liée à la cible (RNLC) ne sont pas encore développés puisqu'ils reposent sur la détection des déterminismes génétiques à la base de la RNLC (allèles dont le rôle dans la RNLC a été démontré), ou bien de marqueurs moléculaires dont la présence est associée à la RNLC (Délye 2013), mais que ces derniers demeurent encore largement inconnus. L'identification de ces déterminismes et/ou marqueurs est donc une première étape primordiale pour le développement d'un tel outil de diagnostic. Dans l'idéal, ces marqueurs moléculaires devraient être des séquences nucléotidiques spécifiques à la RNLC, facilement détectables grâce au séquençage du fragment porteur de ce marqueur. Le principe général de leur identification repose sur la comparaison des polymorphismes distinguant les séquences d'individus résistants ou sensibles à un herbicide donné (Nadeem et al. 2018). En génomique, ils peuvent être identifiés, par exemple, par des techniques d'association à l'échelle du génome (Genome-Wide Association Studies, GWAS) (Hindorff et al. 2009 ; Berg et Coop 2014).

Cette méthode requiert d'avoir à disposition un grand nombre d'échantillons phénotypés pour la résistance et génotypés sur un nombre considérable de polymorphismes couvrant de manière exhaustive et homogène leur génome, afin de trouver des corrélations entre la fréquence des polymorphismes et la valeur génétique du trait auquel ils sont supposés être associés (Risch &

Merikangas 1996). De ce fait, elle requiert d'avoir à disposition le génome de l'espèce étudiée. L'assemblage de génomes d'espèces non-modèles restant complexe, peu de génomes d'espèces adventices sont disponibles aujourd'hui, mais beaucoup sont en cours d'assemblage ou en projet dans différents laboratoires (Ravet et al. 2018 ; Patterson et al. 2019 ; voir la liste actualisée sur <http://plabipd.de>). Lorsque le génome n'est pas disponible, les polymorphismes associés à la RNLC peuvent alternativement être recherchés à l'échelle du transcriptome, une ressource bien plus répandue en malherbologie (**Chapitre 2**, Tableau 4) puisque plus facile à obtenir. En effet, il a été montré que les polymorphismes détectés sur des données de transcriptomique le sont également par des méthodes de séquençage entier du génome (Piskol et al. 2013). Cette méthode ne permet cependant pas de détecter les polymorphismes associés à des changements dans la régulation de l'expression des gènes, situés en amont du transcrit et n'est donc pas aussi complète qu'un GWAS. La recherche de polymorphismes associés à la RNLC sur le transcriptome a par exemple été conduite par Giacomini et al. (2020) sur des plantes d'*Amaranthus tuberculatus* résistantes au 2,4-D. La recherche de variants réalisée sur les données transcriptomiques a permis d'identifier des polymorphismes de séquence associés au phénotype résistant dans des régions du génome où des gènes différemment exprimés avaient été identifiés. Ils ont également observé des différences d'expression entre les allèles associés au phénotype résistant par rapport à ceux associés au phénotype sensible (« Allele specific expression » –ASE (Knight 2004)).

Dans les chapitres précédents, nous avons montré que la RNLC est le mécanisme prédominant qui a évolué en France chez l'ambrosie pour les inhibiteurs de l'ALS. Notre étude à l'échelle transcriptomique a révélé une grande diversité de mécanismes impliqués entre et au sein de chaque population étudiée et n'a pas permis d'identifier de marqueurs permettant le développement d'un outil de diagnostic de la résistance. Dans ce chapitre, nous nous proposons d'analyser les données de RNASeq obtenues au cours de ce travail de thèse par une autre approche, afin d'identifier de potentiels polymorphismes de séquences spécifiques aux plantes résistantes qui pourraient être des marqueurs de la RNLC.

Matériel et méthodes

Évaluation de la pertinence de la méthode de recherche de variants sur les données RNASeq

Recherche de variants

La méthode de « variant calling » (ou « SNP calling ») (traduite comme « recherche de variants » dans la suite du chapitre) permet de relever tous les variants de séquence (ou polymorphismes ou SNPs, « single nucleotide polymorphisms ») qui diffèrent entre une séquence d'étude et une séquence de référence. Afin d'évaluer la pertinence de l'application de cette méthode sur nos données de séquençage du transcriptome, une première recherche de variants a été réalisée sur les séquences issues de l'expérience de RNASeq 3a (Tableau 6, **Chapitre 2**) pour la modalité « AT » de la population NAQ8. Cette population a été choisie pour cette expérience préliminaire car elle est celle pour laquelle nous avons observé la fréquence de plantes résistantes la plus élevée ([Tableau 2, Chapitre 1](#)). Cette méthode a été appliquée en collaboration avec la plateforme bio-informatique du LIPME, INRAE de Toulouse. Les séquences de ces six échantillons (trois échantillons de plantes résistantes et trois échantillons de plantes sensibles) ont été alignées sur le transcriptome de référence (**Chapitre 2**) de l'ambrosie à l'aide du programme d'alignement BWA (Li & Durbin, 2009). Les SNPs qui diffèrent entre le transcriptome de référence et les séquences ont été identifiés à l'aide du programme VarScan (v2.3.8, Koboldt et al. 2012) et de la commande « mpileup2snp » sous la contrainte des paramètres suivants :

- couverture minimale de 10 « reads »
- nombre minimal de « reads » à une position pour appeler un variant égal à 4
- qualité minimale égale à 30 sur l'échelle Phred, soit une probabilité d'erreur d'identification de 1 pour 1000
- un variant est détecté s'il est présent à une fréquence d'au moins 50% sur l'ensemble des séquences alignées
- fréquence minimale pour assigner un génotype homozygote égale à 0,75
- seuil de valeur de la p -value pour appeler un variant égal à 0,01.

Un fichier vcf (« Variant Call Format ») a ainsi été généré, rassemblant tous les polymorphismes de séquence détectés pour chaque échantillon par rapport au transcriptome de référence. Ce fichier a été traité à l'aide du logiciel R (*R Core Team*, 2021) à l'aide du package vcfR (Knaus & Grünwald 2017). Les SNPs pour lesquels des données manquantes ont été enregistrées pour au moins un échantillon ont été supprimées du jeu de données. Les fréquences de chaque SNP enregistrées pour chaque

échantillon ont été extraites à l'aide la fonction « extract.gt » du package vcfR et la fréquence moyenne de chaque SNP a été calculée pour les échantillons résistants et les échantillons sensibles.

Test d'association

Les tests d'association de type « cas/contrôle » permettent de tester l'association d'un SNP à un phénotype donné en évaluant la différence de fréquence du SNP présent chez le phénotype « cas » et le phénotype « contrôle ». Dans notre étude, nous avons comparé les fréquences de SNP présentes chez les échantillons résistants (cas) par rapport aux échantillons sensibles (contrôle). Un test d'association de Fisher a été réalisé pour chaque SNP à l'aide du logiciel R. Un modèle linéaire a également été exécuté afin de tester l'effet du variant et du phénotype sur les fréquences de SNP enregistrées.

Validation par séquençage Sanger

Dans cette première expérience, nous souhaitons valider d'une part la présence des SNPs détectés par l'analyse de recherche de variants et d'autre part, valider leur association à un phénotype. Pour cela, quatre transcrits ont été sélectionnés pour être séquencés sur un échantillonnage plus important de plantes individuelles par la méthode Sanger. Ces quatre transcrits présentaient de un à trois SNPs, chaque SNP étant présent en fréquence significativement différente entre les échantillons de plantes résistantes et sensibles. Plus précisément, ils portaient au moins un SNP spécifique à au moins deux des trois échantillons résistants et étaient présents en très faible fréquence (de 0 à 5%) dans les échantillons sensibles. Ils portent donc des SNPs spécifiques aux échantillons de plantes résistantes. Le séquençage Sanger a été réalisé sur des plantes individuelles provenant de la population NAQ8 (échantillonnage 4, Tableau 5, **Chapitre 2**) pour laquelle la recherche de variants a été effectuée, après extraction de l'ADN d'un disque foliaire de 3 mm selon la procédure décrite dans Délye, Matějček, et Gasquez (2002) et amplification par PCR. Les effectifs séquencés par phénotype varient de n=15 à n=38 plantes, selon les fragments amplifiés. Afin de visualiser la localisation de potentiels introns, les amorces ont été dessinées sur les séquences des transcrits sélectionnés et, alignées sur le gène correspondant provenant du génome du tournesol (Badouin et al., 2017), le tournesol étant l'espèce possédant un génome disponible qui est phylogénétiquement la plus proche de l'ambrosie.

Extension de la méthode de recherche de variants à l'ensemble des données RNASeq

Recherche de variants

Dans un premier temps nous avons évalué la pertinence de l'approche de recherche de variants sur un sous échantillonnage des données disponibles (NAQ8, RNASeq3). Les effectifs utilisés dans cette première partie étant très faibles pour détecter des SNPs associés à la RNLC, une nouvelle

recherche de variants a été réalisée sur l'ensemble des données de RNASeq (Tableau 6, **Chapitre 2**) pour les six populations étudiées dans le **Chapitre 2** : ARA2, ARA8, CVL5, NAQ8, NAQ9 et OCC13. Les données de séquençage obtenues avant et après traitement (modalités « AT » et « 2HAT », Tableau 6, **Chapitre 2**) n'ont pas été différenciées dans cette partie et ont été considérées comme des répliquats biologiques pour chacune des populations. Si l'application du traitement peut modifier le profil d'expression des plantes par rapport à celui observé avant traitement ([Chapitre 2](#)), nous avons considéré que les séquences nucléotidiques ne sont pas affectées. Au total, la recherche de variants a donc été réalisée pour les séquences de 44 échantillons de plantes résistantes et 45 échantillons de plantes sensibles. Les recherches ont été réalisées indépendamment pour chaque population.

Filtration des données

À l'issue de la recherche de variants, un fichier vcf par population a été généré, chacun rassemblant tous les SNPs détectés pour chaque échantillon de chaque population par rapport au transcriptome de référence. Ces fichiers ont été évalués à l'aide du programme VCFtools (v0.1.16, Danecek et al. 2011). La fréquence de chaque SNP détecté, la profondeur de séquençage pour chaque individu et chaque site et les données manquantes par site et par individu ont été extraites des fichiers vcf pour chacune des populations à l'aide des fonctions « freq2 », « depth », « site-mean-depth », « missing-indv » et « missing-site ». Les données ont ensuite été visualisées à l'aide du package ggplot2 (Wickham 2016) disponible sur le logiciel R. Les SNPs présentant plus de 80% de données manquantes ont été supprimés pour chacun des jeux de données à l'aide de la fonction « max-missing ». De plus, afin d'éliminer de potentiels faux positifs liés à une couverture non homogène des « reads » sur un contig lors de l'alignement, celle-ci a été vérifiée manuellement pour les contigs sur lesquels les SNPs les plus pertinents ont été identifiés.

Analyses

Afin de s'affranchir de l'effet « population » pouvant conduire à la détection de SNPs liés à l'architecture génétique des différentes populations et non à la RNLC, les tests d'association ont été réalisés pour chacune des populations indépendamment. Pour chaque SNP détecté, un test d'association de Fisher a été effectué entre les échantillons résistants et sensibles de chacune des six populations à l'aide de la fonction « assoc » du programme Plink (v1.9, Purcell et al. 2007) paramétrée avec l'option « fisher ». Le grand nombre de tests réalisés a pour conséquence un fort risque de détection de faux positif, c'est pourquoi une correction pour les tests multiples a été effectuée à l'aide de la méthode de Benjamini & Hochberg (Benjamini & Hochberg, 1995), grâce à la fonction « adjust ». La distribution des p -values du test de Fisher observées pour chacune des populations a été évaluée par rapport à la distribution attendue à l'aide d'un quantile-quantile (QQ) plot réalisé à l'aide du logiciel R et selon les recommandations décrites par Rentería, Cortes, et Medland (2013).

Résultats

Évaluation de la pertinence de la méthode sur les données de RNASeq

Dans cette première analyse, nous avons souhaité vérifier la pertinence de l'application de la méthode de recherche de variants sur nos données de RNASeq. Une première recherche de variants a été réalisée sur un sous-échantillonnage des données de RNASeq disponibles (population NAQ8, RNASeq 3a, Tableau 6, **Chapitre 2**).

Cette première recherche de variants a permis d'identifier 318 473 SNPs qui diffèrent entre les séquences de la population NAQ8 et le transcriptome de référence. Les tests d'association de Fisher et le modèle linéaire ont identifiés 136 634 SNPs dont les fréquences entre les échantillons résistants et sensibles sont significativement différentes (p -value < 0,001). Parmi ces SNPs potentiellement associés à la RNLC, ceux regroupés sur quatre transcrits ont été sélectionnés pour validation par séquençage Sanger (Tableau 12). Ces quatre transcrits portent de un à trois SNPs spécifiques aux échantillons résistants (Tableau 12).

La lecture des séquences à l'issue du séquençage Sanger indique que les SNPs détectés par la recherche de variants sur les séquences issues du RNASeq sont détectés à la position attendue après séquençage (Tableau 12). En revanche, ces SNPs identifiés comme associés aux échantillons résistants dans le sous-échantillonnage test perdent cette association sur un échantillonnage élargi (Tableau 12). Les fréquences observées entre les échantillons résistants et sensibles des plantes séquencées pour les transcrits AMBELPO8A3r1t_01217, AMBELPO8A3r1t_33289 et AMBELPO8A3r1t_47475 ne sont pas significativement différentes (Tableau 12). Pour le transcrit AMBELPO8A3r1t_47180, les différences de fréquence entre les échantillons résistants et sensibles des trois SNPs sélectionnés sont significatives (Tableau 12), l'allèle ALT étant plus représenté chez les individus résistants. Leur présence chez les échantillons sensibles indique cependant qu'ils ne sont pas spécifiques aux échantillons résistants.

La recherche de variants réalisée permet donc de détecter des SNPs existants mais le nombre de réplicats biologiques utilisés dans cette expérience préliminaire est trop faible pour identifier des allèles fortement associés au phénotype résistant.

Tableau 12 : Comparaison des fréquences de SNP mesurées sur les données de RNASeq et en séquençage Sanger de plantes individuelles

				Variant calling (RNASeq)					Séquençage Sanger				
Accession	Position variant	Allèle REF	Allèle ALT	Fréquence allèle ALT échantillons R	Fréquence allèle ALT échantillons S	<i>p</i> -value test Fisher	Odd ratio	<i>p</i> -value (~allèle + phénotype)	Effectifs plantes R séquencées	Effectifs plantes S séquencées	Fréquence allèle ALT échantillons R	Fréquence allèle ALT échantillons S	<i>P</i> -value test Fisher (odd ratio [IC95])
AMBELPO8A3r1t_01217	4213	C	T	0,61	0,01	8,01E-23	0,084	1,74E-17	23	24	0,07	0,08	1 (0 [0 ; inf])
AMBELPO8A3r1t_01217	4462	G	C	0,62	0,08	1,67E-35	0,009	6,05E-11	23	24	0,04	0	0,43 (0[0 ;30])
AMBELPO8A3r1t_33289	850	T	C	0,99	0,05	0	0	1,70E-155	23	17	0,65	0,35	1 (1,24 [0,02; 27,27])
AMBELPO8A3r1t_47180	162	C	T	1,00	0,02	< 2,2E-16	0	2,77E-53	38	20	0,84	0,4	0,01 (14,73 [1,25; 807])
AMBELPO8A3r1t_47180	165	C	A	1,00	0,02	< 2,2E-16	0	1,25E-50	38	20	0,84	0,4	0,01 (14,73 [1,25; 807])

Chapitre 3

AMBELPO8A3r1t_47180	175	A	G	1,00	0,02	< 2,2E-16	0	3,72E-52	38	20	0,89	0,45	0,04 (10,6 [0,75 ; 609])
AMBELPO8A3r1t_47475	415	C	G	0,70	0,00	7,57E-100	0	2,94E-70	17	15	0,12	0,07	1 (0,79 [0,01;17,24])
AMBELPO8A3r1t_47475	433	C	G	0,70	0,00	1,23E-45	0	3,00E-39	17	15	0,12	0,07	1 (0,88 [0,01;19,52])
AMBELPO8A3r1t_47475	439	C	T	0,70	0,00	2,50E-52	0	1,06E-38	17	15	0,12	0,07	1 (1 [0,01 22,49])

Recherche de variants de séquences associés à la RNLC au sein de six populations d'ambrosie

Des SNPs associés au phénotype résistant ou sensible ont été recherchés au sein des six populations d'ambrosie étudiées dans le **Chapitre 2** en prenant en compte tous les échantillons dont l'ARN a été séquencé (Tableau 6, **Chapitre 2**).

La recherche de variants a permis d'identifier entre 1 751 467 et 3 404 286 polymorphismes entre les séquences des six populations et le transcriptome de référence (Tableau 13). La visualisation des données manquantes pour les individus de chaque population et de leur profondeur de séquençage montre que les échantillons issus des expériences de séquençage 1 et 2 (Tableau 6, **Chapitre 2**) sont ceux pour lesquels il y a le plus de valeurs manquantes (Figure supplémentaire 1), en raison d'une profondeur de séquençage plus faible (Figure supplémentaire 2). Afin de ne pas perdre ces réplicats biologiques pour les populations ARA2, ARA8, NAQ8 et OCC13, les données manquantes ont été supprimés du jeu de données à hauteur de 80% (lorsqu'un SNP est manquant dans plus de 80% des échantillons, il est supprimé) et les échantillons de ces expériences de séquençage ont été conservés. Après filtration, le nombre de SNPs identifiés varie de 990 915 à 1 291 172 (Tableau 13).

Tableau 13 : effectifs de plantes dans chaque pool et nombre de SNPs identifiés avant et après filtration des données pour les populations ARA2, ARA8, CVL5, NAQ8, NAQ9 et OCC13

Population	Nombre de plante R dans chaque pool R	Nombre de plantes dans chaque pool S	Nombre pool R	Nombre pool S	Nombre de SNPs identifiés	Nombre de SNPs après filtration des données
ARA2	De 2 à 3	De 2 à 3	7	8	1967394	1090611
ARA8	De 2 à 3	De 2 à 3	9	9	2069396	1079520
CVL5	3	3	6	5	1792382	1248736
NAQ8	De 2 à 3	De 2 à 3	9	9	3404286	1291172
NAQ9	3	3	6	6	1751467	1219586
OCC13	De 2 à 3	De 2 à 3	7	8	1791278	990915

Test d'association cas/contrôle

Les tests d'association n'ont pas permis d'identifier de SNP associés significativement à un phénotype dans les populations ARA2, ARA8, NAQ9, CVL5 et OCC13 après correction des p -values ([Tableau supplémentaire 5](#)). Pourtant, bien que les p -values ajustées par la méthode de Benjamini & Hochberg soient supérieures à 5%, les différences entre les fréquences des SNPs présents chez les échantillons résistants et sensibles sont très importantes pour une partie des SNPs identifiés, avec des cas de SNPs

présents uniquement pour un phénotype donné (Tableau supplémentaire 5). D'après la distribution des p -values du test de Fisher observées par rapport à celle des p -values attendues (Figure 21), les SNPs identifiés comme significatifs au test de Fisher (sans correction BH) pour ces cinq populations suivent la distribution attendue. Ce résultat indique que les différences de fréquences observées sont liées au hasard et non à un effet du phénotype.

En revanche, pour la population NAQ8, 40 SNPs répartis sur 18 transcrits sont significativement associés à un phénotype (Tableau 14). La distribution des p -values observées ne suit pas la distribution des p -value attendues, indiquant que ces SNPs sont statistiquement associés à un phénotype (Figure 21). Ces SNPs sont portés par des transcrits associés à des processus de régulation de l'expression des gènes en réponse au stress biotique ou abiotique, à la synthèse ou à la modification de protéines (activité oxydoréductase, glycosyltransférase, peroxydase) et à des activités de transport protéique (Tableau 14). De plus, ces 18 transcrits ne sont pas différemment exprimés entre les échantillons résistants et sensibles de la population NAQ8 (Chapitre 2). La détection de ces SNPs n'est donc pas liée à une faible couverture des « reads » pour les échantillons résistants ou sensibles qui pourrait générer la détection de faux positifs.

Tableau 14 : SNPs significativement associés aux échantillons résistants ou sensibles de la population NAQ8

Accession	Position SNP	Allèle REF	Allèle ALT	Fréquence de l'allèle ALT échantillons R	Fréquence de l'allèle ALT échantillons S	p -value (Fisher)	p -value ajustée (BH)	Description
AMBELPO8A3r1t_02967	4073	A	G	0,94	0,00	4,19E-09	7,40E-04	Regulator of nonsense transcripts
AMBELPO8A3r1t_02967	3858	A	G	0,89	0,00	4,19E-08	4,31E-03	1 homolog - Required for plant development and adaptation to environmental stresses, including plant defense and response to wounding
AMBELPO8A3r1t_02967	4310	T	G	0,89	0,00	5,09E-07	2,74E-02	
AMBELPO8A3r1t_02967	4320	G	A	0,89	0,00	5,09E-07	2,74E-02	
AMBELPO8A3r1t_02967	4260	C	G	0,06	1,00	3,18E-08	4,31E-03	
AMBELPO8A3r1t_02967	476	T	C	0,00	0,78	1,61E-06	4,75E-02	
AMBELPO8A3r1t_10157	1893	T	C	0,83	0,00	2,93E-07	1,91E-02	Ion protease homolog
AMBELPO8A3r1t_10157	2079	A	T	0,83	0,00	4,48E-07	2,74E-02	peroxisomal – hydrolysis of protein – response to organic cyclic compound
AMBELPO8A3r1t_10157	2130	T	C	0,00	0,81	6,04E-07	2,75E-02	

Chapitre 3

AMBELPO8A3r1t_11931	828	T	A	0,78	0,00	1,61E-06	4,75E-02	DNA- integrase- Regulation of gene expression
AMBELPO8A3r1t_13198	274	T	C	0,83	0,00	2,93E-07	1,91E-02	Elongation factor G- chloroplasic – protein biosynthesis
AMBELPO8A3r1t_13198	606	A	G	0,00	0,78	1,61E-06	4,75E-02	
AMBELPO8A3r1t_13198	1128	T	G	0,00	0,78	1,61E-06	4,75E-02	
AMBELPO8A3r1t_23690	923	T	C	0,06	0,89	6,45E-07	2,75E-02	Probable beta-1,3- galactosyltransferas e 11 – protein glycosylation
AMBELPO8A3r1t_29679	264	C	A	0,00	0,88	8,62E-08	7,61E-03	Probable FMN- linked oxidoreductases superfamily protein
AMBELPO8A3r1t_29679	288	T	G	0,00	0,88	5,09E-07	2,74E-02	
AMBELPO8A3r1t_30979	1439	A	G	0,78	0,00	1,61E-06	4,75E-02	Probable glucose- methanol-choline (GMC) oxidoreductase family protein
AMBELPO8A3r1t_33024	187	T	C	0,06	0,88	1,61E-06	4,75E-02	IQ-DOMAIN 14 – calmodulin binding- cell wall biogenesis
AMBELPO8A3r1t_34214	620	A	C	1,00	0,00	2,20E-10	6,81E-05	Poly(U)-specific endoribonuclease-B
AMBELPO8A3r1t_34214	768	C	T	0,94	0,06	7,16E-08	6,81E-03	
AMBELPO8A3r1t_34214	438	G	A	0,78	0,00	1,61E-06	4,75E-02	
AMBELPO8A3r1t_34214	525	C	T	0,00	0,94	4,19E-09	7,40E-04	
AMBELPO8A3r1t_34214	675	A	G	0,00	0,94	4,19E-09	7,40E-04	
AMBELPO8A3r1t_34214	75	C	A	0,00	0,89	4,19E-08	4,31E-03	
AMBELPO8A3r1t_34214	165	G	A	0,00	0,83	2,93E-07	1,91E-02	
AMBELPO8A3r1t_34214	628	C	T	0,00	0,83	2,93E-07	1,91E-02	
AMBELPO8A3r1t_39324	1016	T	G	0,83	0,00	2,93E-07	1,91E-02	Bifunctional dTDP-4- dehydrorhamnose 3,5-epimerase dTDP-4- dehydrorhamnose reductase – carbohydrate biosynthesis
AMBELPO8A3r1t_39324	488	C	G	0,78	0,00	1,61E-06	4,75E-02	
AMBELPO8A3r1t_39324	1040	C	T	0,06	0,89	6,45E-07	2,75E-02	
AMBELPO8A3r1t_39502	342	A	G	0,06	1,00	3,18E-08	4,31E-03	Anamorsin homolog isoform X2 – iron sulfur cluster assembly
AMBELPO8A3r1t_39502	375	A	G	0,00	1,00	2,20E-10	6,81E-05	
AMBELPO8A3r1t_40190	573	G	A	0,89	0,06	6,45E-07	2,75E-02	Phloem protein 2

Chapitre 3

AMBELPO8A3r1t_40190	1034	A	T	0,00	0,89	4,19E-08	4,31E-03	
AMBELPO8A3r1t_40347	203	A	T	0,00	0,78	1,61E-06	4,75E-02	Ribosomal RNA processing 36 homolog
AMBELPO8A3r1t_43547	547	A	G	0,78	0,00	1,61E-06	4,75E-02	40S ribosomal S3a
AMBELPO8A3r1t_46018	285	T	G	0,06	0,89	6,45E-07	2,75E-02	Probable phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase
AMBELPO8A3r1t_49265	267	T	C	0,00	1,00	2,20E-10	6,81E-05	Senescence-associated family
AMBELPO8A3r1t_49282	635	A	C	0,89	0,06	6,45E-07	2,75E-02	Vesicle transport GOT1B-like
AMBELPO8A3r1t_49282	57	A	C	0,00	1,00	2,20E-10	6,81E-05	
AMBELPO8A3r1t_50081	96	A	G	0,06	0,88	1,61E-06	4,75E-02	Zinc finger A20 and AN1 domain-containing stress-associated 1

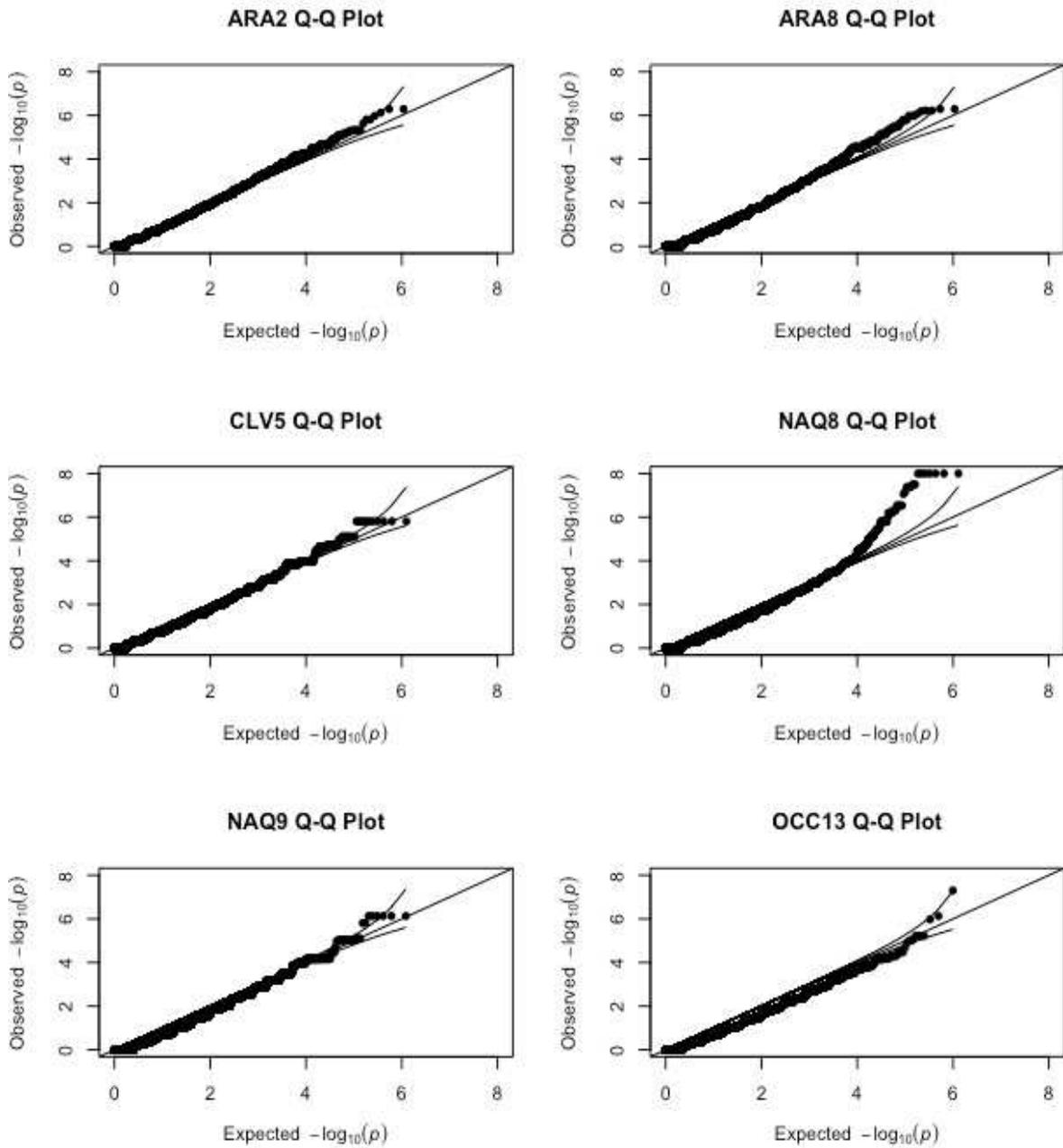


Figure 21 : distribution des $-\log_{10}$ p-values observées pour les tests d'association de Fisher pour les populations ARA2, ARA8, CVL5, NAQ8, NAQ9 et OCC13 par rapport à la distribution des $-\log_{10}$ p-values attendues ; les deux lignes de part et d'autre de la distribution attendue représentent l'intervalle de confiance à 95%. Plusieurs SNPs dans la population NAQ8 ont une valeur de \log_{10} p-value qui s'écarte significativement de la distribution attendue des \log_{10} p-value attendues.

Discussion

L'identification de marqueurs de la RNLC est un prérequis indispensable au développement d'un outil de diagnostic moléculaire de celle-ci. Dans ce chapitre, nous avons cherché à identifier des polymorphismes de séquence associés aux plantes résistantes (potentiels marqueurs moléculaires) en effectuant une recherche de variants sur les données de séquençage de l'ARN. Dans l'approche préliminaire, nous avons validé la méthode de recherche de variants en confirmant la présence des SNPs identifiés sur les données de RNASeq grâce au séquençage Sanger de gènes portant quelques-uns des SNPs identifiés. L'étude d'association nous a ensuite permis d'identifier 40 SNPs statistiquement associés au phénotype sensible ou résistant des plantes passées en RNASeq d'une des six populations de l'étude (NAQ8).

Ces marqueurs candidats sont portés par des transcrits qui codent pour des protéines de régulation de l'expression des gènes en cas de stress biotique ou abiotique, pour la synthèse ou la modification de protéines (activité oxydoréductase, peroxydase) ou pour des activités de transport protéique. L'application d'un herbicide est perçue par la plante comme un stress abiotique qui conduit à l'activation de voies de régulation (Délye 2013). Dans le cas des plantes résistantes aux herbicides, ces voies de régulation peuvent conduire à la modification de l'expression de gènes dont le rôle est d'éliminer l'herbicide en le métabolisant ou bien de neutraliser ses effets cytotoxiques (Délye 2013). L'identification de marqueurs sur des gènes codants pour des protéines de régulation de la réponse au stress spécifiquement chez les plantes résistantes pouvait donc être attendue. De plus, la métabolisation des herbicides par des plantes résistantes est un des mécanismes possible de la RNLC (Gaines et al. 2020). La dégradation d'un herbicide dans une plante se déroule théoriquement en quatre phases (Zhang et al. 2021) qui impliquent (1) sa modification augmentant sa solubilité grâce à des enzymes telles que des cytochromes à P450, des oxydases, des estérases, des hydrolases, (2) sa conjugaison avec des composés gluco ou glycosylés, (3) son transport jusqu'à des organites cellulaires où (4) des acteurs tels que des carboxypeptidases catalysent sa dégradation définitive. La présence de marqueurs de la RNLC sur des gènes codant pour des enzymes impliquées dans des réactions de modification protéique ou encore des activités de transport pouvait donc être également attendue.

Les marqueurs candidats identifiés sont associés à la résistance dans l'une des six populations de l'étude (NAQ8). La détection de SNPs spécifiques de la résistance dans cette population, et non dans les autres, peut être liée à des différences dans le stade d'évolution de la résistance dans cette population par rapport aux autres. En effet, dans le **Chapitre 1**, nous avons montré que la population NAQ8 présente une fréquence de résistance bien supérieure à celle mesurée dans les cinq autres

populations de l'étude (43% vs. 10 à 15%, voir [Tableau 2 Chapitre 1](#)). Sur la base de ces observations, il peut donc être supposé que l'évolution de la résistance dans cette population soit plus avancée que dans les cinq autres. Théoriquement, lors de la sélection de mécanismes de RNLC au sein d'une population, il est supposé que plusieurs allèles à effets mineurs sont sélectionnés et s'accumulent au cours des générations, aboutissant à terme à de la résistance à pleine dose visible sur le terrain (Délye 2013). Cette théorie s'est d'ailleurs vérifiée pour la résistance de l'ambrosie aux inhibiteurs de l'ALS grâce à une expérience de sélection récurrente conduite par Meyer et al. 2022. Si la résistance dans la population NAQ8 est plus évoluée que dans les autres populations de l'étude, les allèles contribuant à la RNLC dans cette population devraient s'y trouver en plus forte fréquence et donc être plus facilement détectables par notre méthode d'analyse.

Le biais expérimental lié à notre échantillonnage peut également expliquer l'absence de résultats significatifs pour cinq des six populations. Les effectifs utilisés pour réaliser la recherche de variants étaient de six à neuf échantillons par phénotype (Tableau 12). Dans la population NAQ8, les séquences de neuf échantillons résistants et de neuf échantillons sensibles ont été comparées. Ces effectifs sont légèrement supérieurs à ceux des populations ARA2, CVL5, NAQ9 et OCC13 et identiques à ceux de la population ARA8. Le nombre de SNPs utilisés pour effectuer les tests d'association de Fisher est également légèrement supérieur dans cette population par rapport aux autres (Tableau 12). La détection de SNPs significatifs uniquement dans la population NAQ8 pourrait donc être due à cette légère différence d'échantillonnage. De plus, les études d'association génèrent beaucoup de faux positifs ou de faux négatifs (Kreiner et al. 2018). Particulièrement, le risque de détecter des faux négatifs (c'est-à-dire de ne pas détecter de SNPs associés au phénotype, comme c'est le cas pour cinq populations de l'étude) augmente si la puissance du test est insuffisante en raison d'effectifs trop faibles (Josephs et al. 2017). Dans notre cas, les effectifs utilisés dans ce chapitre pour réaliser les tests d'association sont très faibles en comparaison des effectifs utilisés pour la découverte de marqueurs associés à la résistance chez d'autres espèces adventices (Dixon et al. (2021), *Alopecurus myosuroides*, 369 plantes séquencées ; Van Etten et al. (2020), *Ipomoea purpurea*, 80 plantes séquencées ; Kreiner et al. (2021), *Amaranthus tuberculatus*, 168 plantes séquencées ; Murphy, Beffa, et Tranel (2021), *Amaranthus tuberculatus*, 285 plantes séquencées). Il est donc probable que nous ne soyons pas exhaustifs de l'ensemble des SNPs associés au phénotype dans chacune des six populations et que ces effectifs faibles puissent expliquer que nous n'ayons pas détecté de SNPs dans cinq des populations.

Le risque de détecter des faux positifs (SNPs non réellement associés à un phénotype) est également élevé lorsque les effectifs utilisés sont faibles comme nous l'avons montré lors de notre expérience préliminaire. Leur validation sur des effectifs plus importants de plantes est donc

indispensable avant de pouvoir affirmer que les marqueurs candidats identifiés sont bien associés à la RNLC. Une première étape de validation pourra être réalisée en séquençage Sanger sur des plantes individuelles. S'il s'avère à l'issue de cette étape que les SNPs sont bien associés à un phénotype, leur génotypage par séquençage haut-débit selon le modèle présenté dans le **Chapitre 1** (Loubet et al. 2021) pourra être envisagé afin d'augmenter le débit de criblage dans cette population, voire dans d'autres populations. Les SNPs détectés dans les autres populations et présentant des fréquences très différentes entre les échantillons résistants et sensibles pourraient également être séquencés sur un nombre plus important de plantes afin de vérifier qu'ils ne soient pas des faux négatifs. L'assemblage du génome de l'ambrosie permettrait également de cartographier les SNPs identifiés dans la population NAQ8, ce qui pourrait potentiellement révéler la localisation de régions génomiques sélectionnées par la pression de sélection exercée par les applications d'herbicides.

Informations supplémentaires

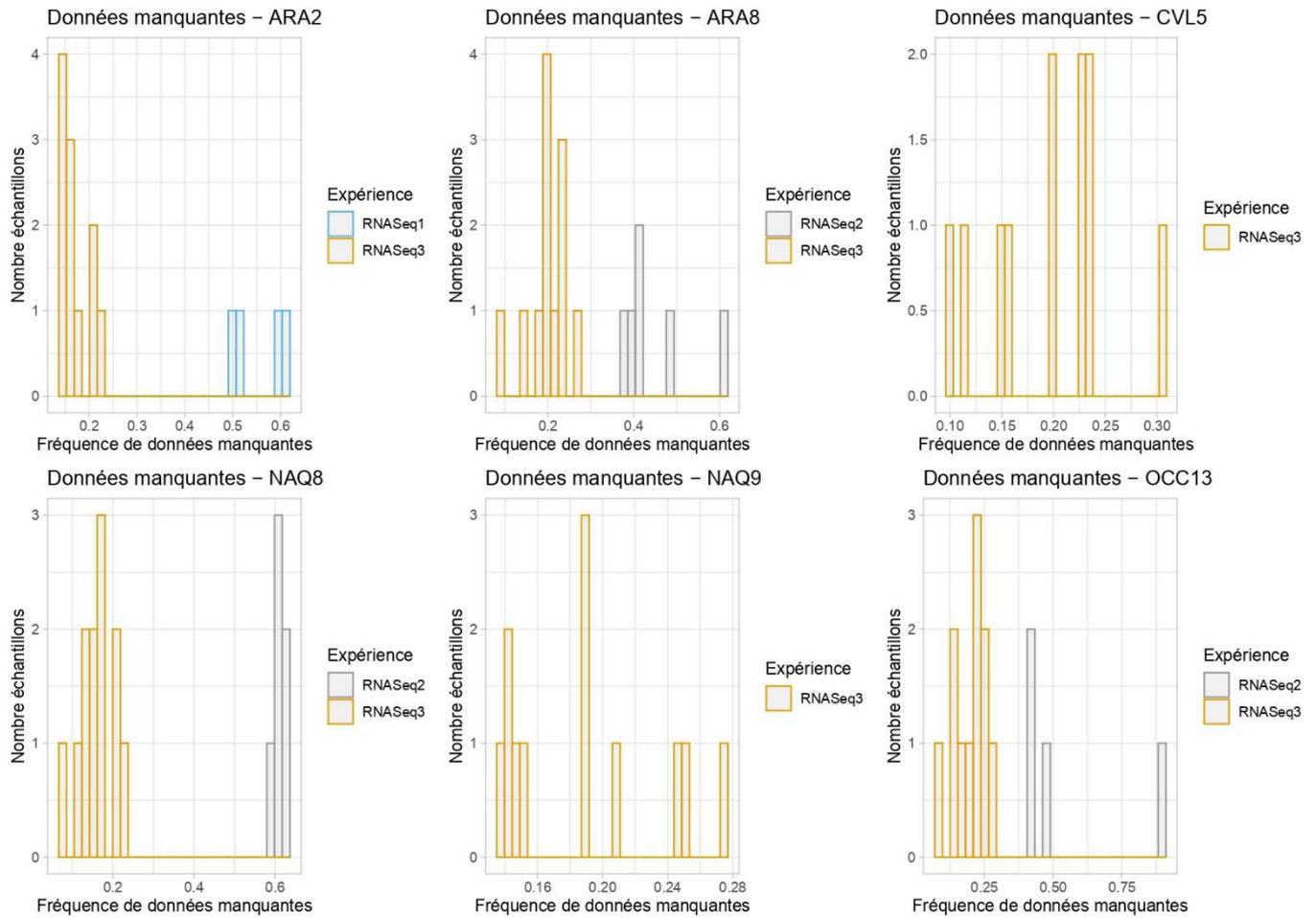


Figure supplémentaire 1 : Fréquence de données manquantes de SNPs obtenues par échantillon de chacune des six populations avant filtration des données

Chapitre 3

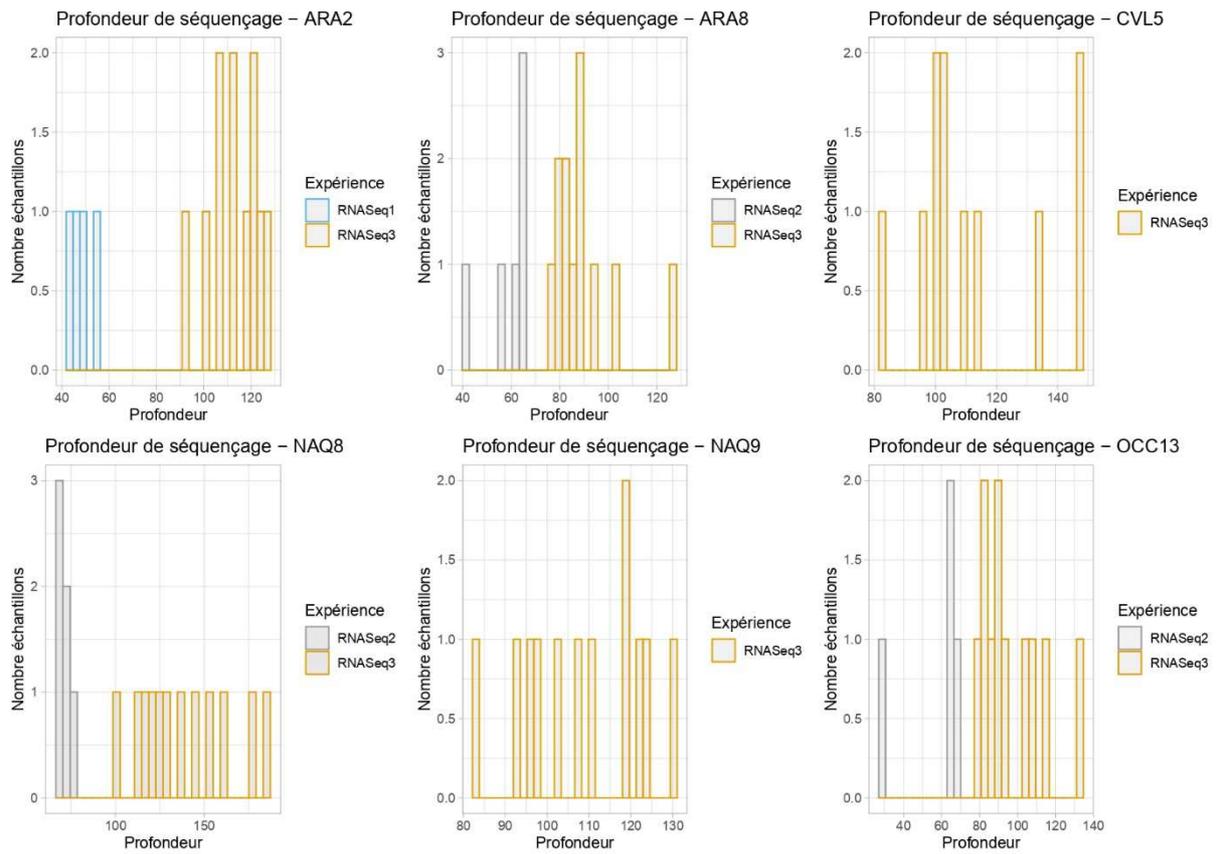


Figure supplémentaire 2 : Profondeur de séquençage mesurée pour les différents échantillons des six populations étudiées

Tableau supplémentaire 5 : top 5 des SNPs significatifs au test de Fisher et non significatifs après ajustement de la *p*-value identifiés dans les populations ARA2, ARA8, CVL5, NAQ9 et OCC13

ARA2								
Accession	Position du SNP	Allèle REF	Allèle ALT	Fréquence de l'allèle ALT échantillons R	Fréquence de l'allèle ALT échantillons S	<i>p</i> -value (Fisher)	<i>p</i> -value ajustée (BH)	Description
AMBELPO8A3r1t_01118	4489	G	A	1,00	0,00	5,10E-07	0,26	Disease resistance
AMBELPO8A3r1t_36725	47	A	N	1,00	0,00	5,10E-07	0,26	manganese-dependent ADP-ribose CDP-alcohol diphosphatase
AMBELPO8A3r1t_07104	1690	A	G	0,00	0,93	7,48E-07	0,26	autophagy-related 18f
AMBELPO8A3r1t_28469	246	C	A	0,86	0,00	1,05E-06	0,26	Tubulin alpha chain
AMBELPO8A3r1t_01118	5335	A	G	1,00	0,00	1,55E-06	0,26	Disease resistance
ARA8								
AMBELPO8A3r1t_47415	115	T	N	0,00	0,88	5,09E-07	0,12	ubiquitin-conjugating enzyme E2-23 kDa
AMBELPO8A3r1t_47415	116	C	N	0,00	0,88	5,09E-07	0,12	ubiquitin-conjugating enzyme E2-23 kDa
AMBELPO8A3r1t_20878	687	T	C	0,00	0,81	6,04E-07	0,12	EH domain-containing 1
AMBELPO8A3r1t_30124	1293	T	C	0,81	0,00	6,04E-07	0,12	phosphoglycerate cytosolic
AMBELPO8A3r1t_05578	1623	C	T	0,89	0,06	6,45E-07	0,12	Cytochrome P450
CVL5								
AMBELPO8A3r1t_04443	1931	T	C	0	1	1,55E-06	0,16	RRP12 isoform X1
AMBELPO8A3r1t_04443	1962	G	A	0	1	1,55E-06	0,16	RRP12 isoform X1
AMBELPO8A3r1t_06129	3254	G	A	0	1	1,55E-06	0,16	serine arginine repetitive matrix 2-like isoform X2
AMBELPO8A3r1t_20590	1498	N	T	0	1	1,55E-06	0,16	---NA---
AMBELPO8A3r1t_23676	1864	G	A	0	1	1,55E-06	0,16	digalactosyldiacylglycerol synthase chloroplastic-like
NAQ9								
AMBELPO8A3r1t_07808	153	A	C	1,00	0,00	7,40E-07	0,14	phosphatidylglycerol phosphatidylinositol transfer DDB_G0282179
AMBELPO8A3r1t_34078	175	N	A	0,00	1,00	7,40E-07	0,14	Cytomatrix -

Chapitre 3

AMBELPO8A3r1t _34747	247	N	T	1,00	0,00	7,40E-07	0,14	Ribosomal L18p L5e family
AMBELPO8A3r1t _48746	154	A	C	1,00	0,00	7,40E-07	0,14	phosphatidylglycerol phosphatidylinositol transfer DDB_G0282179
AMBELPO8A3r1t _50745	205	C	T	1,00	0,00	7,40E-07	0,14	lipid transfer
OCC13								
AMBELPO8A3r1t _09903	2593	N	T	0,00	1,00	7,40E-07	0,32	V-type proton ATPase subunit a3
AMBELPO8A3r1t _43127	769	T	G	0,86	0,00	1,05E-06	0,32	carboxymethylenebut enolidase homolog
AMBELPO8A3r1t _09414	2858	T	C	0,00	0,86	5,98E-06	0,92	heat shock 70 kDa 15-like
AMBELPO8A3r1t _17706	551	A	T	0,00	0,86	5,98E-06	0,92	hypothetical protein Ccrd_017439
AMBELPO8A3r1t _28687	1261	G	A	0,86	0,00	5,98E-06	0,92	laccase 5

Discussion générale

L'objectif de ce travail était d'identifier des déterminismes génétiques de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS ayant évolué chez l'ambrosie à feuilles d'armoise en France. L'ambition de ce travail était double : fondamentale et appliquée. D'un point de vue fondamental, les connaissances sur les trajectoires évolutives d'espèces végétales sous pression anthropique et leurs mécanismes sous-jacents sont encore peu développées, en particulier chez les adventices. Acquérir de nouvelles connaissances sur ces systèmes très particuliers devrait contribuer à une meilleure compréhension des processus écologiques et d'évolution dans un contexte agronomique. D'un point de vue appliqué, avoir à disposition un outil de diagnostic moléculaire rapide et fiable de la RNLC est absolument clef pour l'adaptation des stratégies de lutte contre l'évolution des résistances aux herbicides. Identifier les déterminismes génétiques de la résistance est une étape indispensable dans la mise au point de ces outils.

Dans cette partie, nous discuterons de nos résultats en les repositionnant vis-à-vis de ces deux types d'objectifs. Premièrement, nous discuterons de nos résultats à la lumière de deux questions fondamentales soulevées par la biologie évolutive (Baucom 2019) : les adaptations sont-elles le résultat de nombreuses mutations à faible effet ou sont-elles principalement dues à quelques mutations à fort effet phénotypique ? Les mêmes phénotypes adaptatifs dans des populations distinctes ont-ils les mêmes bases génétiques ? Deuxièmement, nous discuterons de la faisabilité de développer un outil de diagnostic moléculaire de la RNLC. Nous discuterons ensuite des limites des approches de transcriptomique pour identifier les déterminismes génétiques de la RNLC. Nous terminerons cette discussion en présentant les perspectives de notre travail.

Apport de nos travaux sur la compréhension de l'évolution de la résistance aux herbicides comme phénomène adaptatif face à une très forte pression de sélection

D'un point de vue évolutif, la résistance aux herbicides est une réponse adaptative des adventices à une forte pression de sélection (Baucom 2019 ; Kreiner et al. 2018 ; Neve et al. 2009), les herbicides appliqués selon les recommandations d'usage permettant d'éliminer de 95 à 99% des individus sensibles de la population (Foster et al. 1993). L'ambrosie est une espèce envahissante dont le potentiel d'adaptation à des environnements variés dans son aire d'invasion a été étudié à plusieurs reprises (Hodgins et al. 2013 ; Martin et al. 2014 ; 2016 ; Gallien et al. 2016). Il a notamment été observé que les populations d'ambrosie envahissantes, même lorsqu'elles sont soumises à des conditions environnementales stressantes (Hodgins et al. 2013), ont un meilleur potentiel de reproduction et de

croissance que celles dans leur aire d'origine. La grande diversité génétique de cette espèce semble être déterminante dans le succès de son adaptation (Genton, Shykoff, et Giraud 2005 ; Martin et al. 2016).

Dans notre travail, les populations d'ambrosie étudiées ont été soumises à une forte pression de sélection par l'application d'herbicides du groupe des inhibiteurs de l'ALS (imazamox ou tribénuron). L'évolution de résistances vis-à-vis de ce mode d'action que nous avons évaluée lors de nos travaux présentés dans le **Chapitre 1** indique que l'ambrosie s'est adaptée à de multiples reprises et d'une diversité de façons à cette pression de sélection.

Les adaptations sont-elles le résultat de nombreuses mutations à faible effet, ou sont-elles principalement dues à des mutations à fort effet phénotypique ?

La résistance liée à la cible (RLC) résulte, la plupart du temps, d'une modification de la séquence du gène de la cible de l'herbicide qui conduit à diminuer l'efficacité de l'herbicide. Les mutations dans le gène de l'ALS qui conduisent à la RLC sont bien connues (Jung et al. 2004 ; Tranel et al. 2021) et sont responsables de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS chez 66 espèces adventices (Tranel et al. 2021). Le profil de résistance qu'elles confèrent varie selon la famille chimique, l'espèce et la nature de la substitution nucléotidique, et elles permettent souvent d'obtenir un niveau de résistance élevé au niveau individuel (*e.g.*, Nakka et al. 2017 ; Panozzo et al. 2013). Dans le cadre de notre travail, nous avons identifié un nombre exceptionnellement élevé de mutations dans le gène de l'ALS (**Chapitre 1**). Pas moins de neuf substitutions nucléotidiques décrites comme impliquées dans la RLC ont été observées dans différentes populations d'ambrosie réparties sur le territoire français. Nous avons démontré l'implication des allèles Thr205 et Val205 dans la résistance, aussi bien lorsque l'allèle était hétérozygote qu'homozygote (**Chapitre 1**). Dans le cas de ces mutations, l'évolution d'un allèle de résistance dominant à effet phénotypique fort a donc été démontrée. Concernant six des autres substitutions nucléotidiques (aux codons 197, 376, 574), bien que cette démonstration n'ait pas pu être réalisée en raison des faibles fréquences observées, nous postulons, sur la base des données de la littérature, qu'elles contribuent également à l'expression de la résistance que nous avons observée. Le neuvième allèle identifié (Ile578) est inédit, jusqu'alors jamais détecté sur le terrain pour aucune adventice et observé uniquement en laboratoire (Duggleby et al. 2003 ; Jung et al. 2004). La démonstration de son effet sur l'expression de la résistance est en cours de réalisation. **Dans le cas de l'ambrosie, une mutation dans le gène de l'ALS semble donc suffire à l'expression du phénotype résistant**, comme c'est le cas pour les autres espèces concernées par la RLC aux inhibiteurs de l'ALS (Tranel et al. 2021).

La résistance non liée à la cible (RNLC) englobe tous les mécanismes du métabolisme de la plante qui permettent d'éliminer l'herbicide avant qu'il n'atteigne sa cible et/ou de diminuer les effets cytotoxiques liés à l'action de l'herbicide. L'évolution de la RNLC est décrite comme pouvant être due à l'accumulation d'allèles à effets mineurs dont l'accumulation au cours des générations conduit à l'expression du phénotype résistant (Délye 2013). Ces allèles proviendraient de la variation génétique existante qui constitue un « réservoir d'adaptation » dont la sélection est favorisée par une pression de sélection forte et une diversité génétique initiale importante (Hermisson & Pennings 2005). L'ambrosie possède une grande diversité génétique qui concourt à son grand potentiel adaptatif (Genton et al. 2005). Meyer et al. 2022 ont montré que des plantes n'ayant jamais subi une pression de sélection herbicide peuvent naturellement présenter une importante variation de sensibilité à un herbicide de la famille des sulfonylurées, le metsulfuron. Également, ils ont montré, par le biais d'une expérience de sélection récurrente, que cette variabilité crée un terrain favorable à l'évolution de la RNLC au tribénuron et à l'imazamox. Chez l'ambrosie, pour laquelle nous avons démontré que la RNLC est le principal mécanisme ayant évolué (**Chapitre 1**) au sein de populations exposées à cette pression de sélection, nous avons identifié une grande diversité de gènes qui pourraient être impliqués dans la RNLC au sein de différentes populations (**Chapitre 2**). Une partie des gènes identifiés peut contribuer à la métabolisation de l'herbicide (cytochromes des familles 71, 72, 94, oxydases, gluco- et glycosyltransférases, ABC transporteurs, hydrolases, pompes à efflux, protéases, déshydrogénases) ou peut intervenir dans les processus de régulation liés à la perception du stress induit par l'application de l'herbicide (facteurs de transcription, protéines kinase, domaines riches en leucine). De plus, malgré notre effort à sélectionner un grand nombre de candidats pour validation (121 candidats) et à tester des combinaisons multiples de gènes pour prédire la résistance sur un échantillonnage conséquent de plantes, les combinaisons testées n'ont pas suffi à couvrir la diversité des mécanismes existants. **Incontestablement, la RNLC chez l'ambrosie en France a évolué par la sélection de multiples allèles dont la combinaison contribue à l'expression du phénotype résistant.** Cela a également été observé au Québec chez l'ambrosie dans un contexte d'évolution de la résistance différent, pour les inhibiteurs du photosystème II. Laforest et al. (2022) ont révélé la sélection de mécanismes de RNLC spécifiques d'une substance active, le linuron dans une population. Le croisement d'individus résistants de cette population avec des individus sensibles au linuron sur trois générations a permis de considérablement diminuer le niveau de résistance initialement observé. Ce résultat montre qu'en l'absence de pression de sélection, les mécanismes de RNLC sont « perdus » au cours des générations et est donc en faveur de la sélection de mécanismes polygéniques. Ainsi, chez l'ambrosie, sur la base d'un terrain génétique favorable, lié à une histoire évolutive de l'espèce propice à l'adaptation à différents stress environnementaux comme l'ont montré Hodgins et al. (2013), de multiples allèles sont sélectionnés

en réponse à la pression de sélection exercée par le traitement herbicide, ce qui conduit à l'observation de la RNLC.

Enfin, des mécanismes de RLC ont été détectés en association avec des mécanismes de RNLC au sein de trois des populations étudiées (**Chapitre 1**). La coexistence des mécanismes de RLC et de RNLC chez l'ambrosie en France avait déjà été observée par L. Meyer (2018) au sein d'une population et au niveau individuel. Nos résultats indiquent que la coexistence de ces mécanismes n'est pas isolée et est probablement plus générale que ce que nous avons pu observer. Des exemples de la littérature chez d'autres espèces adventices montrent que la coexistence des mécanismes est parfois sous-estimée (Kreiner et al. 2021 ; Scarabel et al. 2015). Chez l'ambrosie, notre étude suggère que l'évolution de ces deux mécanismes est encore récente et les cas de résistance détectés principalement dus à la RNLC (70% des cas détectés, **Chapitre 1**). L'observation de ces phénomènes évolutifs émergents et de la possible coexistence des mécanismes nous amène à nous interroger sur la temporalité de l'apparition des mécanismes (la RNLC est-elle le premier mécanisme mis en place ? Favorise-t-elle l'apparition de la RLC ?) et de leur réelle indépendance (l'expression du phénotype résistant chez des plantes où la RLC est détectée est-elle due à ce seul mécanisme ?).

Les mêmes phénotypes adaptatifs dans des populations distinctes ont-ils les mêmes bases génétiques ?

Au début de la thèse, les allèles Leu574 et Thr205 de l'ALS avaient déjà été identifiés chez l'ambrosie (Patzoldt et al. 2001 ; Rousonelos et al. 2012 ; Zheng, Patzoldt, et Tranel 2005 ; Meyer 2018). Les sept autres allèles identifiés dans notre travail (**Chapitre 1**) sont donc inédits dans le cadre de l'évolution de la RLC chez l'ambrosie. Certains avaient déjà été identifiés chez d'autres espèces, comme les substitutions aux codons 197 (Gln, Ser, Thr), 376 (Glu), 574 (Trp), 205 (Val) (Tranel et al., 2021). L'allèle Ile578 est totalement inédit. Nous avons également montré l'évolution redondante de la RLC par des apparitions multiples et indépendantes d'allèles dans des zones géographiques suffisamment éloignées pour être génétiquement isolées les unes des autres (**Chapitre 1**). **La sélection d'une même mutation au sein de multiples populations soumises à une même pression de sélection indique qu'il existe une sélection convergente pour les mécanismes de RLC.**

En ce qui concerne les mécanismes de RNLC, nos résultats montrent que les mécanismes de RNLC qui ont évolué dans chacune des populations ne sont pas convergents, ou du moins en partie divergents. Premièrement, les différentes populations étudiées dans le **Chapitre 1**, pour lesquelles la RNLC a été identifiée, ne présentent pas le même profil de résistance à l'imazamox et au tribénuron. Cela indique que les mécanismes de RNLC pour les deux substances actives sont au moins en partie

différents et potentiellement qu'ils impliquent des voies métaboliques différentes. Pour cette raison, nous avons sélectionné, dans le **Chapitre 2**, six populations provenant de zones géographiques différentes et/ou présentant un profil de résistance différent. Nous avons alors observé que chaque population présentait un profil d'expression transcriptomique qui lui était propre. Deuxièmement, très peu de gènes identifiés comme différemment exprimés (DE) entre des plantes résistantes et sensibles étaient partagés entre plusieurs populations, et aucun n'était commun à toutes les populations étudiées. En particulier, les gènes DE identifiés dans des populations qui présentent uniquement de la résistance au tribénuron (ARA8, NAQ8, NAQ9, OCC13, CVL5) sont différents. Ces observations indiquent que **de multiples mécanismes ont été sélectionnés indépendamment dans différentes populations**. Nous avons cependant observé grâce à l'analyse d'ontologie, pour les différentes populations, que suite à l'application du traitement (**Chapitre 2**), il existe une certaine concordance de la réponse des plantes quelle que soit la population considérée. Ainsi, des voies de réponse au stress et de régulation sont activées chez toutes les plantes ; une perturbation du métabolisme primaire est enregistrée chez les plantes sensibles et une activation du métabolisme secondaire chez les plantes résistantes spécifiquement. De plus, dans une des populations étudiées, OCC13, les plantes résistantes et sensibles se distinguent davantage par leur niveau d'expression après traitement qu'avant traitement. La RNLC pourrait être davantage constitutive ou induite selon la population étudiée.

Les divergences observées pourraient être dues à la sélection de mécanismes de RNLC différents sur la base d'une variation génétique initiale qui diffère entre populations (du fait d'histoires démographiques et d'adaptations locales différentes). En effet, si l'histoire évolutive de la résistance aux herbicides est récente, différentes adaptations co-existent encore dans et entre les populations, y compris des adaptations peu optimales en termes de degré de résistance ou de coût associé. Par la suite, une purge pourrait s'opérer au cours du temps pour ne retenir qu'un petit nombre de mécanismes adaptatifs optimaux. Dans leur étude, Kreiner et al. (2021) ont montré qu'une pression de sélection récente exercée par le glyphosate sur plusieurs populations d'*Amaranthus tuberculatus* a conduit à la sélection de multiples loci le long du génome de façon hétérogène entre les populations. A l'inverse, dans une autre étude où la résistance est plus évoluée, Van Etten et al. (2020) montrent que, dans des populations d'*Ipomoea purpurea*, de multiples loci ont été sélectionnés communément aux différentes populations. Enfin, dans le **Chapitre 3** nous avons identifié de potentiels marqueurs moléculaires corrélés à la RNLC dans une seule population, NAQ8, celle pour laquelle nous supposons que la résistance est la plus évoluée. La caractérisation de la RNLC sur une échelle évolutive plus longue est donc une piste future à explorer afin de vérifier si les mêmes mécanismes finissent par émerger dans des populations génétiquement isolées.

L'identification des déterminismes génétiques de la RNLC pourra-t-elle permettre de développer un outil de diagnostic de cette résistance polygénique ?

L'intérêt d'un outil de diagnostic moléculaire pour la détection de la résistance est qu'il permet d'obtenir une réponse rapide quant à la présence de la résistance dans une population donnée. De plus, les technologies de séquençage haut-débit ont considérablement multiplié le débit de séquençage, permettant un diagnostic rapide et à grande échelle, comme nous l'avons montré pour la détection de la RLC dans le **Chapitre 1**. La détection de la RNLC par séquençage haut-débit des mutations causales ou corrélées à la RNLC est une application directe de l'identification de ces déterminismes génétiques.

Comme discuté précédemment, notre étude a identifié de multiples mécanismes ayant évolué indépendamment et différemment au sein et entre les différentes populations d'ambrosie (**Chapitre 2**). Cette approche par l'étude quantitative du transcriptome de différentes populations n'a cependant pas permis d'identifier des marqueurs pouvant être utilisés à des fins de diagnostic. Les potentiels marqueurs identifiés dans le **Chapitre 3** restent à valider sur des échantillonnages massifs de plantes mais cette approche pourrait être une alternative pour la recherche de marqueurs. Étant donné la diversité de mécanismes que nous avons observée pour l'ambrosie, et la diversité des mécanismes relevés chez d'autres espèces (voir Tableau 11, **Chapitre 2**), le diagnostic de la RNLC, en raison de sa nature polygénique et de sa possible perpétuelle évolution est-il vraiment possible ? Si un tel outil venait un jour à se développer, il devrait probablement impliquer le séquençage d'un très grand nombre de marqueurs identifiés comme associés à la RNLC dans un contexte d'évolution donné. De plus, la perpétuelle évolution des organismes vivants, et donc potentiellement des mécanismes de RNLC, contraindra les développeurs d'un tel outil à l'ajuster continuellement à cette évolution, en proposant au moment du diagnostic les jeux d'allèles les plus pertinents pour détecter la résistance. Cela semblant difficile à réaliser, leur mise en place devra donc toujours être associée à des tests biologiques, qui sont le seul type de test permettant de confirmer la résistance ou de la détecter si les jeux d'allèles choisis ne sont plus pertinents.

Limites des approches transcriptomiques pour identifier des déterminismes génétiques d'un trait polygénique quantitatif tel que la RNLC et le développement d'un outil de diagnostic moléculaire

Dans le **Chapitre 2**, nous avons relevé pas moins de 30 études transcriptomiques réalisées sur des adventices dont l'objectif commun était d'identifier les déterminismes génétiques de la RNLC ayant évolué chez ces diverses espèces pour différents herbicides. Dans leur ensemble, ces études ont conduit à l'identification d'une grande diversité de candidats pouvant être impliqués dans la RNLC comme nous l'avons présenté dans le **Chapitre 2**. Toutefois, la validation de ces candidats sur des échantillonnages indépendants et conséquents de plantes a rarement été réalisée (exception, Duhoux et al. 2017), ce qui rend la validation de leur réelle implication dans la RNLC difficile. Quelques études (Han et al. 2021 ; Cummins et al. 2013 ; Pan et al. 2022) ont réalisé la validation fonctionnelle de gènes ainsi identifiés, prouvant ainsi que la surexpression des gènes en question conduit à l'expression du phénotype résistant. Elles révèlent cependant que les gènes ainsi validés ne sont pas systématiquement identifiés dans toutes les plantes de toutes les populations étudiées (Han et al. 2021) et n'ont donc pas forcément un grand intérêt pour le diagnostic.

De plus, malgré des recommandations publiées (Délye 2013 ; Giacomini et al. 2018), les protocoles et les méthodes d'analyse appliquées sont peu homogènes (Tableau 4, **Chapitre 2**), ce qui rend complexe la généralisation et la comparaison de ces résultats. Nous pensons qu'il existe un réel besoin d'harmoniser l'application de cette approche et de regrouper l'ensemble des informations acquises à ce jour dans une seule base de données afin de faire apparaître la redondance, si elle existe, des mécanismes de RNLC ayant évolué entre différentes espèces, voire pour différents herbicides. Cette base de données permettrait (i) d'harmoniser les méthodes d'analyse des données brutes, (ii) de considérer tous les gènes candidats potentiels à la RNLC, (iii) de créer une interface interactive qui permettrait de replacer dans le contexte cellulaire les voies métaboliques identifiées comme affectées par la RNLC. Les entrées sur cette interface pourraient se faire par mode d'action, par espèce, par familles enzymatiques, par voies métaboliques (codes KEGG). Le regroupement des données sur la résistance aux herbicides existe déjà, mais ne concerne pas les données transcriptomiques. La base de donnée weedscience.org (Heap 2022) recense tous les cas de résistance signalés dans le monde mais ne décrit pas les mécanismes de RNLC identifiés. Le regroupement et l'harmonisation des données génomiques sur les adventices est en train de se former grâce à un consortium international de chercheurs et d'industriels (« International Weed Genomics Consortium », IWGC). Leur volonté est de

Discussion générale

coordonner et obtenir (1) le génome de référence pour les adventices les plus problématiques, (2) fournir des outils d'analyse du génome et une formation par le biais d'une base de données et de ressources en lignes, (3) faciliter les collaborations dans le domaine de la génomique des adventices (Ravet et al. 2018; Sleugh et al. 2021). Cette volonté d'harmonisation pourrait être étendue aux données transcriptomiques.

Depuis 2013 où les études transcriptomiques ont commencé à être appliquées au domaine de la résistance aux herbicides (Yang, Yu, et Li 2013), aucun outil de diagnostic moléculaire de la RNLC n'a été développé, bien que cette idée ait été émise la même année (Délye 2013). Ainsi, les approches transcriptomique conduites seules sont-elles vraiment pertinentes pour identifier les déterminismes génétiques de la RNLC ? Ce type d'approche permet « seulement » de visualiser les changements d'expression liés à la résistance mais ne permet pas de visualiser directement leur cause génétique, c'est à dire les mutations qui en sont à la base (Gaines 2020). Dans le cadre de notre travail, de nombreux gènes identifiés pourraient être en lien avec la RNLC mais les différences d'expression observées ne suffisent pas au développement d'un outil de diagnostic. Quand bien même nous validerions fonctionnellement l'effet de la surexpression de nos gènes-candidats sur le phénotype résistant, étant donné le caractère hautement polygénique de la RNLC et la diversité des mécanismes susceptibles d'évoluer, un outil de diagnostic basé sur ces gènes uniquement risque d'être peu sensible (au sens de la capacité du test à détecter les individus résistants).

La volonté des chercheurs à développer des ressources génomiques pour les adventices comme mentionné plus haut ouvrira d'autres perspectives pour l'identification des déterminismes génétiques de la RNLC. Même si elles sont plus difficiles à obtenir, elles permettront de conduire des études telles que la cartographie génétique des loci à effet quantitatif dans des populations de sélection récurrente ou des études d'association à l'échelle du génome, qui contribueront à identifier les mutations en cause dans la RNLC, et sur la base desquelles un outil de diagnostic pourrait potentiellement être mis au point.

Perspectives de notre travail

Au cours de cette discussion, nous avons soulevé quelques points de perspectives que nous souhaitons développer ici.

Valider et cartographier les marqueurs identifiés dans le Chapitre 3

Dans le **Chapitre 3**, nous avons identifié des polymorphismes de séquence associés à la RNLC. Ces marqueurs doivent dans un premier temps être validés sur un échantillonnage massif de plantes afin de vérifier la réelle association de ces marqueurs à la RNLC à l'échelle d'une ou de plusieurs populations. L'assemblage d'un génome d'ambrosie permettrait également de cartographier ces marqueurs afin d'identifier les régions génomiques sélectionnées, sous l'hypothèse que la sélection de loci ait été accompagnée d'un « balayage sélectif » fort, avec conservation des régions génomiques autour du locus sélectionné (Smith & Haigh, 1974).

L'assemblage du génome de l'ambrosie ouvrirait également d'autres perspectives d'analyses. Par exemple, il permettrait de conduire une étude d'association à l'échelle du génome (GWAS) et ainsi d'identifier de potentiels loci sélectionnés en réponse à la pression de sélection herbicide dans des régions régulatrices que notre approche à l'échelle du transcriptome n'a pas permis de détecter.

Explorer la piste de la sélection de mécanismes induits au-delà des deux heures après traitement

Dans notre travail, nous nous sommes essentiellement concentrés sur la recherche des déterminismes génétiques constitutifs ayant évolué au sein de six populations d'ambrosie. Nous avons fait ce choix car, au début de la thèse, identifier des différences d'expression constitutives semblait plus adapté pour le développement d'un outil de diagnostic moléculaire. Si les résultats de ces analyses sont largement divergents entre populations, nous avons observé une convergence relative des données d'expression deux heures après traitement, bien que les DE mesurées n'aient pas été encore été validées sur un échantillonnage massif et indépendant de plantes. De plus, pour trois des six populations étudiées, les DE constitutives n'ont pas été validées (**Chapitre 2**). Les mécanismes ayant évolué dans ces populations demeurent donc inconnus et la piste de mécanismes induits reste à explorer. Nous proposerions donc, dans un premier temps, de valider les DE mesurées deux heures après traitement (*via* de la qPCR fluidigm) grâce aux échantillons produits lors de la thèse (plus d'une centaine d'échantillons par population). En parallèle, construire une cinétique de suivi avec les modalités 4 heures, 6 heures, 8 heures, 24 heures, 48 heures, les échantillons à 24 heures ayant déjà été prélevés. Une telle cinétique nous permettra d'observer les premiers effets du traitement sur le

métabolisme des plantes, l'activation des voies de réponse au stress à la suite de l'application des inhibiteurs de l'ALS étant supposée survenir rapidement (Manabe et al. 2007), et l'ampleur et la vitesse de cette réponse étant déterminante pour l'expression de la résistance (Gaines et al. 2020).

Étudier des populations dans lesquelles la résistance est plus évoluée

Comme nous l'avons présenté et discuté, les populations choisies pour cette étude présentent, pour la plupart, des fréquences de résistance faibles, indiquant un phénomène évolutif encore jeune ce qui a pu contribuer à nos difficultés à identifier des déterminismes génétiques communs pour la RNLC aux différentes populations.

Afin d'évaluer s'il existe des gènes marqueurs de la RNLC transversaux aux différentes populations, deux stratégies sont possibles : (1) rechercher des populations sur le terrain pour lesquelles la résistance est plus évoluée, si elles existent, (2) utiliser des populations expérimentales soumises à sélection récurrente puis valider les résultats dans des populations du terrain.

Sur cette dernière possibilité, il faudra garder à l'esprit que les populations de sélection récurrentes sont obtenues artificiellement, à partir du croisement de seulement quelques plantes, et ne seront donc peut-être pas représentatives du réel « réservoir adaptatif » présent dans des populations du terrain, en particulier pour une espèce comme l'ambrosie qui est caractérisée par une forte diversité génétique et un pollen capable de se disperser sur de longues distance (Clot et al. 2002). Pour limiter ce biais expérimental, il faudrait créer plusieurs populations (de 30 à 50) à partir d'une seule population du terrain, étudier les mécanismes qui y ont ségrégués et définir s'il y a convergence des mécanismes ainsi sélectionnés.

Explorer la piste des réseaux de gènes co-régulés avec les données transcriptomiques

Dans leur étude, Giacomini et al. (2020) ont montré que des gènes DE et responsables de la métabolisation exacerbée des herbicides peuvent se rassembler en groupes de co-expression génomique. L'étude de tels groupes de gènes ouvre la possibilité d'identifier un unique mécanisme de régulation génétique dont le rôle est de réguler un ensemble des gènes identifiés comme DE. Ainsi, en réalisant ce type d'analyse, l'identification d'un seul gène au cœur de ce réseau de co-expression serait suffisant pour le développement d'un outil de diagnostic, plutôt que ce dernier soit basé sur la détection des multiples gènes co-régulés par ce gène.

De plus, ce type d'analyse a déjà été réalisé sur des données transcriptomiques d'ambrosie (Hämälä et al., 2020) dans un autre contexte de recherche, où les auteurs ont examiné le rôle de la

Discussion générale

pléiotropie dans la régulation de la différenciation adaptative parmi des populations d'ambrosie. Ils ont montré que des gènes au cœur des réseaux de co-expression peuvent être des cibles de sélection positive lors de changements environnementaux, même s'ils subissent probablement une forte sélection purificatrice dans des environnements sélectifs stables.

Ainsi, grâce à cette approche, nous pourrions identifier, sur les données transcriptomiques déjà acquises, si la pression de sélection exercée par les herbicides a contribué ou non à la sélection de gènes au cœur de réseaux de co-expression.

Pour conclure, ce travail de thèse a apporté des éléments de réponse quant à la dynamique évolutive d'une espèce envahissante en réponse à une forte pression de sélection anthropique. Si l'approche transcriptomique conduite lors de ce travail a permis d'identifier des pistes quant aux mécanismes de RNLC sélectionnés dans différentes populations d'ambrosie, sa seule application demeure insuffisante pour identifier les déterminismes génétiques causaux de la RNLC. L'étude d'un phénomène évolutif aussi complexe et méconnu que la RNLC pourrait être abordée plus efficacement grâce à la complémentarité des approches à l'échelle du génome et du transcriptome. L'obtention d'un génome d'ambrosie, en complément de nos travaux, permettrait d'approfondir les nouveaux questionnements que ce travail a ouverts.

Références

- Alexa, A., & Rahnenfuhrer, J. (2021). *Enrichment analysis for Gene Ontology* (R package version 2.46.0.) [Computer software].
- Altieri, M. A. (1999). The ecological role of biodiversity in agroecosystems. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 74(1), 19-31. [https://doi.org/10.1016/S0167-8809\(99\)00028-6](https://doi.org/10.1016/S0167-8809(99)00028-6)
- An, J., Shen, X., Ma, Q., Yang, C., Liu, S., & Chen, Y. (2014). Transcriptome profiling to discover putative genes associated with paraquat resistance in Goosegrass (*Eleusine indica* L.). *PLoS ONE*, 9(6), e99940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0099940>
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data : A model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64(15), 5245-5250. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-0496>
- Anjum, N. A., Umar, S., & Chan, M. (2010). *Ascorbate-glutathione pathway and stress tolerance in plants*. Springer Science & Business Media.
- Arimura, G. I., Ozawa, R., Shimoda, T., Nishioka, T., Boland, W., & Takabayashi, J. (2000). Herbivory-induced volatiles elicit defence genes in lima bean leaves. *Nature*, 406(6795), 512-515. <https://doi.org/10.1038/35020072>
- Ashworth, M. B., Walsh, M. J., Flower, K. C., & Powles, S. B. (2016). Recurrent selection with reduced 2,4-D amine doses results in the rapid evolution of 2,4-D herbicide resistance in wild radish (*Raphanus raphanistrum* L.) : Low 2,4-D doses lead to the rapid evolution of 2,4-D resistance. *Pest Management Science*, 72(11), 2091-2098. <https://doi.org/10.1002/ps.4364>
- Badouin, H., Gouzy, J., Grassa, C. J., Murat, F., Staton, S. E., Cottret, L., Lelandais-Brière, C., Owens, G. L., Carrère, S., Mayjonade, B., Legrand, L., Gill, N., Kane, N. C., Bowers, J. E., Hubner, S., Bellec, A., Bérard, A., Bergès, H., Blanchet, N., ... Langlade, N. B. (2017). The sunflower

Références

- genome provides insights into oil metabolism, flowering and Asterid evolution. *Nature*, 546(7656), 148-152. <https://doi.org/10.1038/nature22380>
- Bai, S., Liu, W., Wang, H., Zhao, N., Jia, S., Zou, N., Guo, W., & Wang, J. (2018). Enhanced herbicide metabolism and metabolic resistance genes identified in tribenuron-methyl resistant *Myosoton aquaticum* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(37), 9850-9857. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b02740>
- Bai, S., Zhao, Y., Zhou, Y., Wang, M., Li, Y., Luo, X., & Li, L. (2020). Identification and expression of main genes involved in non-target site resistance mechanisms to fenoxaprop-p-ethyl in *Beckmannia syzigachne*. *Pest Management Science*, ps.5800. <https://doi.org/10.1002/ps.5800>
- Barnes, E. R., Knezevic, S. Z., Sikkema, P. H., Lindquist, J. L., & Jhala, A. J. (2017). Control of glyphosate-resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in glufosinate-resistant soybean [*Glycine max* (L.) Merr]. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1455. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01455>
- Barrett, R. D. H., & Schluter, D. (2008). Adaptation from standing genetic variation. *Trends in Ecology & Evolution*, 23(1), 38-44. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2007.09.008>
- BASF France division Agro. Consulté 10 janvier 2022, à l'adresse <https://www.agro.basf.fr/fr/>
- Baskin, J. M., & Baskin, C. C. (1980). Ecophysiology of secondary dormancy in seeds of *Ambrosia artemisiifolia*. *Ecology*, 61(3), 475-480. <https://doi.org/10.2307/1937410>
- Bassett, I. J., & Crompton, C. W. (1975). The biology of Canadian Weeds : *Ambrosia artemisiifolia* L. and *A. Psilostachya* DC. *Canadian Journal of Plant Science*, 55(2), 463-476. <https://doi.org/10.4141/cjps75-072>
- Baucom, R. S. (2019). Evolutionary and ecological insights from herbicide-resistant weeds : What have we learned about plant adaptation, and what is left to uncover? *New Phytologist*, 223(1), 68-82. <https://doi.org/10.1111/nph.15723>

Références

- Beckie, H. J., & Tardif, F. J. (2012). Herbicide cross resistance in weeds. *Crop Protection*, 35, 15-28.
<https://doi.org/10.1016/j.cropro.2011.12.018>
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate : A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289-300. <https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x>
- Berg, J. J., & Coop, G. (2014). A Population Genetic Signal of Polygenic Adaptation. *PLoS Genetics*, 10(8), e1004412. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004412>
- Bohren, C., Delabays, N., & Mermillod, G. (2007). *Control of Ambrosia artemisiifolia : Disrupting lifecycle to exhaust seedbank in infested area*. 103.
- Bonny, S. (2016). Genetically modified herbicide-tolerant crops, weeds, and herbicides : Overview and impact. *Environmental Management*, 57(1), 31-48. <https://doi.org/10.1007/s00267-015-0589-7>
- Boulaine, J. (1992). *Histoire de l'agronomie en France*. Lavoisier Tec & Doc.
- Bourdineaud, J.-P. (2020). Toxicity of the herbicides used on herbicide-tolerant crops, and societal consequences of their use in France. *Drug and Chemical Toxicology*, 1-24.
<https://doi.org/10.1080/01480545.2020.1770781>
- Burgos, N. R. (2015). Whole-plant and seed bioassays for resistance confirmation. *Weed Science*, 63(SP1), 152-165. <https://doi.org/10.1614/WS-D-14-00019.1>
- Busi, R., Gaines, T. A., Walsh, M. J., & Powles, S. B. (2012). Understanding the potential for resistance evolution to the new herbicide pyroxasulfone : Field selection at high doses versus recurrent selection at low doses. *Weed Research*, 52(6), 489-499. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2012.00948.x>
- Busi, R., Goggin, D. E., Heap, I. M., Horak, M. J., Jugulam, M., Masters, R. A., Napier, R. M., Riar, D. S., Satchivi, N. M., Torra, J., Westra, P., & Wright, T. R. (2018). Weed resistance to synthetic auxin herbicides. *Pest Management Science*, 74(10), 2265-2276.
<https://doi.org/10.1002/ps.4823>

Références

- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009). The MIQE guidelines : Minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, *55*(4), 611-622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Cao, Y., Wei, S., Huang, H., Li, W., Zhang, C., & Huang, Z. (2021). Target-site mutation and enhanced metabolism confer resistance to thifensulfuron-methyl in a multiple-resistant redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) population. *Weed Science*, *69*(2), 161-166. <https://doi.org/10.1017/wsc.2020.93>
- Caverzan, A., Piasecki, C., Chavarria, G., Stewart, C., & Vargas, L. (2019). Defenses against ROS in crops and weeds : The effects of interference and herbicides. *International Journal of Molecular Sciences*, *20*(5), 1086. <https://doi.org/10.3390/ijms20051086>
- Cechin, J., Piasecki, C., Benemann, D. P., Kremer, F. S., Galli, V., Maia, L. C., Agostinetto, D., & Vargas, L. (2020). Transcriptome analysis identifies candidate target genes involved in glyphosate-resistance mechanism in *Lolium multiflorum*. *Plants*, *9*(6), 685. <https://doi.org/10.3390/plants9060685>
- Chauvel, B., Dessaint, F., Cardinal-Legrand, C., & Bretagnolle, F. (2006). The historical spread of *Ambrosia artemisiifolia* L. in France from herbarium records. *Journal of Biogeography*, *33*(4), 665-673. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2005.01401.x>
- Chauvel, B., Guillemin, J.-P., Gasquez, J., & Gauvrit, C. (2012). History of chemical weeding from 1944 to 2011 in France : Changes and evolution of herbicide molecules. *Crop Protection*, *42*, 320-326. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2012.07.011>
- Chen, J., Huang, H., Wei, S., Huang, Z., Wang, X., & Zhang, C. (2017). Investigating the mechanisms of glyphosate resistance in goosegrass (*Eleusine indica* (L.) Gaertn.) by RNA sequencing technology. *The Plant Journal*, *89*(2), 407-415. <https://doi.org/10.1111/tpj.13395>
- Chen, K.-W., Marusciac, L., Tamas, P. T., Valenta, R., & Panaitescu, C. (2018). Ragweed pollen allergy : Burden, characteristics, and management of an imported allergen source in Europe.

Références

- International Archives of Allergy and Immunology*, 176(3-4), 163-180.
<https://doi.org/10.1159/000487997>
- Chronopoulou, E., Georgakis, N., Nianiou-Obeidat, I., Madesis, P., Perperopoulou, F., Pouliou, F., Vasilopoulou, E., Ioannou, E., Ataya, F. S., & Labrou, N. E. (2017). Plant glutathione transferases in abiotic stress response and herbicide resistance. In M. A. Hossain, M. G. Mostofa, P. Diaz-Vivancos, D. J. Burritt, M. Fujita, & L.-S. P. Tran (Éds.), *Glutathione in Plant Growth, Development, and Stress Tolerance* (p. 215-233). Springer International Publishing.
https://doi.org/10.1007/978-3-319-66682-2_10
- Chun, Y. J., Fumanal, B., Laitung, B., & Bretagnolle, F. (2010). Gene flow and population admixture as the primary post-invasion processes in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) populations in France. *New Phytologist*, 185(4), 1100-1107. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03129.x>
- Clot, B., Schneiter, D., Tercier, P., Gehrig, R., Annie, G., & Thibaudon, M. (2002). *Ambrosia* pollen in Switzerland-produced locally or transported? *Allergie et immunologie*, 126-128.
- Coleman, J., Blake-Kalff, M., & Davies, E. (1997). Detoxification of xenobiotics by plants : Chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, 2(4), 144-151.
[https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01019-4](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01019-4)
- Cseh, A., Cernák, I., & Taller, J. (2009). Molecular characterization of atrazine resistance in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.). *Journal of Applied Genetics*, 50(4), 321-327.
<https://doi.org/10.1007/BF03195690>
- Cummins, I., & Edwards, R. (2004). Purification and cloning of an esterase from the weed black-grass (*Alopecurus myosuroides*), which bioactivates aryloxyphenoxypropionate herbicides. *The Plant Journal*, 39(6), 894-904. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02174.x>
- Cummins, I., Wortley, D. J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C. R., Straker, H. E., Sellars, J. D., Knight, K., Edwards, L., Hughes, D., Kaundun, S. S., Hutchings, S.-J., Steel, P. G., & Edwards, R. (2013). Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds.

Références

- Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(15), 5812-5817.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1221179110>
- Danecek, P., Auton, A., Abecasis, G., Albers, C. A., Banks, E., DePristo, M. A., Handsaker, R. E., Lunter, G., Marth, G. T., Sherry, S. T., McVean, G., Durbin, R., & 1000 Genomes Project Analysis Group. (2011). The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*, 27(15), 2156-2158.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr330>
- Darmency, H., Colbach, N., & Le Corre, V. (2017). Relationship between weed dormancy and herbicide rotations : Implications in resistance evolution. *Pest Management Science*, 73(10), 1994-1999. <https://doi.org/10.1002/ps.4611>
- Dayan, F. E. (2019). Current status and future prospects in herbicide discovery. *Plants*, 8(9), 341.
<https://doi.org/10.3390/plants8090341>
- Délye, C. (2004). Nucleotide variability at the acetyl coenzyme A carboxylase gene and the signature of herbicide selection in the grass weed *Alopecurus myosuroides* (Huds.). *Molecular Biology and Evolution*, 21(5), 884-892. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh095>
- Délye, C. (2005). Weed resistance to acetyl coenzyme A carboxylase inhibitors : An update. *Weed Science*, 53(5), 728-746. <https://doi.org/10.1614/WS-04-203R.1>
- 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 Management Science*, 69(2), 176-187. <https://doi.org/10.1002/ps.3318>
- 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(2), 97-101. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2007.00615.x>
- 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(3), 326-336. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2009.00700.x>

Références

- Délye, C., Causse, R., Gautier, V., Poncet, C., & Michel, S. (2015). Using next-generation sequencing to detect mutations endowing resistance to pesticides : Application to acetolactate-synthase (ALS)-based resistance in barnyard grass, a polyploid grass weed: Pesticide resistance diagnosis using next-generation sequencing. *Pest Management Science*, *71*(5), 675-685. <https://doi.org/10.1002/ps.3818>
- Délye, C., Causse, R., & Michel, S. (2016). Genetic basis, evolutionary origin and spread of resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase in common groundsel (*Senecio vulgaris*) : Resistance to ALS inhibitors in *Senecio vulgaris*. *Pest Management Science*, *72*(1), 89-102. <https://doi.org/10.1002/ps.4058>
- Délye, C., Deulvot, C., & Chauvel, B. (2013). DNA analysis of herbarium specimens of the grass weed *Alopecurus myosuroides* reveals herbicide resistance pre-dated herbicides. *PLOS ONE*, *8*(10), e75117. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075117>
- Délye, C., Duhoux, A., Pernin, F., Riggins, C. W., & Tranel, P. J. (2015). Molecular mechanisms of herbicide resistance. *Weed Science*, *63*(SP1), 91-115. <https://doi.org/10.1614/WS-D-13-00096.1>
- Délye, C., Jasieniuk, M., & Le Corre, V. (2013). Deciphering the evolution of herbicide resistance in weeds. *Trends in Genetics*, *29*(11), 649-658. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2013.06.001>
- Délye, C., Matějček, A., & Gasquez, J. (2002). PCR-based detection of resistance to acetyl-CoA carboxylase-inhibiting herbicides in black-grass (*Alopecurus myosuroides* Huds) and ryegrass (*Lolium rigidum* Gaud). *Pest Management Science*, *58*(5), 474-478. <https://doi.org/10.1002/ps.485>
- Délye, C., Menchari, Y., Michel, S., & Darmency, H. (2004). Molecular bases for sensitivity to tubulin-binding herbicides in green foxtail. *Plant Physiology*, *136*(4), 3920-3932. <https://doi.org/10.1104/pp.103.037432>
- Délye, C., Michel, S., Pernin, F., Gautier, V., Gislard, M., Poncet, C., & Le Corre, V. (2020). Harnessing the power of next-generation sequencing technologies to the purpose of high-throughput

Références

- pesticide resistance diagnosis. *Pest Management Science*, 76(2), 543-552.
<https://doi.org/10.1002/ps.5543>
- Délye, C., Pernin, F., & Scarabel, L. (2011). Evolution and diversity of the mechanisms endowing resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in corn poppy (*Papaver rhoeas* L.). *Plant Science*, 180(2), 333-342. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.10.007>
- Demissie, A. G. (2016). Structure and function of disease resistance proteins in plants. *American Journal of Microbiology and Immunology*, 2(1), 1-6.
- Dessaux, Y., Beckert, M., & Tibi, A. (2014). *Les variétés végétales tolérantes aux herbicides : Un outil de désherbage durable ?* Quae.
- Dimaano, N. G., & Iwakami, S. (2021). Cytochrome P450-mediated herbicide metabolism in plants : Current understanding and prospects. *Pest Management Science*, 77(1), 22-32.
<https://doi.org/10.1002/ps.6040>
- Dixon, A., Comont, D., Slavov, G. T., & Neve, P. (2021). Population genomics of selectively neutral genetic structure and herbicide resistance in UK populations of *Alopecurus myosuroides*. *Pest Management Science*, 77(3), 1520-1529. <https://doi.org/10.1002/ps.6174>
- Doğramacı, M., Foley, M. E., Horvath, D. P., Hernandez, A. G., Khetani, R. S., Fields, C. J., Keating, K. M., Mikel, M. A., & Anderson, J. V. (2015). Glyphosate's impact on vegetative growth in leafy spurge identifies molecular processes and hormone cross-talk associated with increased branching. *BMC Genomics*, 16(1), 395. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1627-9>
- Duggleby, R. G., McCourt, J. A., & Guddat, L. W. (2008). Structure and mechanism of inhibition of plant acetohydroxyacid synthase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(3), 309-324.
<https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.004>
- Duggleby, R. G., Pang, S. S., Yu, H., & Guddat, L. W. (2003). Systematic characterization of mutations in yeast acetohydroxyacid synthase. Interpretation of herbicide-resistance data. *European Journal of Biochemistry*, 270(13), 2895-2904. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03671.x>

Références

- Duhoux, A., Carrère, S., Duhoux, A., & Délye, C. (2017). Transcriptional markers enable identification of rye-grass (*Lolium* sp.) plants with non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase. *Plant Science*, *257*, 22-36.
<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2017.01.009>
- Duhoux, A., Carrère, S., Gouzy, J., Bonin, L., & Délye, C. (2015). RNA-Seq analysis of rye-grass transcriptomic response to an herbicide inhibiting acetolactate-synthase identifies transcripts linked to non-target-site-based resistance. *Plant Molecular Biology*, *87*(4-5), 473-487. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0292-3>
- Duhoux, A., & 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 ONE*, *8*(5), e63576. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063576>
- Duke, S. O. (2012). Why have no new herbicide modes of action appeared in recent years? *Pest Management Science*, *68*(4), 505-512. <https://doi.org/10.1002/ps.2333>
- Dyer, W. E. (2018). Stress-induced evolution of herbicide resistance and related pleiotropic effects. *Pest Management Science*, *74*(8), 1759-1768. <https://doi.org/10.1002/ps.5043>
- Essl, F., Biró, K., Brandes, D., Broennimann, O., Bullock, J. M., Chapman, D. S., Chauvel, B., Dullinger, S., Fumanal, B., Guisan, A., Karrer, G., Kazinczi, G., Kueffer, C., Laitung, B., Lavoie, C., Leitner, M., Mang, T., Moser, D., Müller-Schärer, H., ... Follak, S. (2015). Biological flora of the British Isles : *Ambrosia artemisiifolia*. *Journal of Ecology*, *103*(4), 1069-1098.
<https://doi.org/10.1111/1365-2745.12424>
- Fang, J., Zhang, Y., Liu, T., Yan, B., Li, J., & Dong, L. (2019). Target-site and metabolic resistance mechanisms to penoxsulam in barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli* (L.) P. Beauv). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *67*(29), 8085-8095.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b01641>
- FAOSTAT. Consulté 12 janvier 2022, à l'adresse <https://www.fao.org/faostat/en/#data>

Références

- Fernández, L., de Haro, L. A., Distefano, A. J., Carolina Martínez, M., Lía, V., Papa, J. C., Olea, I., Tosto, D., & Esteban Hopp, H. (2013). Population genetics structure of glyphosate-resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense* L. Pers) does not support a single origin of the resistance. *Ecology and Evolution*, 3(10), 3388-3400. <https://doi.org/10.1002/ece3.671>
- Foster, D. K., Ward, P., & Hewson, R. T. (1993). *Selective grass-weed control in wheat and barley based on the safener fenchlorazole-ethyl* (Vol. 3). British Crop Protection Council (BCPC).
- Franco-Ortega, S., Goldberg-Cavalleri, A., Walker, A., Brazier-Hicks, M., Onkokesung, N., & Edwards, R. (2021). Non-target site herbicide resistance is conferred by two distinct mechanisms in black-grass (*Alopecurus myosuroides*). *Frontiers in Plant Science*, 12, 636652. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.636652>
- Freye, E. (2010). Toxicity of Datura Stramonium. In *Pharmacology and abuse of cocaine, amphetamines, ecstasy and related designer drugs : A comprehensive review on their mode of action, treatment of abuse and intoxication* (p. 217-218). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2448-0_34
- Fried, G., Chauvel, B., Reynaud, P., & Sache, I. (2017). Decreases in crop production by non-native weeds, pests, and pathogens. In M. Vilà & P. E. Hulme (Éds.), *Impact of Biological Invasions on Ecosystem Services* (p. 83-101). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-45121-3_6
- Fried, G., Le Corre, V., Rakotoson, T., Buchmann, J., Germain, T., Gounon, R., Royer, H., Biju-Duval, L., Felten, E., Vieren, E., & Chauvel, B. (2022). Impact of new management practices on arable and field margin plant communities in sunflower, with an emphasis on the abundance of *Ambrosia artemisiifolia* (Asteraceae). *Weed Research*. <https://doi.org/10.1111/wre.12522>
- Fried, G., Petit, S., Dessaint, F., & Reboud, X. (2009). Arable weed decline in northern France : Crop edges as refugia for weed conservation? *Biological Conservation*, 142(1), 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.09.029>

Références

- Fumanal, B., & Chauvel, B. (2007). Biologie et écologie de l'ambrosie : Explication d'un succès. *Perspectives agricoles*, 332, 6-7.
- Fumanal, B., Chauvel, B., & Bretagnolle, F. (2007). Estimation of pollen and seed production of common ragweed in France. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine: AAEM*, 14(2), 233-236.
- Fumanal, B., Chauvel, B., Sabatier, A., & Bretagnolle, F. (2007). Variability and cryptic heteromorphism of *Ambrosia artemisiifolia* seeds : What consequences for its invasion in France? *Annals of Botany*, 100(2), 305-313. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm108>
- Fumanal, B., Girod, C., Fried, G., Bretagnolle, F., & Chauvel, B. (2008). Can the large ecological amplitude of *Ambrosia artemisiifolia* explain its invasive success in France? *Weed Research*, 48(4), 349-359. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2008.00627.x>
- Gaines, T. A., Busi, R., & Küpper, A. (2021). Can new herbicide discovery allow weed management to outpace resistance evolution? *Pest Management Science*, 77(7), 3036-3041. <https://doi.org/10.1002/ps.6457>
- Gaines, T. A., Duke, S. O., Morran, S., Rigon, C. A. G., Tranel, P. J., Küpper, A., & Dayan, F. E. (2020). Mechanisms of evolved herbicide resistance. *Journal of Biology Chemistry*, 30(295), 10307-10330. <https://doi.org/10.1074/jbc.REV120.013572>
- Gaines, T. A., Lorentz, L., Figge, A., Herrmann, J., Maiwald, F., Ott, M., Han, H., Busi, R., Yu, Q., Powles, S. B., & Beffa, R. (2014). RNA-Seq transcriptome analysis to identify genes involved in metabolism-based diclofop resistance in *Lolium rigidum*. *The Plant Journal*, 78(5), 865-876. <https://doi.org/10.1111/tpj.12514>
- Gallien, L., Thuiller, W., Fort, N., Boleda, M., Alberto, F. J., Rioux, D., Lainé, J., & Lavergne, S. (2016). Is there any evidence for rapid, genetically-based, climatic niche expansion in the invasive common ragweed? *PLOS ONE*, 11(4), e0152867. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152867>

Références

- Ganie, Z., Jugulam, M., Varanasi, V., & Jhala, A. J. (2017). Investigating mechanism of glyphosate resistance in a common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) biotype from Nebraska. *Canadian Journal of Plant Science*, 97, 1140-1151. <https://doi.org/10.1139/CJPS-2017-0036>
- Gard, B., Bretagnolle, F., Dessaint, F., & Laitung, B. (2013). Invasive and native populations of common ragweed exhibit strong tolerance to foliar damage. *Basic and Applied Ecology*, 14(1), 28-35. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2012.10.007>
- Gardin, J. A. C., Gouzy, J., Carrère, S., & Délye, C. (2015). ALOMYbase, a resource to investigate non-target-site-based resistance to herbicides inhibiting acetolactate-synthase (ALS) in the major grass weed *Alopecurus myosuroides* (black-grass). *BMC Genomics*, 16(1), 590. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1804-x>
- Genton, B. J., Shykoff, J. A., & Giraud, T. (2005). High genetic diversity in French invasive populations of common ragweed, *Ambrosia artemisiifolia*, as a result of multiple sources of introduction. *Molecular Ecology*, 14(14), 4275-4285. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02750.x>
- Gestion de l'ambrosie à feuille d'armoise en tournesol et soja*. Consulté 10 janvier 2022, à l'adresse <https://www.terresinovia.fr/-/gestion-de-l-ambrosie-a-feuille-d-armoise>
- Giacomini, D. A., Gaines, T., Beffa, R., & Tranel, P. J. (2018). Optimizing RNA-seq studies to investigate herbicide resistance. *Pest Management Science*, 74(10), 2260-2264. <https://doi.org/10.1002/ps.4822>
- Giacomini, D. A., Patterson, E. L., Küpper, A., Beffa, R., Gaines, T. A., & Tranel, P. J. (2020). Coexpression clusters and allele-specific expression in metabolism-based herbicide resistance. *Genome Biology and Evolution*, 12(12), 2267-2278. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa191>
- Gil, M., & Nestares, G. (2019). Decoding non-target-site herbicide resistance in sunflower : The beginning of the story. *Helia*, 42(70), 1-16. <https://doi.org/10.1515/helia-2019-0002>

Références

- Gladieux, P., Giraud, T., Kiss, L., Genton, B. J., Jonot, O., & Shykoff, J. A. (2011). Distinct invasion sources of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) in Eastern and Western Europe. *Biological Invasions*, 13(4), 933-944. <https://doi.org/10.1007/s10530-010-9880-y>
- Goeger, D. E., Cheeke, P. R., Schmitz, J. A., & Buhler, D. R. (1982). Toxicity of tansy ragwort (*Senecio jacobaea*) to goats. *American Journal of Veterinary Research*, 43(2), 252-254.
- Goldburg, R. J. (1992). Environmental concerns with the development of herbicide-tolerant plants. *Weed Technology*, 6(3), 647-652. <https://doi.org/10.1017/S0890037X0003596X>
- Gressel, J. (1990). *Need herbicide resistance have evolved ? Generalizations from around the world.* 173-184.
- Guillemin, J.-P., & Chauvel, B. (2011). Effects of the seed weight and burial depth on the seed behavior of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). *Weed Biology and Management*, 11(4), 217-223. <https://doi.org/10.1111/j.1445-6664.2011.00423.x>
- Hämälä, T., Gorton, A. J., Moeller, D. A., & Tiffin, P. (2020). Pleiotropy facilitates local adaptation to distant optima in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). *PLOS Genetics*, 16(3), e1008707. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008707>
- Han, H., Yu, Q., Beffa, R., González, S., Maiwald, F., Wang, J., & Powles, S. B. (2021). Cytochrome P450 CYP81A10v7 in *Lolium rigidum* confers metabolic resistance to herbicides across at least five modes of action. *The Plant Journal*, 105(1), 79-92. <https://doi.org/10.1111/tpj.15040>
- Han, H., Yu, Q., Owen, M. J., Cawthray, G. R., & Powles, S. B. (2016). Widespread occurrence of both metabolic and target-site herbicide resistance mechanisms in *Lolium rigidum* populations. *Pest Management Science*, 72(2), 255-263. <https://doi.org/10.1002/ps.3995>
- Hawkins, N. J., Bass, C., Dixon, A., & Neve, P. (2019). The evolutionary origins of pesticide resistance. *Biological Reviews*, 94(1), 135-155. <https://doi.org/10.1111/brv.12440>
- Heap, I. M. (2022). *The international herbicide-resistant weed database.*
<http://www.weedscience.org/>

Références

- Heap, I. M., & Knight, R. (1986). The occurrence of herbicide cross-resistance in a population of annual ryegrass, *Lolium rigidum*, resistant to diclofop-methyl. *Australian Journal of Agricultural Research*, 37, 149-156. <https://doi.org/10.1071/AR9860149>
- Hermisson, J., & Pennings, P. S. (2005). Soft Sweeps : Molecular population genetics of adaptation from standing genetic variation. *Genetics*, 169(4), 2335-2352. <https://doi.org/10.1534/genetics.104.036947>
- Hicks, H. L., Comont, D., Coutts, S. R., Crook, L., Hull, R., Norris, K., Neve, P., Childs, D. Z., & Freckleton, R. P. (2018). The factors driving evolved herbicide resistance at a national scale. *Nature Ecology & Evolution*, 2(3), 529-536. <https://doi.org/10.1038/s41559-018-0470-1>
- Hindorff, L. A., Sethupathy, P., Junkins, H. A., Ramos, E. M., Mehta, J. P., Collins, F. S., & Manolio, T. A. (2009). Potential etiologic and functional implications of genome-wide association loci for human diseases and traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(23), 9362-9367. <https://doi.org/10.1073/pnas.0903103106>
- Hodgins, K. A., Lai, Z., Nurkowski, K., Huang, J., & Rieseberg, L. H. (2013). The molecular basis of invasiveness : Differences in gene expression of native and introduced common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) in stressful and benign environments. *Molecular Ecology*, 22(9), 2496-2510. <https://doi.org/10.1111/mec.12179>
- Hölzer, M., & Marz, M. (2019). De novo transcriptome assembly : A comprehensive cross-species comparison of short-read RNA-Seq assemblers. *GigaScience*, 8(5), giz039. <https://doi.org/10.1093/gigascience/giz039>
- HRAC global. Herbicide Resistance Action Committee. Consulté 10 janvier 2022, à l'adresse <https://hracglobal.com/>
- International Weed Genomics Consortium. Consulté 7 mars 2022, à l'adresse <https://www.weedgenomics.org/>
- Iwakami, S., Endo, M., Saika, H., Okuno, J., Nakamura, N., Yokoyama, M., Watanabe, H., Toki, S., Uchino, A., & Inamura, T. (2014). Cytochrome P450 CYP81A12 and CYP81A21 are associated

Références

- with resistance to two acetolactate synthase inhibitors in *Echinochloa phyllopogon*. *Plant Physiology*, *165*(2), 618-629. <https://doi.org/10.1104/pp.113.232843>
- Iwakami, S., Kamidate, Y., Yamaguchi, T., Ishizaka, M., Endo, M., Suda, H., Nagai, K., Sunohara, Y., Toki, S., Uchino, A., Tominaga, T., & Matsumoto, H. (2019). CYP81A P450s are involved in concomitant cross-resistance to acetolactate synthase and acetyl-CoA carboxylase herbicides in *Echinochloa phyllopogon*. *New Phytologist*, *221*(4), 2112-2122. <https://doi.org/10.1111/nph.15552>
- Iwakami, S., Uchino, A., Kataoka, Y., Shibaike, H., Watanabe, H., & Inamura, T. (2014). Cytochrome P450 genes induced by bispyribac-sodium treatment in a multiple-herbicide-resistant biotype of *Echinochloa phyllopogon*. *Pest Management Science*, *70*(4), 549-558. <https://doi.org/10.1002/ps.3572>
- Jasieniuk, M., Brûlé-Babel, A. L., & Morrison, I. N. (1996). The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Science*, *44*(1), 176-193. <https://doi.org/10.1017/S0043174500093747>
- Jeffers, G. M., O'Donovan, J. T., & Hall, L. M. (1996). Wild mustard (*Brassica kaber*) resistance to ethametsulfuron but not to other herbicides. *Weed Technology*, *10*(4), 847-850.
- Josephs, E. B., Stinchcombe, J. R., & Wright, S. I. (2017). What can genome-wide association studies tell us about the evolutionary forces maintaining genetic variation for quantitative traits? *New Phytologist*, *214*(1), 21-33. <https://doi.org/10.1111/nph.14410>
- Jugulam & Shyam. (2019). Non-target-site resistance to herbicides : Recent developments. *Plants*, *8*(10), 417. <https://doi.org/10.3390/plants8100417>
- Jump, A. S., Marchant, R., & Peñuelas, J. (2009). Environmental change and the option value of genetic diversity. *Trends in Plant Science*, *14*(1), 51-58. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.002>

Références

- Jung, S.-M., Le, D. T., Yoon, S.-S., Yoon, M.-Y., Kim, Y.-T., & Choi, J.-D. (2004). Amino acid residues conferring herbicide resistance in tobacco acetohydroxy acid synthase. *Biochemical Journal*, 383(1), 53-61. <https://doi.org/10.1042/BJ20040720>
- Karrer, G., & Pixner, T. (2012). *The contribution of post-harvest ripened ragweed seeds after cut for control*. 229.
- Kassambara, A., & Mundt, F. (2016). *Package « factoextra »* (1.0.3) [Computer software].
- Keith, B. K., Burns, E. E., Bothner, B., Carey, C. C., Mazurie, A. J., Hilmer, J. K., Biyiklioglu, S., Budak, H., & Dyer, W. E. (2017). Intensive herbicide use has selected for constitutively elevated levels of stress-responsive mRNAs and proteins in multiple herbicide-resistant *Avena fatua* L : Transcriptome and proteome of multiple herbicide-resistant *Avena fatua*. *Pest Management Science*, 73(11), 2267-2281. <https://doi.org/10.1002/ps.4605>
- Kiss, L., & Béres, I. (2006). Anthropogenic factors behind the recent population expansion of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.) in Eastern Europe : Is there a correlation with political transitions? *Journal of Biogeography*, 33(12), 2156-2157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01633.x>
- Knaus, B. J., & Grünwald, N. J. (2017). vcfr : A package to manipulate and visualize variant call format data in R. *Molecular Ecology Resources*, 17(1), 44-53. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12549>
- Knight, J. C. (2004). Allele-specific gene expression uncovered. *Trends in Genetics*, 20(3), 113-116. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2004.01.001>
- Koboldt, D. C., Zhang, Q., Larson, D. E., Shen, D., McLellan, M. D., Lin, L., Miller, C. A., Mardis, E. R., Ding, L., & Wilson, R. K. (2012). VarScan 2 : Somatic mutation and copy number alteration discovery in cancer by exome sequencing. *Genome Research*, 22(3), 568-576. <https://doi.org/10.1101/gr.129684.111>
- Kohlhase, D. R., O'Rourke, J. A., Owen, M. D. K., & Graham, M. A. (2019). Using RNA-seq to characterize responses to 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (HPPD) inhibitor herbicide

Références

- resistance in waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*). *BMC Plant Biology*, *19*(1), 182.
<https://doi.org/10.1186/s12870-019-1795-x>
- Kömives, T., Reisinger, P., & Bittsanszky, A. (2016). Control of common ragweed in ALS herbicide-resistant sunflower hybrids (*Helianthus annuus*). *Julius-Kühn-Archiv*, *455*, 154-158.
<https://doi.org/10.5073/jka.2016.455.32>
- Kreiner, J. M., Stinchcombe, J. R., & Wright, S. I. (2018). Population genomics of herbicide resistance : Adaptation via evolutionary rescue. *Annual Review of Plant Biology*, *69*(1), 611-635.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042817-040038>
- Kreiner, J. M., Tranel, P. J., Weigel, D., Stinchcombe, J. R., & Wright, S. I. (2021). The genetic architecture and population genomic signatures of glyphosate resistance in *Amaranthus tuberculatus*. *Molecular Ecology*, *30*(21), 5373-5389. <https://doi.org/10.1111/mec.15920>
- Kröel-Dulay, G., Csecserits, A., Szitár, K., Molnár, E., Szabó, R., Ónodi, G., & Botta-Dukát, Z. (2019). The potential of common ragweed for further spread : Invasibility of different habitats and the role of disturbances and propagule pressure. *Biological Invasions*, *21*(1), 137-149.
<https://doi.org/10.1007/s10530-018-1811-3>
- Kuhn, M. (2008). Building predictive models in R using the caret package. *Journal of Statistical Software*, *28*(5). <https://doi.org/10.18637/jss.v028.i05>
- Kukorelli, G., Reisinger, P., Torma, M., & Adamszki, T. (2011). Experiments with the control of common ragweed in imidazolinone-resistant and tribenuron-methyl resistant sunflower. *Herbologia*, *12*(2), 9.
- Kutasy, B., Farkas, Z., Kolics, B., Decsi, K., Hegedűs, G., Kovács, J., Taller, J., Tóth, Z., Kálmán, N., Kazinczi, G., & Virág, E. (2021). Detection of target-site herbicide resistance in the common ragweed : Nucleotide polymorphism genotyping by targeted amplicon sequencing. *Diversity*, *13*(3), 118. <https://doi.org/10.3390/d13030118>
- Laforest, M., Simard, M.-J., Meloche, S., Maheux, L., Tardif, F., & Page, E. (2022). Cross-resistance to photosystem II inhibitors observed in target site resistant but not in non-target site resistant

Références

- common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). *Weed Science*, 1-19.
<https://doi.org/10.1017/wsc.2021.78>
- Laforest, M., Soufiane, B., Patterson, E. L., Vargas, J. J., Boggess, S. L., Houston, L. C., Trigiano, R. N., & Brosnan, J. T. (2021). Differential expression of genes associated with non-target site resistance in *Poa annua* with target site resistance to acetolactate synthase inhibitors. *Pest Management Science*, 77(11), 4993-5000. <https://doi.org/10.1002/ps.6541>
- Laine, A.-L. (2004). Resistance variation within and among host populations in a plant-pathogen metapopulation : Implications for regional pathogen dynamics. *Journal of Ecology*, 92(6), 990-1000. <https://doi.org/10.1111/j.0022-0477.2004.00925.x>
- Lamichhane, J. R., Devos, Y., Beckie, H. J., Owen, M. D. K., Tillie, P., Messéan, A., & Kudsk, P. (2017). Integrated weed management systems with herbicide-tolerant crops in the European Union : Lessons learnt from home and abroad. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(4), 459-475.
<https://doi.org/10.1080/07388551.2016.1180588>
- Larran, A. S., Palmieri, V. E., Tuesca, D., Permingeat, H. R., & Perotti, V. E. (2022). Coexistence of target-site and non-target-site mechanisms of glyphosate resistance in *Amaranthus palmeri* populations from Argentina. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 44, e55183-e55183.
<https://doi.org/10.4025/actasciagron.v44i1.55183>
- Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR : An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, 25(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- LeClere, S., Wu, C., Westra, P., & Sammons, R. D. (2018). Cross-resistance to dicamba, 2,4-D, and fluroxypyr in *Kochia scoparia* is endowed by a mutation in an AUX/IAA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 115(13), E2911-E2920.
<https://doi.org/10.1073/pnas.1712372115>
- Lemke, A., Kowarik, I., & Lippe, M. (2019). How traffic facilitates population expansion of invasive species along roads : The case of common ragweed in Germany. *Journal of Applied Ecology*, 56(2), 413-422. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13287>

Références

- Leslie, T., & Baucom, R. S. (2014). *De Novo* assembly and annotation of the transcriptome of the agricultural weed *Ipomoea purpurea* uncovers gene expression changes associated with herbicide resistance. *G3 Genes/Genomes/Genetics*, *4*(10), 2035-2047.
<https://doi.org/10.1534/g3.114.013508>
- Lewis, A. J. (1973). Ragweed control techniques : Effect on old-field plant populations. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, *100*(6), 333-338. <https://doi.org/10.2307/2484099>
- Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics (Oxford, England)*, *25*(14), 1754-1760.
<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324>
- Liu, W., Bai, S., Zhao, N., Jia, S., Li, W., Zhang, L., & Wang, J. (2018). Non-target site-based resistance to tribenuron-methyl and essential involved genes in *Myosoton aquaticum* (L.). *BMC Plant Biology*, *18*(1), 225. <https://doi.org/10.1186/s12870-018-1451-x>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2ddCT method. *Methods*, *25*(4), 402-408.
<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Loubet, I., Caddoux, L., Fontaine, S., Michel, S., Pernin, F., Barrès, B., Le Corre, V., & Délye, C. (2021). A high diversity of mechanisms endows ALS-inhibiting herbicide resistance in the invasive common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.). *Scientific Reports*, *11*(1), 19904.
<https://doi.org/10.1038/s41598-021-99306-9>
- Loubet, I., Pernin, F., Fontaine, S., Caddoux, L., Barrès, B., Le Corre, V., & Délye, C. (2020). Résistance aux phytos : Le diagnostic passe au haut débit. *Phytoma*, *735*, 34-38.
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, *15*(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

Références

- Lu, Y. C., Feng, S. J., Zhang, J. J., Luo, F., Zhang, S., & Yang, H. (2016). Genome-wide identification of DNA methylation provides insights into the association of gene expression in rice exposed to pesticide atrazine. *Scientific Reports*, *6*(1), 18985. <https://doi.org/10.1038/srep18985>
- M. Perez-de-Castro, A., Vilanova, S., Canizares, J., Pascual, L., M. Blanca, J., J. Diez, M., Prohens, J., & Pico, B. (2012). Application of genomic tools in plant breeding. *Current Genomics*, *13*(3), 179-195. <https://doi.org/10.2174/138920212800543084>
- Makra, L., Matyasovszky, I., Hufnagel, L., & Tusnady, G. (2015). The history of ragweed in the world. *Applied Ecology and Environmental Research*, *13*(2). https://doi.org/10.15666/aeer/1302_489512
- Mallory-Smith, C. A., Thill, D. C., & Dial, M. J. (1990). Identification of sulfonylurea herbicide-resistant Prickly Lettuce (*Lactuca serriola*). *Weed Technology*, *4*(1), 163-168. <https://doi.org/10.1017/S0890037X00025173>
- Manabe, Y., Tinker, N., Colville, A., & Miki, B. (2007). CSR1, the sole target of imidazolinone herbicide in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, *48*(9), 1340-1358. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcm105>
- Manley, B. S., Hatzios, K. K., & Wilson, H. P. (1999). Absorption, translocation, and metabolism of chlorimuron and nicosulfuron in imidazolinone-resistant and susceptible smooth pigweed (*Amaranthus hybridus*). *Weed Technology*, *13*(4), 759-764.
- Mantle, P. G., & Shaw, S. (1977). A case study of the aetiology of ergot disease of cereals and grasses. *Plant Pathology*, *26*(3), 121-126. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1977.tb01041.x>
- Margaritopoulou, T., Tani, E., Chachalis, D., & Travlos, I. (2018). Involvement of epigenetic mechanisms in herbicide resistance : The case of *Conyza canadensis*. *Agriculture*, *8*(1), 17. <https://doi.org/10.3390/agriculture8010017>
- Markus, C., Pecinka, A., Karan, R., Barney, J. N., & Merotto, A. (2018). Epigenetic regulation—Contribution to herbicide resistance in weeds? *Pest Management Science*, *74*(2), 275-281. <https://doi.org/10.1002/ps.4727>

Références

- Maroli, A. S., Gaines, T. A., Foley, M. E., Duke, S. O., Dođramacı, M., Anderson, J. V., Horvath, D. P., Chao, W. S., & Tharayil, N. (2018). Omics in weed science : A perspective from genomics, transcriptomics, and metabolomics approaches. *Weed Science*, *66*(6), 681-695.
<https://doi.org/10.1017/wsc.2018.33>
- Martin, M. D., Chamecki, M., & Brush, G. S. (2010). Anthesis synchronization and floral morphology determine diurnal patterns of ragweed pollen dispersal. *Agricultural and Forest Meteorology*, *150*(9), 1307-1317.
- Martin, M. D., Olsen, M. T., Samaniego, J. A., Zimmer, E. A., & Gilbert, M. T. P. (2016). The population genomic basis of geographic differentiation in North American common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia* L.). *Ecology and Evolution*, *6*(11), 3760-3771.
<https://doi.org/10.1002/ece3.2143>
- Martin, M. D., Zimmer, E. A., Olsen, M. T., Foote, A. D., Gilbert, M. T. P., & Brush, G. S. (2014). Herbarium specimens reveal a historical shift in phylogeographic structure of common ragweed during native range disturbance. *Molecular Ecology*, *23*(7), 1701-1716.
<https://doi.org/10.1111/mec.12675>
- Matzrafi, M., Seiwert, B., Reemtsma, T., Rubin, B., & Peleg, Z. (2016). Climate change increases the risk of herbicide-resistant weeds due to enhanced detoxification. *Planta*, *244*(6), 1217-1227.
<https://doi.org/10.1007/s00425-016-2577-4>
- McGoey, B. V., & Stinchcombe, J. R. (2021). Introduced populations of ragweed show as much evolutionary potential as native populations. *Evolutionary Applications*, *14*(5), 1436-1449.
<https://doi.org/10.1111/eva.13211>
- Mengistu, L. W., Messersmith, C. G., & Christoffers, M. J. (2003). Diversity of herbicide resistance among wild oat sampled 36 yr apart. *Weed Science*, *51*(5), 764-773.
[https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2003\)051\[0764:DOHRAW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2003)051[0764:DOHRAW]2.0.CO;2)

Références

- Messer, P. W., & Petrov, D. A. (2013). Population genomics of rapid adaptation by soft selective sweeps. *Trends in Ecology & Evolution*, 28(11), 659-669.
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2013.08.003>
- Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies—The next generation. *Nature Reviews Genetics*, 11(1), 31-46. <https://doi.org/10.1038/nrg2626>
- Meyer, L. (2018). *The annual ragweeds (Ambrosia artemisiifolia L. - Ambrosia trifida L.) : Adaptive response to chemical weeding & population genetics in agricultural environments*. Université Bourgogne Franche-Comté.
- Meyer, L., Causse, R., Pernin, F., Scalone, R., Bailly, G., Chauvel, B., Délye, C., & Le Corre, V. (2017). New gSSR and EST-SSR markers reveal high genetic diversity in the invasive plant *Ambrosia artemisiifolia* L. and can be transferred to other invasive *Ambrosia* species. *PLOS ONE*, 12(5), e0176197. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176197>
- Meyer, L., Pernin, F., Michel, S., Bailly, G., Chauvel, B., Le Corre, V., & Délye, C. (2022). Lab meets field : Accelerated selection and field monitoring concur that non-target-site-based resistance evolves first in the dicotyledonous, allergenic weed *Ambrosia artemisiifolia*. *Plant Science*, 111202. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2022.111202>
- Milani, A., Lutz, U., Galla, G., Scarabel, L., Weigel, D., & Sattin, M. (2021). Population structure and evolution of resistance to acetolactate synthase (ALS)-inhibitors in *Amaranthus tuberculatus* in Italy. *Pest Management Science*, 77(6), 2971-2980. <https://doi.org/10.1002/ps.6336>
- Ministère de la transition écologique. (2020). *Eau et milieux aquatiques—Les chiffres clés—Édition 2020* (p. 128).
- Mouttet, R., Augustinus, B., Bonini, M., Chauvel, B., Desneux, N., Gachet, E., Le Bourgeois, T., Müller-Schärer, H., Thibaudon, M., & Schaffner, U. (2018). Estimating economic benefits of biological control of *Ambrosia artemisiifolia* by *Ophraella communa* in southeastern France. *Basic and Applied Ecology*, 33, 14-24. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2018.08.002>

Références

- Murphy, B. P., Beffa, R., & Tranel, P. J. (2021). Genetic architecture underlying HPPD-inhibitor resistance in a Nebraska *Amaranthus tuberculatus* population. *Pest Management Science*, 77(11), 4884-4891. <https://doi.org/10.1002/ps.6560>
- Mutch, D. R., Martin, T. E., & Kosola, K. R. (2003). Red clover (*Trifolium pratense*) suppression of common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) in winter wheat (*Triticum aestivum*). *Weed Technology*, 17(1), 181-185. [https://doi.org/10.1614/0890-037X\(2003\)017\[0181:RCTPSO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0890-037X(2003)017[0181:RCTPSO]2.0.CO;2)
- Nadeem, M. A., Nawaz, M. A., Shahid, M. Q., Doğan, Y., Comertpay, G., Yıldız, M., Hatipoğlu, R., Ahmad, F., Alsaleh, A., Labhane, N., Özkan, H., Chung, G., & Baloch, F. S. (2018). DNA molecular markers in plant breeding : Current status and recent advancements in genomic selection and genome editing. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 32(2), 261-285. <https://doi.org/10.1080/13102818.2017.1400401>
- Nakka, S., Thompson, C. R., Peterson, D. E., & Jugulam, M. (2017). Target site-based and non-target site based resistance to ALS inhibitors in palmer amaranth (*Amaranthus palmeri*). *Weed Science*, 65(6), 681-689. <https://doi.org/10.1017/wsc.2017.43>
- Nandula, V. K., Ray, J. D., Ribeiro, D. N., Pan, Z., & Reddy, K. N. (2013). Glyphosate resistance in tall waterhemp (*Amaranthus tuberculatus*) from Mississippi is due to both altered target-site and non-target-site mechanisms. *Weed Science*, 61(3), 374-383. <https://doi.org/10.1614/WS-D-12-00155.1>
- Nardemir, G., Agar, G., Arslan, E., & Aygun Erturk, F. (2015). Determination of genetic and epigenetic effects of glyphosate on *Triticum aestivum* with RAPD and CRED-RA techniques. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 27(2), 131-139. <https://doi.org/10.1007/s40626-015-0039-1>
- Neff, M. M., Neff, J. D., Chory, J., & Pepper, A. E. (1998). dCAPS, a simple technique for the genetic analysis of single nucleotide polymorphisms : Experimental applications in *Arabidopsis*

Références

- thaliana* genetics. *The Plant Journal*, 14(3), 387-392. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1998.00124.x>
- Nelson, D., & Werck-Reichhart, D. (2011). A P450-centric view of plant evolution. *Plant Journal*, 66(1), 194-211. Scopus. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04529.x>
- Neve, P., Busi, R., Renton, M., & Vila-Aiub, M. M. (2014). Expanding the eco-evolutionary context of herbicide resistance research. *Pest Management Science*, 70(9), 1385-1393. <https://doi.org/10.1002/ps.3757>
- Neve, P., Vila-Aiub, M., & Roux, F. (2009). Evolutionary-thinking in agricultural weed management. *New Phytologist*, 184(4), 783-793. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03034.x>
- Nie, H., Mansfield, B. C., Harre, N. T., Young, J. M., Steppig, N. R., & Young, B. G. (2019). Investigating target-site resistance mechanism to the PPO-inhibiting herbicide fomesafen in waterhemp and interspecific hybridization of *Amaranthus* species using next generation sequencing. *Pest Management Science*, 75(12), 3235-3244. <https://doi.org/10.1002/ps.5445>
- Observatoire des ambrosies*. Observatoire des ambrosies. Consulté 7 janvier 2022, à l'adresse <https://ambrosie-risque.info/>
- Oerke, E.-C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43. <https://doi.org/10.1017/S0021859605005708>
- Oettmeier, W. (1999). Herbicide resistance and supersensitivity in photosystem II. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(10), 1255-1277. <https://doi.org/10.1007/s000180050370>
- Ohkawa, H., & Inui, H. (2015). Metabolism of agrochemicals and related environmental chemicals based on cytochrome P450s in mammals and plants. *Pest Management Science*, 71(6), 824-828. <https://doi.org/10.1002/ps.3871>
- Palumbi, S. R. (2001). Humans as the world's greatest evolutionary force. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.293.5536.1786>

Références

- Pan, L., Gao, H., Xia, W., Zhang, T., & Dong, L. (2016). Establishing a herbicide-metabolizing enzyme library in *Beckmannia syzigachne* to identify genes associated with metabolic resistance. *Journal of Experimental Botany*, *67*(6), 1745-1757. <https://doi.org/10.1093/jxb/erv565>
- Pan, L., Guo, Q., Wang, J., Shi, L., Yang, X., Zhou, Y., Yu, Q., & Bai, L. (2022). CYP81A68 confers metabolic resistance to ALS and ACCase-inhibiting herbicides and its epigenetic regulation in *Echinochloa crus-galli*. *Journal of Hazardous Materials*, *428*, 128225. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2022.128225>
- Pan, L., Yu, Q., Wang, J., Han, H., Mao, L., Nyporko, A., Maguza, A., Fan, L., Bai, L., & Powles, S. (2021). An ABCG-type transporter endowing glyphosate resistance in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *118*(16), e2100136118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2100136118>
- Panozzo, S., Scarabel, L., Tranel, P. J., & Sattin, M. (2013). Target-site resistance to ALS inhibitors in the polyploid species *Echinochloa crus-galli*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *105*(2), 93-101. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.12.003>
- Paquin, V., & Aarssen, L. W. (2004). Allometric gender allocation in *Ambrosia artemisiifolia* (Asteraceae) has adaptive plasticity. *American Journal of Botany*, *91*(3), 430-438. <https://doi.org/10.3732/ajb.91.3.430>
- Parrish, J. (2015). *Investigations into Multiple-Herbicide-Resistant Ambrosia artemisiifolia (Common Ragweed) in Ohio and Glyphosate-Resistance Mechanisms* [dissertation].
- Patterson, E. L., Saski, C., Küpper, A., Beffa, R., & Gaines, T. A. (2019). Omics potential in herbicide-resistant weed management. *Plants*, *8*(12), 607. <https://doi.org/10.3390/plants8120607>
- Patzoldt, W. L., Tranel, P. J., Alexander, A. L., & Schmitzer, P. R. (2001). A common ragweed population resistant to cloransulam-methyl. *Weed Science*, *49*(4), 485-490. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2001\)049\[0485:ACRPRT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2001)049[0485:ACRPRT]2.0.CO;2)

Références

- Payne, W. W. (1963). The morphology of the inflorescence of ragweeds (*Ambrosia-franseria* : *Compositae*). *American Journal of Botany*, *50*(9), 872-880. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1963.tb06566.x>
- Perkins, J. R., Dawes, J. M., McMahon, S. B., Bennett, D. L., Orengo, C., & Kohl, M. (2012). ReadqPCR and NormqPCR : R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data. *BMC Genomics*, *13*(1), 296. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-296>
- Peters, B., & Streck, H. J. (2018). Herbicide discovery in light of rapidly spreading resistance and ever-increasing regulatory hurdles. *Pest Management Science*, *74*(10), 2211-2215. <https://doi.org/10.1002/ps.4768>
- Petit, C., Pernin, F., Heydel, J.-M., & Délye, C. (2012). Validation of a set of reference genes to study response to herbicide stress in grasses. *BMC Research Notes*. <https://doi.org/doi:10.1186/1756-0500-5-18>
- Piasecki, C., Carvalho, I. R., Cechin, J., Goulart, F. A. P., Maia, L. C. da, Agostinetto, D., Caverzan, A., Stewart Jr., C. N., & Vargas, L. (2019). Oxidative stress and differential antioxidant enzyme activity in glyphosate-resistant and -sensitive hairy fleabane in response to glyphosate treatment. *Bragantia*, *78*(3), 379-396. <https://doi.org/10.1590/1678-4499.20180289>
- Piasecki, C., Yang, Y., Benemann, D. P., Kremer, F. S., Galli, V., Millwood, R. J., Cechin, J., Agostinetto, D., Maia, L. C., Vargas, L., & Stewart, C. N. (2019). Transcriptomic analysis identifies new non-target site glyphosate-resistance genes in *Conyza bonariensis*. *Plants*, *8*(6), 157. <https://doi.org/10.3390/plants8060157>
- Pioneer*. Consulté 10 janvier 2022, à l'adresse <http://www.france.pioneer.com/>
- Piskol, R., Ramaswami, G., & Li, J. B. (2013). Reliable identification of genomic variants from RNA-Seq data. *The American Journal of Human Genetics*, *93*(4), 641-651. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.08.008>

Références

- Powles, S. B., & Yu, Q. (2010). Evolution in action : Plants resistant to herbicides. *Annual Review of Plant Biology*, 61(1), 317-347. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042809-112119>
- Published plant genomes*. Consulté 9 mars 2022, à l'adresse https://www.plabipd.de/timeline_view.ep
- Purcell, S., Neale, B., Todd-Brown, K., Thomas, L., Ferreira, M. A. R., Bender, D., Maller, J., Sklar, P., de Bakker, P. I. W., Daly, M. J., & Sham, P. C. (2007). PLINK : A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *American Journal of Human Genetics*, 81(3), 559-575.
- Quevillon, E., Silventoinen, V., Pillai, S., Harte, N., Mulder, N., Apweiler, R., & Lopez, R. (2005). InterProScan : Protein domains identifier. *Nucleic Acids Research*, 33(suppl_2), W116-W120. <https://doi.org/10.1093/nar/gki442>
- R Core Team* (v4.1.0). (2021). [Computer software].
- R4P – Réseau de Réflexion et de Recherches sur les Résistances aux Pesticides*. Consulté 6 février 2022, à l'adresse <https://www.r4p-inra.fr/fr/home/>
- R4P Network. (2016). Trends and challenges in pesticide resistance detection. *Trends in Plant Science*, 21(10), 834-853. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.06.006>
- Ravet, K., Patterson, E. L., Krähmer, H., Hamouzová, K., Fan, L., Jasieniuk, M., Lawton-Rauh, A., Malone, J. M., McElroy, J. S., Merotto Jr, A., Westra, P., Preston, C., Vila-Aiub, M. M., Busi, R., Tranel, P. J., Reinhardt, C., Sasaki, C., Beffa, R., Neve, P., & Gaines, T. A. (2018). The power and potential of genomics in weed biology and management. *Pest Management Science*, 74(10), 2216-2225. <https://doi.org/10.1002/ps.5048>
- Reisinger, P., Kukorelli, G., Bittsanszky, A., & Komives, T. (2014). Minireview : Importance of herbicide-tolerant sunflower hybrids in suppressing common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) pollen production. *EQA - International Journal of Environmental Quality*, 31-37 Pages. <https://doi.org/10.6092/ISSN.2281-4485/4247>

Références

- Rentería, M. E., Cortes, A., & Medland, S. E. (2013). Using PLINK for Genome-Wide Association Studies (GWAS) and data analysis. In C. Gondro, J. van der Werf, & B. Hayes (Éds.), *Genome-Wide Association Studies and Genomic Prediction* (p. 193-213). Humana Press.
https://doi.org/10.1007/978-1-62703-447-0_8
- Risch, N., & Merikangas, K. (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science*, *273*(5281), 1516-1517. <https://doi.org/10.1126/science.273.5281.1516>
- Risso, D., Schwartz, K., Sherlock, G., & Dudoit, S. (2011). GC-content normalization for RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*, *12*(1), 480. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-480>
- Rojano-Delgado, A. M., Portugal, J. M., Palma-Bautista, C., Alcántara-de la Cruz, R., Torra, J., Alcántara, E., & De Prado, R. (2019). Target site as the main mechanism of resistance to imazamox in a *Euphorbia heterophylla* biotype. *Scientific Reports*, *9*(1), 15423.
<https://doi.org/10.1038/s41598-019-51682-z>
- Rousonelos, S. L., Lee, R. M., Moreira, M. S., VanGessel, M. J., & Tranel, P. J. (2012). Characterization of a common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) population resistant to ALS- and PPO-inhibiting herbicides. *Weed Science*, *60*(3), 335-344. <https://doi.org/10.1614/WS-D-11-00152.1>
- Ryan, G. F. (1970). Resistance of common groundsel to simazine and atrazine. *Weed Science*, *18*(5), 614-616. <https://doi.org/10.1017/S0043174500034330>
- Sala, C. A., Bulos, M., Altieri, E., & Ramos, M. L. (2012). Genetics and breeding of herbicide tolerance in sunflower. *Helia*, *35*(57), 57-69. <https://doi.org/10.2298/HEL1257057S>
- Salas-Perez, R. A., Sasaki, C. A., Noorai, R. E., Srivastava, S. K., Lawton-Rauh, A. L., Nichols, R. L., & Roma-Burgos, N. (2018). RNA-Seq transcriptome analysis of *Amaranthus palmeri* with differential tolerance to glufosinate herbicide. *PLOS ONE*, *13*(4), e0195488.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195488>

Références

- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 74(12), 5463-5467.
- Scarabel, L., Pernin, F., & Délye, C. (2015). Occurrence, genetic control and evolution of non-target-site based resistance to herbicides inhibiting acetolactate synthase (ALS) in the dicot weed *Papaver rhoeas*. *Plant Science*, 238, 158-169. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2015.06.008>
- Schwarzenbach, R. P., Egli, T., Hofstetter, T. B., von Gunten, U., & Wehrli, B. (2010). Global water pollution and human health. *Annual Review of Environment and Resources*, 35(1), 109-136. <https://doi.org/10.1146/annurev-environ-100809-125342>
- Sen, M. K., Hamouzová, K., Mikulka, J., Bharati, R., Košnarová, P., Hamouz, P., Roy, A., & Soukup, J. (2021). Enhanced metabolism and target gene overexpression confer resistance against acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Bromus sterilis*. *Pest Management Science*, 77(4), 2122-2128. <https://doi.org/10.1002/ps.6241>
- Shalem, O., Dahan, O., Levo, M., Martinez, M. R., Furman, I., Segal, E., & Pilpel, Y. (2008). Transient transcriptional responses to stress are generated by opposing effects of mRNA production and degradation. *Molecular Systems Biology*, 4(1), 4. <https://doi.org/10.1038/msb.2008.59>
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO : Assessing genome assembly and annotation completeness with single-copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210-3212. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv351>
- Simard, M.-J., Laforest, M., Soufiane, B., Benoit, D. L., & Tardif, F. (2017). Linuron resistant common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) populations in Quebec carrot fields : Presence and distribution of target-site and non-target site resistant biotypes. *Canadian Journal of Plant Science*, 98, 345-352. <https://doi.org/10.1139/CJPS-2017-0163>
- Simard, M.-J., Nurse, R. E., Page, E. R., & Bourgeois, G. (2020). Common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*) seed shattering in wheat, corn, and soybean. *Weed Science*, 68(5), 510-516. <https://doi.org/10.1017/wsc.2020.51>

Références

- Siminszky, B. (2006). Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochemistry Reviews*, 5(2), 445-458. <https://doi.org/10.1007/s11101-006-9011-7>
- Sleugh, B. B., Wright, T. R., Salas, M., Simpson, D. M., Schmitzer, P. R., Morell, M., & Saunders, D. W. (2021). Corteva Agriscience's perspective and commitment to managing herbicide resistance. *Pest Management Science*, 77(4), 1572-1577. <https://doi.org/10.1002/ps.6214>
- Smith, J. M., & Haigh, J. (1974). The hitch-hiking effect of a favourable gene. *Genetics Research*, 23(1), 23-35. <https://doi.org/10.1017/S0016672300014634>
- Smith, M., Cecchi, L., Skjøth, C. A., Karrer, G., & Šikoparija, B. (2013). Common ragweed : A threat to environmental health in Europe. *Environment International*, 61, 115-126. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2013.08.005>
- Sriramarao, P., & Rao, P. V. (1993). Allergenic cross-reactivity between Parthenium and ragweed pollen allergens. *International Archives of Allergy and Immunology*, 100(1), 79-85. <https://doi.org/10.1159/000236391>
- Streit, L. (2012). *DuPont™ ExpressSun™ Herbicide Technology in Sunflower*. 7.
- Switzer, C. M. (1957). *The existence of 2,4-D resistant strains of wild carrot*. 11, 315-318. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10030280265/>
- Tan, S., Evans, R. R., Dahmer, M. L., Singh, B. K., & Shaner, D. L. (2005). Imidazolinone-tolerant crops : History, current status and future. *Pest Management Science*, 61(3), 246-257. <https://doi.org/10.1002/ps.993>
- Tamarcaz, P., Lambelet, B., Clot, B., Keimer, C., & Hauser, C. (2005). Ragweed (*Ambrosia*) progression and its health risks : Will Switzerland resist this invasion? *Swiss Medical Weekly*, 135(37-38), 538-548. <https://doi.org/2005/37/smw-11201>
- Tehranchian, P., Nandula, V. K., Matzrafi, M., & Jasieniuk, M. (2019). Multiple herbicide resistance in California Italian ryegrass (*Lolium perenne* ssp. *Multiflorum*) : Characterization of ALS-inhibiting herbicide resistance. *Weed Science*, 67(3), 273-280. <https://doi.org/10.1017/wsc.2019.1>

Références

The Plant List. Consulté 7 janvier 2022, à l'adresse

<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Ambrosia>

- Torra, J., Montull, J. M., Taberner, A., Onkokesung, N., Boonham, N., & Edwards, R. (2021). Target-site and non-target-site resistance mechanisms confer multiple and cross-resistance to ALS and ACCase inhibiting herbicides in *Lolium rigidum* from Spain. *Frontiers in Plant Science*, *12*, 88. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.625138>
- Torra, J., Rojano-Delgado, A. M., Menéndez, J., Salas, M., & de Prado, R. (2021). Cytochrome P450 metabolism-based herbicide resistance to imazamox and 2,4-D in *Papaver rhoeas*. *Plant Physiology and Biochemistry*, *160*, 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.01.007>
- Tranel, P. J., Jiang, W., Patzoldt, W. L., & Wright, T. R. (2004). Intraspecific variability of the acetolactate synthase gene. *Weed Science*, *52*(2), 236-241. <https://doi.org/10.1614/WS-03-100R>
- Tranel, P. J., & Wright, T. R. (2002). Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides : What have we learned? *Weed Science*, *50*(6), 700-712. [https://doi.org/10.1614/0043-1745\(2002\)050\[0700:RROWTA\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1614/0043-1745(2002)050[0700:RROWTA]2.0.CO;2)
- Tranel, P. J., Wright, T. R., & Heap, I. M. (2021). *ALS mutations from resistant weeds*. <http://www.weedscience.com>
- Trezzi, M. M., Alcántara-de la Cruz, R., Rojano-Delgado, A. M., Alcántara, E., Pagnoncelli, F. D. B., Viecelli, M., Diesel, F., Pacheco, V., & De Prado, R. (2021). Influence of temperature on the retention, absorption and translocation of fomesafen and imazamox in *Euphorbia heterophylla*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *173*, 104794. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2021.104794>
- Triest, L., Van De Vijver, M., & Symoens, J. J. (1989). Polymorphism and electrophoretic patterns in *Ambrosia maritima* L., *A. Artemisiifolia* L. and *A. Trifida* L. (Asteraceae). *Plant Science*, *59*(2), 211-218. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(89\)90139-8](https://doi.org/10.1016/0168-9452(89)90139-8)

Références

- Tsaftaris, A. (1996). The development of herbicide-tolerant transgenic crops. *Field Crops Research*, 45(1), 115-123. [https://doi.org/10.1016/0378-4290\(95\)00064-X](https://doi.org/10.1016/0378-4290(95)00064-X)
- Utilisation de variétés rendues tolérantes aux herbicides cultivées en France, Avis de l'Anses (Avis N° 2015-SA-0063; p. 254).* (2020). Anses. <https://www.anses.fr/fr/system/files/UPO2015SA0063Ra.pdf>
- Van Boheemen, L. A., Lombaert, E., Nurkowski, K. A., Gauffre, B., Rieseberg, L. H., & Hodgins, K. A. (2017). Multiple introductions, admixture and bridgehead invasion characterize the introduction history of *Ambrosia artemisiifolia* in Europe and Australia. *Molecular Ecology*, 26, 5421-5434. <https://doi.org/10.1111/mec.14293>
- Van Etten, M., Lee, K. M., Chang, S.-M., & Baucom, R. S. (2020). Parallel and nonparallel genomic responses contribute to herbicide resistance in *Ipomoea purpurea*, a common agricultural weed. *PLOS Genetics*, 16(2), e1008593. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008593>
- Vandesompele, J., Preter, K. D., Roy, N. V., & Paepe, A. D. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 12. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-3-7-research0034>
- Veldhuis, L. J., Hall, L. M., O'Donovan, J. T., Dyer, W., & Hall, J. C. (2000). Metabolism-based resistance of a wild mustard (*Sinapis arvensis* L.) biotype to Ethametsulfuron-methyl. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2986-2990. <https://doi.org/10.1021/jf990752g>
- Vencill, W. K., Nichols, R. L., Webster, T. M., Soteres, J. K., Mallory-Smith, C., Burgos, N. R., Johnson, W. G., & McClelland, M. R. (2012). Herbicide resistance : Toward an understanding of resistance development and the impact of herbicide-resistant crops. *Weed Science*, 60(SP1), 2-30. <https://doi.org/10.1614/WS-D-11-00206.1>
- Vitalos, M., & Karrer, G. (2009). Dispersal of *Ambrosia artemisiifolia* seeds along roads : The contribution of traffic and mowing machines. *Neobiota*, 8, 53-60.
- Wang, J., Cao, W., Guo, Q., Yang, Y., Bai, L., & Pan, L. (2022). Resistance to mesosulfuron-methyl in *Beckmannia syzigachne* may involve ROS burst and non-target-site resistance mechanisms.

Références

- Ecotoxicology and Environmental Safety*, 229, 113072.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2021.113072>
- Wang, J., Chen, J., Li, X., & Cui, H. (2021). RNA-Seq transcriptome analysis to identify candidate genes involved in non-target site-based mesosulfuron-methyl resistance in *Beckmannia syzigachne*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 171, 104738.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2020.104738>
- Weaver, S. E. (2001). Impact of lamb's-quarters, common ragweed and green foxtail on yield of corn and soybean in Ontario. *Canadian Journal of Plant Science*, 81(4), 821-828.
<https://doi.org/10.4141/P01-057>
- Weill, A., Cloutier, D., Leblanc, M., & Duval, J. (2007). Moyens de lutte à l'herbe à poux (*Ambrosia artemisiifolia* L.) en culture de soya sans herbicide. *Bio-Action*, 8.
- Werck-Reichhart, D., & Feyereisen, R. (2000). Cytochromes P450 : A success story. *Genome Biology*, 1(6), reviews3003.1-reviews3003.9.
- Whitehead, A., & Crawford, D. L. (2006). Neutral and adaptive variation in gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(14), 5425-5430.
<https://doi.org/10.1073/pnas.0507648103>
- Wickham, H. (2016). *ggplot2 : Elegant Graphics for Data Analysis* (2nd ed. 2016). Springer International Publishing : Imprint: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-24277-4>
- Willemsen, R. W. (1975). Effect of stratification temperature and germination temperature on germination and the induction of secondary dormancy in common ragweed seeds. *American Journal of Botany*, 62(1), 1-5. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1975.tb12333.x>
- Wright, A. A., Rodriguez-Carres, M., Sasidharan, R., Koski, L., Peterson, D. G., Nandula, V. K., Ray, J. D., Bond, J. A., & Shaw, D. R. (2018). Multiple herbicide-resistant junglerice (*Echinochloa colona*) : Identification of genes potentially involved in resistance through differential gene expression analysis. *Weed Science*, 66(3), 347-354. <https://doi.org/10.1017/wsc.2018.10>

Références

- Wright, A. A., Sasidharan, R., Koski, L., Rodriguez-Carres, M., Peterson, D. G., Nandula, V. K., Ray, J. D., Bond, J. A., & Shaw, D. R. (2018). Transcriptomic changes in *Echinochloa colona* in response to treatment with the herbicide imazamox. *Planta*, *247*(2), 369-379.
<https://doi.org/10.1007/s00425-017-2784-7>
- WSSA. (2016). *WSSA-Weed Science Definitions*. <https://wssa.net/wp-content/uploads/WSSA-Weed-Science-Definitions.pdf>
- Xiang, W., Wang, X., & Ren, T. (2006). Expression of a wheat cytochrome P450 monooxygenase cDNA in yeast catalyzes the metabolism of sulfonylurea herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *85*(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2005.09.001>
- Yan, B., Zhang, Y., Li, J., Fang, J., Liu, T., & Dong, L. (2019). Transcriptome profiling to identify cytochrome P450 genes involved in penoxsulam resistance in *Echinochloa glabrescens*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *158*, 112-120.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2019.04.017>
- Yang, Q., Deng, W., Li, X., Yu, Q., Bai, L., & Zheng, M. (2016). Target-site and non-target-site based resistance to the herbicide tribenuron-methyl in flaxweed (*Descurainia sophia* L.). *BMC Genomics*, *17*(1), 551. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2915-8>
- Yang, Q., Li, J., Shen, J., Xu, Y., Liu, H., Deng, W., Li, X., & Zheng, M. (2018). Metabolic Resistance to Acetolactate Synthase Inhibiting Herbicide Tribenuron-Methyl in *Descurainia sophia* L. Mediated by Cytochrome P450 Enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *66*(17), 4319-4327. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05825>
- Yang, X., Yu, X.-Y., & Li, Y.-F. (2013). De novo assembly and characterization of the Barnyardgrass (*Echinochloa crus-galli*) transcriptome using next-generation pyrosequencing. *PLoS ONE*, *8*(7), e69168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069168>
- Yang, Y., Gardner, C., Gupta, P., Peng, Y., Piasecki, C., Millwood, R. J., Ahn, T.-H., & Stewart, C. N. (2021). Novel candidate genes differentially expressed in glyphosate-treated Horseweed (*Conyza canadensis*). *Genes*, *12*(10), 1616. <https://doi.org/10.3390/genes12101616>

Références

- Yasuor, H., Milan, M., Eckert, J. W., & Fischer, A. J. (2012). Quinclorac resistance : A concerted hormonal and enzymatic effort in *Echinochloa phyllopogon*. *Pest Management Science*, *68*(1), 108-115. <https://doi.org/10.1002/ps.2230>
- Yu, Q., Abdallah, I., Han, H., Owen, M., & Powles, S. (2009). Distinct non-target site mechanisms endow resistance to glyphosate, ACCase and ALS-inhibiting herbicides in multiple herbicide-resistant *Lolium rigidum*. *Planta*, *230*(4), 713-723. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-0981-8>
- Yu, Q., Nelson, J. K., Zheng, M. Q., Jackson, J., & Powles, S. B. (2007). Molecular characterisation of resistance to ALS-inhibiting herbicides in *Hordeum leporinum* biotypes. *Pest Management Science*, *63*, 918-927. <https://doi.org/10.1002/ps.1429>
- Yu, Q., & Powles, S. (2014a). Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds : A threat to herbicide sustainability and global crop production. *Plant Physiology*, *166*(3), 1106-1118. <https://doi.org/10.1104/pp.114.242750>
- Yu, Q., & Powles, S. B. (2014b). Resistance to AHAS inhibitor herbicides : Current understanding. *Pest Management Science*, *70*(9), 1340-1350. <https://doi.org/10.1002/ps.3710>
- Yu, Q., Zhang, X. Q., Hashem, A., Walsh, M. J., & Powles, S. B. (2003). ALS gene proline (197) mutations confer ALS herbicide resistance in eight separated wild radish (*Raphanus raphanistrum*) populations. *Weed Science*, *51*(6), 831-838. <https://doi.org/10.1614/02-166>
- Zhang, J. J., Lu, Y. C., Zhang, S. H., Lu, F. F., & Yang, H. (2016). Identification of transcriptome involved in atrazine detoxification and degradation in alfalfa (*Medicago sativa*) exposed to realistic environmental contamination. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *130*, 103-112. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2016.04.009>
- Zhang, J. J., & Yang, H. (2021). Metabolism and detoxification of pesticides in plants. *Science of The Total Environment*, *790*, 148034. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.148034>

Références

- Zhang, X. D., Zhao, K. X., & Yang, Z. M. (2018). Identification of genomic ATP binding cassette (ABC) transporter genes and Cd-responsive ABCs in *Brassica napus*. *Gene*, *664*, 139-151.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.04.060>
- Zhang, X., Wang, H., Bei, F., Wu, C., Zhang, L., Jia, S., Wang, J., & Liu, W. (2021). Investigating the mechanism of metabolic resistance to tribenuron-methyl in *Capsella bursa-pastoris* (L.) Medik. By full-length transcriptome assembly combined with RNA-Seq. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *69*(12), 3692-3701.
<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.0c07512>
- Zhao, N., Li, W., Bai, S., Guo, W., Yuan, G., Wang, F., Liu, W., & Wang, J. (2017). Transcriptome profiling to identify genes involved in mesosulfuron-methyl resistance in *Alopecurus aequalis*. *Frontiers in Plant Science*, *8*, 1391. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01391>
- Zhao, N., Yan, Y., Luo, Y., Zou, N., Liu, W., & Wang, J. (2019). Unravelling mesosulfuron-methyl phytotoxicity and metabolism-based herbicide resistance in *Alopecurus aequalis* : Insight into regulatory mechanisms using proteomics. *Science of The Total Environment*, *670*, 486-497.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.03.089>
- Zhao, N., Yang, J., Jiang, M., Liao, M., & Cao, H. (2021). Identification of essential genes involved in metabolism-based resistance mechanism to fenoxaprop-ethyl in *Polypogon fugax*. *Pest Management Science*, ps.6733. <https://doi.org/10.1002/ps.6733>
- Zheng, D., Patzoldt, W. L., & Tranel, P. J. (2005). Association of the W574L ALS substitution with resistance to cloransulam and imazamox in common ragweed (*Ambrosia artemisiifolia*). *Weed Science*, *53*(4), 424-430. <https://doi.org/10.1614/WS-04-195R>
- Zhou, Q., Liu, W., Zhang, Y., & Liu, K. K. (2007). Action mechanisms of acetolactate synthase-inhibiting herbicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, *89*(2), 89-96.
<https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2007.04.004>
- Zimdahl, R. L. (2018a). Introduction. In *Fundamentals of Weed Science* (p. 1-16). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811143-7.00001-9>

Références

Zimdahl, R. L. (2018b). Weeds. In *Fundamentals of Weed Science* (p. 17-46). Elsevier.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811143-7.00002-0>

Zimdahl, R. L., & Brown, C. S. (2018). Invasive Plants. In *Fundamentals of Weed Science* (p. 209-252).

Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-811143-7.00008-1>

Annexes

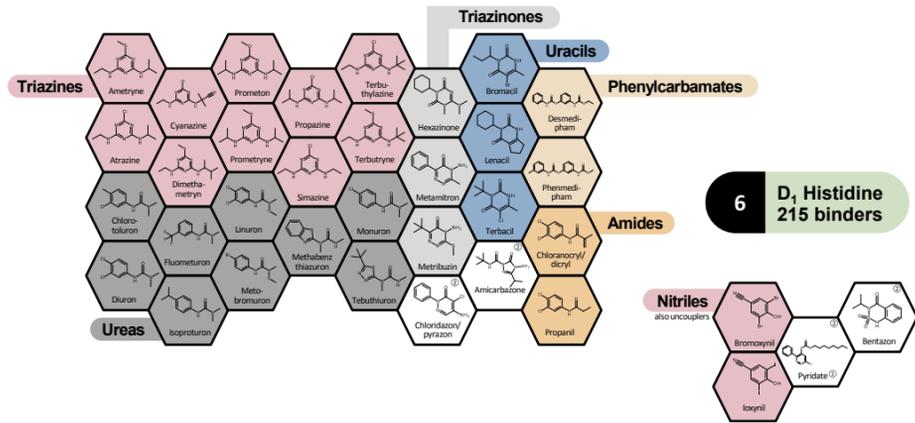
Annexe 1 : Classifications des herbicides (HRAC et R4P)

HRAC Mode of Action Classification 2021

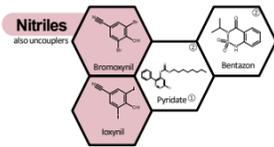
Light Activation of ROS^a

Inhibition of Photosynthesis at PS II

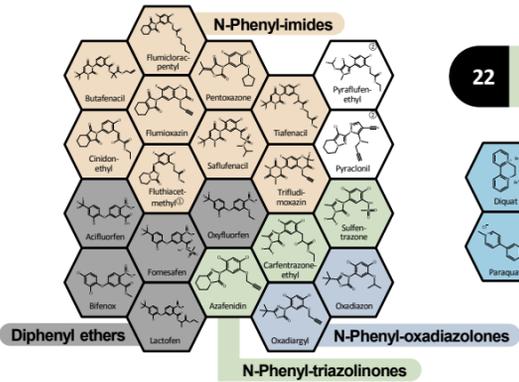
5 D1 Serine 264 binders (and other non-histidine 215 binders)



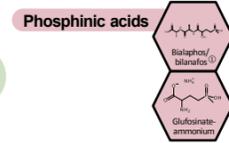
6 D₂ Histidine 215 binders



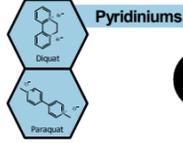
14 Inhibition of Protoporphyrinogen Oxidase



10 Inhibition of Glutamine Synthetase



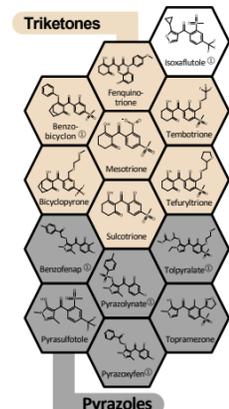
22 PS I Electron Diversion



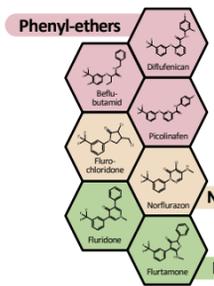
33 Inhibition of Homogentisate Solanessyltransferase



27 Inhibition of Hydroxyphenyl Pyruvate Dioxygenase



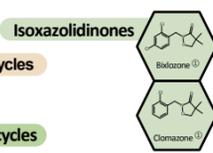
12 Inhibition of Phytoene Desaturase



32 Inhibition of Solanessyl Diphosphate Synthase



13 Inhibition of Deoxy-D-Xylose Phosphate Synthase

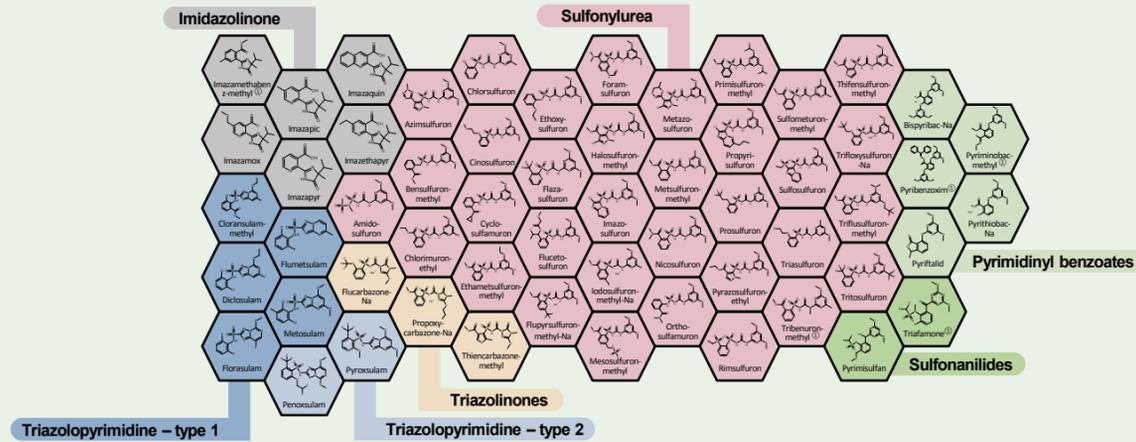


34 Inhibition of Lycopene Cyclase

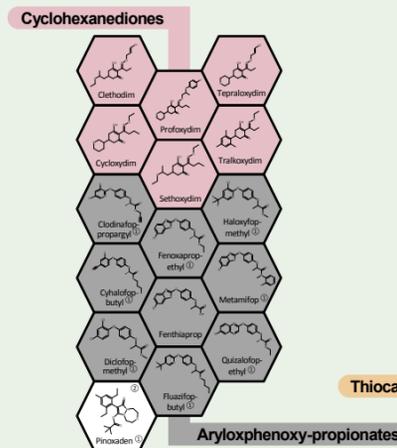


Cellular Metabolism

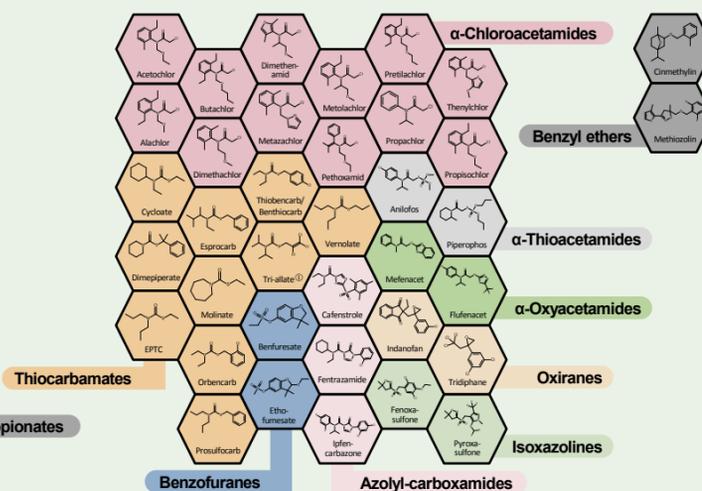
2 Inhibition of Acetolactate Synthase



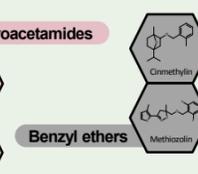
1 Inhibition of Acetyl CoA Carboxylase



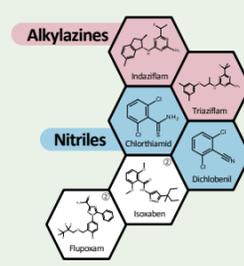
15 Inhibition of Very Long-Chain Fatty Acid Synthesis



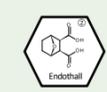
30 Inhibition of Fatty Acid Thioesterase



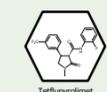
29 Inhibition of Cellulose Synthesis



31 Inhibition of Serine Threonine Protein Phosphatase



28 Inhibition of Dihydroorotate Dehydrogenase



9 Inhibition of Enolpyruvyl Shikimate Phosphate Synthase

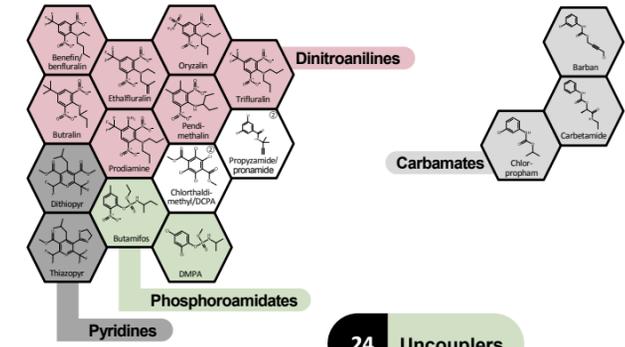


18 Inhibition of Dihydropterotate Synthase

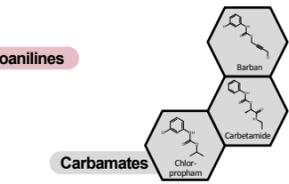


Cell Division and Growth

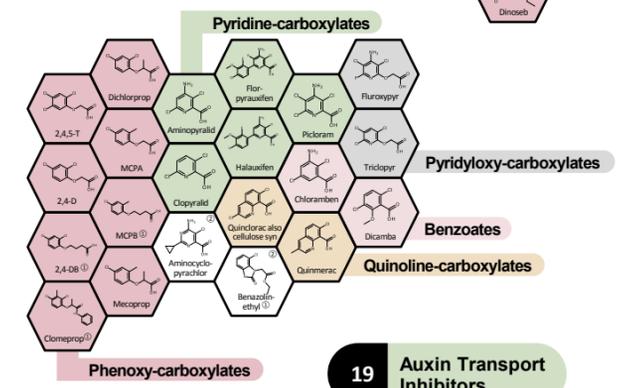
3 Inhibition of Microtubule Assembly



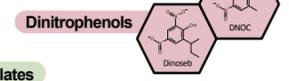
23 Inhibition of Microtubule Organization



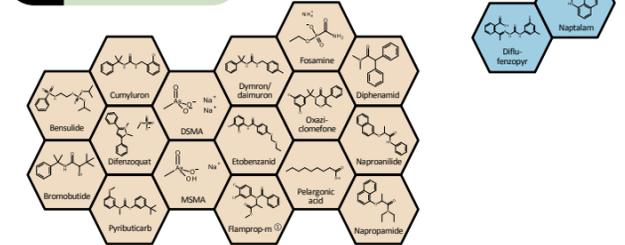
4 Auxin Mimics



24 Uncouplers



0 Unknown Mode of Action



HRAC	Legacy HRAC	Mode of Action	HRAC	Legacy HRAC	Mode of Action
1	A	Inhibition of ACCase	19	P	Auxin transport inhibitors
2	B	Inhibition of ALS	22	D	PS I electron diversion
3	K1	Inhibition of microtubule assembly	23	K2	Inhibition of microtubule organization
4	O	Auxin mimics	24	M	Uncouplers
5	C1,2	Inhibition of photosynthesis PS II - Serine 264	27	F2	Inhibition of HPPD
6	C3	Inhibition of photosynthesis PS II - Histidine 215	28	none	Inhibition of dihydroorotate dehydrogenase
9	G	Inhibition of EPSP synthase	29	L	Inhibition of cellulose synthesis
10	H	Inhibition of glutamine synthetase	30	Q	Inhibition of fatty acid thioesterase
12	F1	Inhibition of PDS	31	R	Inhibition of serine threonine protein phosphatase
13	F4	Inhibition of DOXP synthase	32	S	Inhibition of solanessyl diphosphate synthase
14	E	Inhibition of PPO	33	T	Inhibition of homogentisate solanessyltransferase
15	K3	Inhibition of VLCFAs	34	F3	Inhibition of lycopene cyclase
18	I	DHP inhibition	0	Z	Unknown mode of action

^a Reactive oxygen species
 ① Indicates pro-herbicide
 ② HRAC's recommendation is not to include a chemical family name when there is one active in the family. Actives without chemical family names are indicated with a white background

Classification universelle des produits de protection des plantes selon leurs modes d'action et leurs structures chimiques

La lutte contre les bioagresseurs des cultures fait appel à des produits de protection des plantes (PPP), d'origine naturelle ou synthétique. Des classifications indépendantes des PPP sont proposées selon leur usage (fongicides, par le FRAC ; acaricides-insecticides par l'IRAC ; herbicides par l'HRAC ou le WSSA) mais ne tiennent pas compte du fait que certains bioagresseurs parfois biologiquement très éloignés possèdent cependant des cibles biochimiques communes, pouvant être inhibées par des modes d'action communs. Par ailleurs, les solutions de biocontrôle sont souvent partiellement représentées dans ces classifications, alors que beaucoup sont homologuées en France et que leur utilisation prendra progressivement de l'ampleur dans les prochaines années. Certaines d'entre elles peuvent être confrontées à l'adaptation des bioagresseurs ciblés, ce qui justifie leur intégration dans cette nomenclature des PPP. La classification unifiée des PPP présentée dans ce document tient compte de ces particularités, et accorde le même code aux modes d'action homologués à la fois contre des pathogènes, insectes, acariens et/ou adventices. Elle comporte :

- Une classification des PPP, tous usages confondus, présentant la corrélation entre les codes R4P, RACs et WSSA
- Une classification des fongicides, insecticides-acaricides et herbicides, présentant de manière détaillée les différents modes d'action, la liste des substances actives associées, leurs usages généraux, leurs dates d'homologation en France, et les résistances observées en France et à l'étranger
- Une classification des substances actives affectant la toxicité des PPP.

Dans ces documents, les molécules sont classées selon leur mode d'action général, *i.e.* leur capacité à affecter les processus ou structures vitaux suivants :

- A – Respiration mitochondriale et production d'énergie
- B – Photosynthèse des organismes chlorophylliens (chloroplaste)
- C – Métabolisme glucidique (oses, osides ou polyols)
- D – Métabolisme lipidique (acétogénines et dérivés)
- E – Métabolisme stérolique
- F – Biosynthèse des acides aminés ou des protéines
- G – Biosynthèse des acides nucléiques ou de leurs précurseurs
- H – Biosynthèse de substances pigmentées
- I – Biosynthèse de coenzymes
- K – Divisions (fuseau achromatique) et cytosquelette cellulaires
- L – Régulation hormonale
- M – Signalisation cellulaire
- N – Système nerveux et sensoriel ou muscles des arthropodes
- O – Intégrité des membranes cellulaires.

Dans la majorité des cas, la toxicité d'un PPP résulte de son interaction avec une protéine enzymatique ou non, qui constitue sa cible primaire. Dans certains cas, pour une même cible, il est possible

de distinguer plusieurs classes d'inhibiteurs, selon les modalités d'interaction ou de sa fixation. La résistance acquise aux substances phytopharmaceutiques résulte souvent de modifications qualitatives (et plus rarement quantitatives) de leurs cibles. Ces altérations entraînent dans de nombreuses situations une résistance croisée positive à toutes les substances actives associées au même descripteur de cible primaire (chiffre du code R4P), quelle que soit la classe chimique. La connaissance de la classification des PPP permet d'établir des stratégies anti-résistance basées sur une utilisation raisonnée des diverses classes de modes d'action. Toutefois, en cas de résistance non liée à la cible, le spectre de résistance croisée peut s'étendre à plusieurs classes de modes d'action ou ne concerner que certaines substances actives au sein d'une même classe. Ceci nécessite des préconisations spécifiques à chaque situation.

Les PPP répartis au sein des classes S, W et Y sont peu concernés par les phénomènes de résistance. Il s'agit de :

- S – Stimulateurs des défenses des plantes (SDP; vis-à-vis principalement de bactéries et champignons phytopathogènes)
- W – Multi-cibles ou Multi-sites (MSI ; affectant divers composants et fonctions cellulaires, en particulier la respiration en réagissant avec des groupements thiols ou amines chez divers bioagresseurs)
- Y – Biopesticides microbiens.

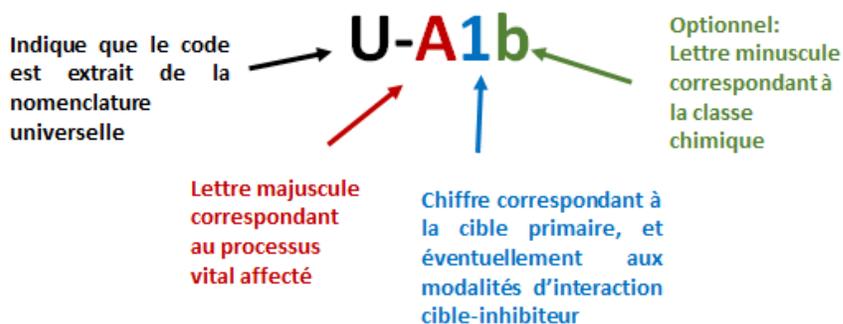
La classe X (XF : Fongicides ; XA : Acaricides ; XI : Insecticides ; XH : Herbicides) inclut les substances actives anciennes ou récentes dont le mode d'action biochimique demeure inconnu. La classe NC inclut les substances actives non classées.

Enfin, la classe Z regroupe les composés affectant la toxicité des PPP (ZP : phytoprotecteurs ou safeneurs et ZS : synergistes). Ils ne sont pas concernés par la résistance mais peuvent indirectement contribuer à la sélectionner en favorisant l'efficacité des substances actives PPP. Ils sont donc présentés séparément des substances actives précédentes.

Parallèlement à leur classification par modes d'action biochimique, les PPP ont ensuite été regroupés en fonction de leur structure chimique. Une dénomination volontairement simplifiée des structures chimiques a été choisie. Une répartition par classe chimique « Principale » est proposée pour l'ensemble d'entre elles et parfois, une subdivision par classe chimique « secondaire » est également fournie. En fonction des informations disponibles sur les phénomènes de résistance acquise (notamment les spectres de résistances croisées), un descripteur de structure chimique est parfois proposé au sein de certaines classes de modes d'action. A noter que pour les multi-sites (classe W) et les substances de modes d'action inconnus (Classe X), la classification est basée uniquement sur leurs structures chimiques.

L'ensemble des informations décrites dans ce document permet *in fine* de classer les PPP, quel que soit leur usage, de manière homogène, prioritairement selon leur mode d'action biochimique, et secondairement selon leur classe chimique, comme détaillé dans l'exemple ci-dessous. Cette dernière indication peut être utile pour raisonner les résistances croisées au sein d'un même mode d'action. Pour éviter la confusion de cette nouvelle nomenclature avec celles existant déjà, la lettre "U" (pour nomenclature "Universelle") est ajoutée devant tous les codes.

Exemple de code R4P



Dans cet exemple, le code A1b correspond aux matières actives affectant la respiration et la production d'énergie cellulaire (A) se fixant sur le complexe mitochondrial I (zone de fixation de l'ubiquinone impliquant essentiellement la sous-unité PSST)(1), représentées chimiquement par des hétérocycles diazotés (b). Ces substances actives peuvent être des fongicides (code FRAC C1/39) ou des insecticides (code IRAC 21A).

Remerciements : R4P remercie chaleureusement Pierre Leroux, Christian Gauvrit, Bruno Chauvel, Jean-Philippe Guillemin, Laurent Thibault, Hélène Tombette et Véronique Mironet pour leur aide précieuse lors de la conception et le développement de cette classification et la recherche des caractéristiques associées aux substances actives.

Des erreurs ou manques pouvant subsister dans ces synthèses, les lecteurs sont vivement encouragés à les signaler à cette adresse: contact-r4p@listes.inra.fr.

Sources documentaires :

- Classification FRAC : <http://www.frac.info/>
- Classification IRAC : <http://www.irac-online.org/>
- Classification HRAC : <http://www.hracglobal.com/>
- Classification WSSA : <http://wssa.net/>
- Base E-Phy : <https://ephy.anses.fr/>
- Index phytosanitaire ACTA 2017, ACTA éditions : <http://acta-publications.com/index-phytosanitaire-acta-2017.html>
- Base MatPhyto : <http://matphyto.acta-informatique.fr/Accueil>
- Compendium of Pesticides Common Names: <http://www.alanwood.net/pesticides/index.html>
- The Pesticide Manual 17th Edition, Ed. British Crop Production Council : <https://www.bcpc.org/product/bcpc-online-pesticide-manual-latest-version>

Légende des tableaux

Classification unifiée des PPP :

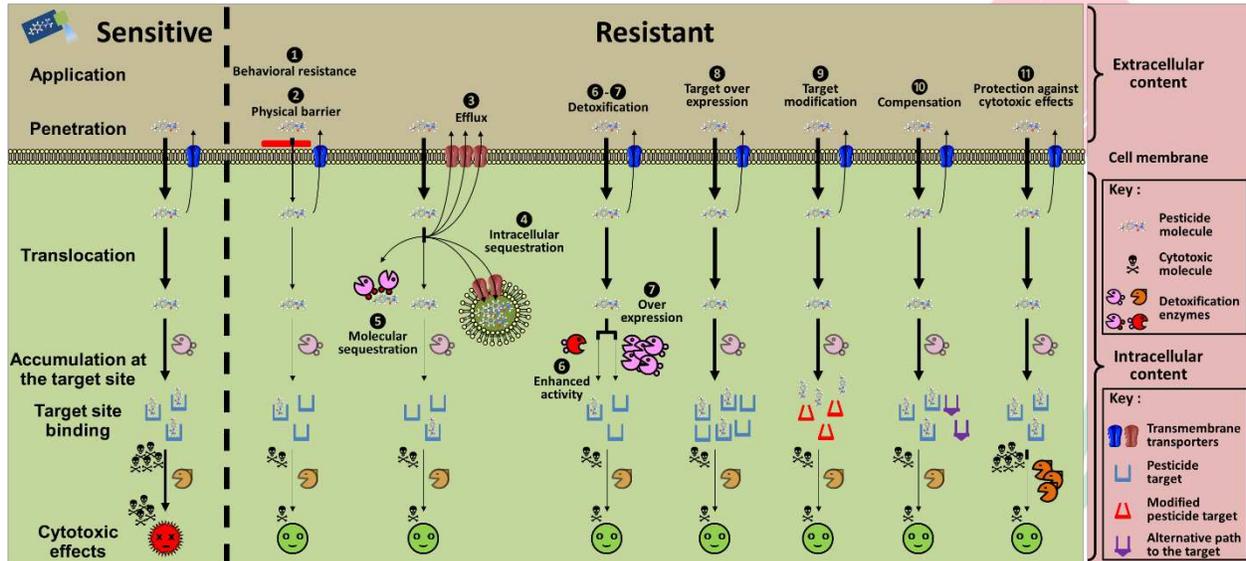
- Colonne "Abréviations", "Classes chimiques". - : pas de mention particulière.
- Colonne « Codes ». - : pas de code connu car pas de molécules présentant ce mode d'action connues pour cette classe de PPP.

Classifications par type d'usage :

- Colonne "Abréviations des inhibiteurs", "Classes chimiques secondaires". - : pas de mention particulière.
- Colonne « Codes ». - : pas de code connu car pas de substances actives présentant ce mode d'action connues pour cette classe de PPP ; **NC** : non classé ; **U ou UN** : unknown (mode d'action inconnu).
- Colonne « Usage ». + : oui ; **(+)** : usage limité ; - : non ; **E** : piétin-échaudage ; **F** : fusarioses ; **H** : helminthosporioses ; **O** : oïdiums ; **P** : pyriculariose du riz ; **R** : rhizoctone
- Colonne « Usage/Autres ». **A** : acaricide ; **B** : anti-bactérien ; **F** : fongicide ; **I** : insecticide ; **G** : gazon ; **H** : herbicide ; **M** : antifongique médical ; **N** : nématocide ; **R** : régulateur végétal ; **X** : algues ou mousses ; - : aucun.
- Colonne « Homologation en France ». - : non ; + : oui.
- Colonne « Date homologation en France ». Première date d'homologation de la substance active en France, quels que soient l'usage, la culture et le bioagresseur visé.
- Colonne « Date retrait homologation ». Dernière année de retrait d'une substance active, quels que soient l'usage, la culture et le bioagresseur visé (retrait définitif du marché).
- Colonne « Résistance France ». - : pas de résistance détectée en France, quels que soient le bioagresseur et la culture ; + : au moins un cas de résistance détectée en France, quels que soient le bioagresseur et la culture.
- Colonne « Résistance hors France ». - : aucun cas de résistance détecté dans un autre pays que la France, quels que soient le bioagresseur et la culture ; + : au moins un cas de résistance détectée dans un pays autre que la France, quels que soient le bioagresseur et la culture.
- Colonne « Mécanisme de résistance » : Pour chaque mode d'action, les chiffres indiquent le mécanisme de résistance associé, tel que décrit dans le schéma et tableau ci-dessous. - : catégorie de mécanisme non détectée pour ce mode d'action, en France ou dans le monde.
- Colonne « Résistance croisée positive ». Pour chaque mode d'action pour lequel une résistance a été décrite, cette colonne indique le spectre de résistance généralement observable avec d'autres modes d'action (mentionnés par leur code). Des exceptions peuvent exister pour des molécules spécifiques au sein d'un mode d'action. Si plusieurs mécanismes de résistance sont observés, leurs spectres de résistance respectifs sont séparés par /.
- Colonne « Résistance croisée négative ». Pour chaque mode d'action pour lequel une résistance a été décrite, cette colonne indique les modes d'action pour lesquels une sensibilité accrue est observée (mentionnés par leur code). Si plusieurs mécanismes de résistance sont observés, leurs spectres de résistance respectifs sont séparés par /.

- Colonne « Mécanisme de résistance inconnu ». Le chiffre 13 indique qu'une résistance a été validée chez au moins un organisme mais que le mécanisme n'est pas caractérisé, qu'il soit ou non lié à la cible.

Mécanismes de résistance aux pesticides



D'après : R4P. (2016) "Trends and Challenges in Pesticide Resistance Detection." Trends in Plant Science 21(10): 834-853.

- 1 Résistance comportementale
- 2 Barrière physique
- 3 Efflux accru / translocation modifiée
- 4 Séquestration intracellulaire
- 5 Séquestration moléculaire
- 6 Détoxification : activité accrue
- 7 Détoxification : surexpression
- 8 Surexpression de la cible
- 9 Modification de la cible
- 10 Compensation
- 11 Protection contre les effets cytotoxiques
- 12 Autre mécanisme (dont absorption réduite ou activation réduite)
- 13 Mécanisme non élucidé

ion
sur
es
es

Abréviations (inhibiteurs et autres)

A – Respiration mitochondriale et production d'énergie

NDHI : **NADH dehydrogenase inhibitor** (Complex I)

METI (IRAC) : **Mitochondrial complex I electron transport inhibitor**

SDHI : Complex II or **succinate dehydrogenase inhibitor**

Qil : **Quinone inside inhibitor of complex III** – site of quinone reduction within cytochrome b

Qol-D : **Quinone outside inhibitor of complex III** – site of quinol oxidation within cytochrome b, in the heme b1 distal domain

QoSI (FRAC) : **Quinone outside inhibitor of complex III** – site of quinol oxidation within cytochrome b, binding site of stigmatellin inhibitor → synonymous to Qol-D

Qol-P : **Quinone outside inhibitor of complex III** – site of quinol oxidation within cytochrome b, in the heme b1 proximal domain

Qol (FRAC) : synonyme de Qol-P

Qiol : **Quinone inside and outside inhibitor of complex III** site of quinone reduction and quinol oxidation within cytochrome b

Qxl : **Quinone inhibitor of complex III** – binding site to cytochrome b unknown (x)

COXI : **cytochrome c oxidase inhibitor**

ATPSI : **Adenosine triphosphate synthase inhibitor**

OPUC : **Oxidative phosphorylation uncoupler**

B – Photosynthèse des organismes chlorophylliens (chloroplastes)

C – Métabolisme glucidique (oses, osides et polyols)

CAA (FRAC) : **Carboxylic acid amide**

CESI : **Cellulose synthase inhibitor**

CHSI : **Chitin synthase inhibitor**

DOPSI : **1-deoxy-D-xylose-5-phosphate synthase inhibitor**

THAI : **Trehalase inhibitor**

D – Métabolisme lipidique (acétogénines et dérivés)

ACCCase : **Acetyl CoA carboxylase**

ACCI : **Acetyl CoA carboxylase inhibitor**

FOP : Herbicides ACCI – phenoxypropionates. Ex : dichlofop-methyl

DEN : Herbicides ACCI - pyrazolinones. Ex : pinoxaden

DIM : Herbicides ACCI - cyclohexanedione-oximes. Ex : alloxydim

LCEI : **Lipid chain elongation inhibitor**

MTFI : **Methyl transferase inhibitor** (fungicides preventing phospholipid biosynthesis)

SPIRO : Acaricides or insecticides ACCI. Ex : spirodiclofen

VLCAFI (HRAC) : **Very long chain fatty acids inhibitor** (syn. LCEI)

E – Métabolisme stérolique

SBI : **Sterol biosynthesis inhibitor**

SBI-SE : **Sterol biosynthesis inhibitor of squalene epoxidase Sterol biosynthesis inhibitor**

SBI-DM : Sterol biosynthesis inhibitor of 14 α -demethylase

DMI (FRAC) : synonymous to SBI-DM

SBI-IR : Sterol biosynthesis inhibitor of $\Delta 8 \rightarrow \Delta 7$ isomerase and/or $\Delta 14$ reductase

SBI-KR : Sterol biosynthesis inhibitor of 3-ketoreductase

OSBP : Oxydo-sterol binding protein

F – Biosynthèse des acides aminés ou des protéines

EPSPSI : 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase inhibitor

AHASI : Acetohydroxy acid synthase inhibitor

ALSI : Acetolactate synthase inhibitor

GSI : Glutamine synthase inhibitor

ASI : Asparagine synthase inhibitor

IGPDI : Imidazole glycerol phosphate dehydratase inhibitor

AP (FRAC) : Anilinopyrimidine

G – Biosynthèse des acides nucléiques ou de leurs précurseurs

ADAI : Adenosine deaminase inhibitor

DNAGI : DNA gyrase inhibitor

RNAPI : RNA polymerase inhibitor

PA (FRAC) : Phenylamide

H – Biosynthèse des substances pigmentées

PDSI : Phytoene desaturase inhibitor

LCI : Lycopene cyclase inhibitor

PPOI : Protoporphyrinogen IX oxidase inhibitor

MBI-D : Melanin biosynthesis inhibitor – dehydratase

MBI-P : Melanin biosynthesis inhibitor – polyketide synthase

MBI-R : Melanin biosynthesis inhibitor – reductase

I – Biosynthèse de coenzymes

TTAI : Tyrosine transaminase inhibitor

HPPDI : 4-hydroxyphenyl-pyruvate-dioxygenase inhibitor

DHPSI : Dihydropteroate synthase inhibitor

K – Divisions (fuseaux achromatiques) et cytosquelette cellulaires

MBC (FRAC) : Methyl benzimidazole carbamate (syn. benzimidazoles and precursors)

L – Régulation hormonale

KOI : Kaurene oxidase inhibitor

M – Signalisation cellulaire

AH : Aromatic hydrocarbon

AZN (FRAC) : Azanaphthalène



PP (FRAC) : **Phenylpyrrole**

N – Système nerveux et sensoriel ou muscles des arthropodes

GABA : **G**amma **a**minobutyric acid

GABA-Cl : **GABA**-gated chloride channel

Glu-Cl : **G**lutamate-gated chloride channel

ACHEI : **A**cetyl**ch**olinesterase inhibitor

OP : **O**rganophosphorous compound

nAChR : **N**icotinic acetyl**ch**oline receptor

TRPV : **T**ransient receptor potential **v**anilloid

O – Membranes cellulaires

S – Stimulateurs des défenses des plantes

BTH : **B**enzothiazole

SDP or SDN : **S**timulant of **p**lant **n**atural **d**efences

W – Multisites

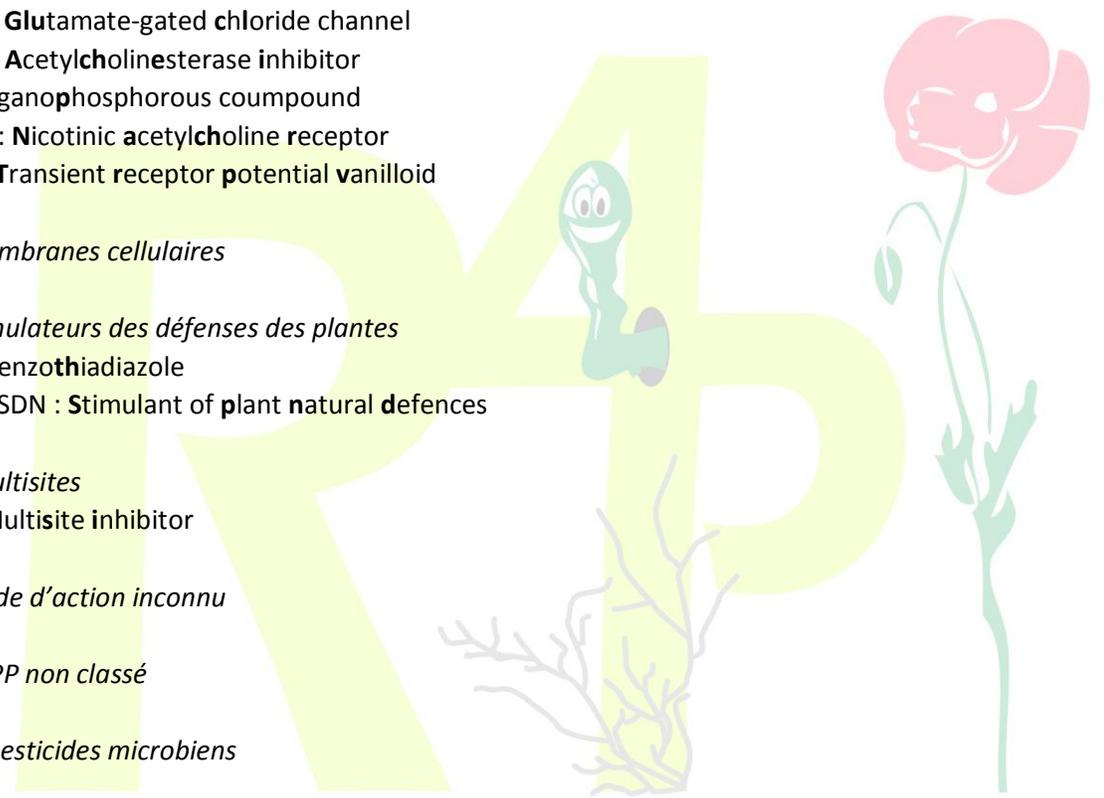
MSI : **M**ultisite inhibitor

X – Mode d'action inconnu

NC – PPP non classé

Y - Biopesticides microbiens

Z - Composés affectant la toxicité des PPP



Reseau de Réflexion
et de Recherches sur
les **Résistances**
aux **Pesticides**

 Modes d'action biochimiques			Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé																					
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales	secondaires					Dicotylédones	Graminées	Autres						Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible																						
B1 - Photosystème II - zone de fixation QB de la plastoquinone au niveau de la protéine D1 (gène psbA) - site des triazines			Triazines	Diaminotriazines	amétryne	U-B1a	C1	5	+	+	-	-	1970	2003	+	+	9	B1a-B1d-B2a-D1-F2	B3a-O3																									
					atrazine				+	+	-	-	1960	2003	+	+																												
					atraton				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					aziprotryne				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					chlorazine				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					cyanatryne				+	+	-	-	1977	1978	+	+								+																				
					cyanazine				+	+	-	-	1970	2002	+	+								+																				
					cyprazine				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					desmétryne				+	(+)	-	-	1966	1988	+	+								+																				
					diméthamétryne				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					dipropétryne				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					eglinazine				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					fucaojing				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					ipazine				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					mésoprazine				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					méthométon				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					méthoprotryne				+	+	-	-	1966	1973	+	+								+																				
					procyazine				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
					proglinazine				+	(+)	-	-	-	-	-	+								+																				
					prométon				+	+	-	-	-	-	-	+								+																				
			prométryne	+	+	-			-	1961	2007	+	+	+																														
			propazine	+	+	-			-	-	-	-	+	+																														
			sébuthylazine	+	(+)	-			-	-	-	-	+	+																														
			simazine	+	+	-			-	1957	2003	+	+	+																														
			simétryne	+	+	-			-	-	-	-	+	+																														
			secbuméton	+	+	-			-	1973	1991	+	+	+																														
			siméton	+	+	-			-	-	-	-	+	+																														
			terbuméton	+	+	-			-	1972	1998	+	+	+																														
			terbuthylazine	+	+	-			-	1972	2004	+	+	+																														
			terbuthylazine	+	+	-			+	2017	-	+	+	+																														
			terbutryne	+	+	-			-	1969	2003	+	+	+																														
			triétazine	+	+	-			-	-	-	-	+	+																														
			N-phénylcarbamates						Bis-phénylcarbamates ou biscarbanilates	chlorprocarbe	U-B1c	+	+	-	-	-								-	-	+																		
										desmédiphame		+	-	-	+	1989								-	-	+																		
										phénisophame		+	-	-	-	-								-	-	+																		
										phenmédiphame		+	-	-	+	1969								-	-	+																		
			Cétones			Triazines			Pyridazinones	brompyrazone	U-B1d	+	+	-	-	1972								1975	-	+																		
										chloridazone = pyrazone		+	+	-	+	1963								-	-	+																		
										dimidazone		+	+	-	-	-								-	-	+																		
										oxapyrazine		+	+	-	-	-								-	-	+																		
pydanone	+	+					-	-		-		-	-	+																														
amétridione	+	+				-	-	-	-	-	+																																	
amibuzine	+	+				-	-	-	-	-	+																																	
éthiozine	+	+				-	-	-	-	-	+																																	
hexazinone	+	+				-	-	1980	2007	-	+																																	

 Modes d'action biochimiques			Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé													
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales	secondaires					Dicotylédones	Graminées	Autres						Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible														
B - Photosynthèse (chloroplastes)		-	hétérocycliques	Thiazimones et thiazimidiones	isométhiozine	U-B1e			+	+	-	-	-	-	-	+	9	B2a-B3b																		
					métamitrone			+	+	-	+	1977	-	-	+																					
					métribuzine			+	+	-	+	1972	-	-	+																					
					trifludimoxazine			+	+	-	-	-	-	-	+																					
				Triazolinones	amicarbazone	U-B1f			+	+	-	-	-	-	-	-								-	+											
					bromacile				+	+	-	-	1969	2007	-	-								-	+											
					isocile = isoprocile				+	+	+	-	-	-	-	-								-	+											
				Uraciles ou pyrimidine-diones	lénacile	U-B1g			+	+	-	+	1966		-	-								-	+											
					terbacile				+	+	-	-	1972	2007	-	-								-	+											
					benzthiazuron				+	(+)	-	-	-	-	-	-								-	+											
				B2 - Photosystème II - zone de fixation QB de la plastoquinone au niveau de la protéine D1 (gène psbA) - site des urées substituées			Urées substituées et précurseurs	Benzothiazolylurées	méthabenzthiazuron = méthibenzuron				+	+	-	-								1969	2009	-	+	9	B1a-B1e-B2a	6/7	B2a					
									anisuron					+	+	-								-	-	-	-								-	+
									bromuron				+	+	-	-								-	-	-	-								-	+
								buturon				(+)	+	-	-	-								-	-	-	-								+	
								chloreturon				+	+	-	-	-								-	-	-	-								+	
	chlorobromuron								+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																		
	chlorotoluron								+	+	-	+	1970		-	-	-	+																		
	chloroxuron								+	+	-	-	1963	1991	-	-	-	+																		
	defenuron								+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																		
	diméfuron								+	+	-	-	1978	2002	-	-	-	+																		
	difénoxuron								+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																		
	diuron								+	+	-	-	1956	2008	-	-	-	+																		
	fénuron								+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																		
	fluométuron								+	+	-	-	1968	1969	-	-	-	+																		
	fluothiuron								+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+																		
	isoproturon								+	+	-	-	1974	2017	-	-	-	+																		
	karbutilate								+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																		
	linuron								+	+	-	-	1963	2017	-	-	-	+																		
	métobenzuron								+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	+																		
	métobromuron								+	+	-	+	1966		-	-	-	+																		
	métoxuron								+	+	-	-	1969	2007	-	-	-	+																		
	monolinuron								+	(+)	-	-	1965	2002	-	-	-	+																		
	monuron								+	+	-	-	1954	1979	-	-	-	+																		
	néburon								+	+	-	-	1958	1998	-	-	-	+																		
	parafluron								+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																		
	phénobenzuron								+	+	-	-	1970	1973	-	-	-	+																		
	siduron								+	+	-	-	1979	2003	-	-	-	+																		
	tétrafluron				+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																						
	Thiadiazolylurées	buthiuron				+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																					
		éthidimuron				+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																					
tébutiuron					+	+	-	-	1978	1983	-	-	-	+																						
thiazafluron					+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																						
	buthidazole				+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																						
	cycluron				+	+	-	-	1960	1992	-	-	-	+																						
	isocarbamide				+	+	-	-	-	-	-	-	-	+																						
	isonoruron				+	+	-	-	1972	1975	-	-	-	+																						

Modes d'action biochimiques			Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé										
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales	secondaires					Dicotylédones	Graminées	Autres						Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible											
B3 - Photosystème II - modalité de fixation inconnue ou incertaine	-	-	Anilides ou N-phénylamides	-	Autres structures	isouron				+	+	-	-	-	-	-	+	9	B1e-B2a		6/7		B1e-B2a										
					méthazole																												
					methiuron																												
					monisouron																												
					nonuron																												
			-	-	-	Anilides ou N-phénylamides	-	-	chloranocryl = dicryl				+	+	-	-	-	-	-	+	9	B2b		6/7	B2b								
									erlujixiancaoan																								
									monalide																								
									pentanochlore																								
									propanil																								
	-	-	-	Benzothiadiazinones	-	-	bentazone																										
				-	-	-	Substances phénoliques halogénées	-	-	bromobonil																							
										bromophénoxime																							
										bromoxynil																							
chloroxynil																																	
iodobonil																																	
ioxynil																																	
Dinitrophénols et précurseurs																																	
-	-	-	Phénylpyridazines	-	-	pyridafol																											
						pyridate																											
B4 - Photosystème I - diversion des électrons à proximité de la protéine Psac	-	-	Bipyridines ou bipyridiniums	-	-	quinochlorim																											
						cyperquat																											
						diethamquat																											
						diquat																											
						morfamquat																											
						paraquat																											
C1 - Biosynthèse de la cellulose - cellulose synthase	CCSI	-	Carboxamides	-	-	Benzamides	isoxabène																										
						Triazole-carboxamides	flupoxame																										
	C2 - Biosynthèse de la cellulose - cible inconnue ou incertaine	-	-	Composés aromatiques	-	-	Benzonitriles	chlorthiamide																									
							dichlobénil																										
				Triazines	-	-	Diaminotriazines	-	-	indaziflam																							
										triaziflam																							
	-	-	-	Quinoléines	-	-	Acides quinoléine carboxyliques																										
	C6 - Biosynthèse de pentoses - 1-désoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	DOPSI	-	Isoxazolidinones	-	-	-	oxazicloméfone																									
								clomazone																									
							chlorafloupropanil																										
							clodinafop																										

Modes d'action biochimiques		Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé						
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales					secondaires	Dicotylédones	Graminées						Autres	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible		Résistance croisée négative possible					
D - Métabolisme li	D2 - Elongation des chaînes carbonées d'acides gras et de lipides des cuticules végétales - cible(s) inconnue(s)	LCEI	Acides carboxyliques halogénés et précurseurs	Oxycétamides	propisochlore				+	+	-	-	-	-	-	+												
					prynachlore				+	+	R	-	-	-	-	-	-	-	+									
					terbuchlore				+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+									
					thénychlore				+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+									
					xylachlore				-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+									
				Azoles ou azolinones carboxamides	flufénacét	U-D2b		+	+	-	-	+	2001	-	-	-	-	+				6/7						
				méfénacét			+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+										
				cafenstrole			+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
				épronaz	U-D2c		(+)	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
				fentrazamide			+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
			ipfencarbazone			+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
			Acides carboxyliques halogénés et précurseurs					acide chloroacétique				+	+	-	-	1957	1961	-	+									
								dalapon				-	+	-	-	1957	2003	-	+									
								acide dichlorobutyrique				+	-	-	-	1961	1962	-	+									
								flupropanate	U-D2d	N	26	+	+	-	-	-	-	-	-	+								
			Acide trichloroacétique=TCA sodium					-	+	-	-	1954	2003	-	+													
			Organophosphorés	Dithiophosphates				bensulide	U-D2e	K3/N	15/8	+	+	-	-	-	-	-	-									
								anilofos				+	+	+	-	-	-	-	-	-	-							
								pipérofos				-	+	+	-	-	-	-	-	-	-							
			Organosoufrés	Benzofuranyl-sulfonates				benfuresate	U-D2f	N	8	+	+	-	-	-	-	-	+									
								éthofumesate				+	+	-	+	1975	-	-	+									
				Sulfonanilides				mefluidide	U-D2g	M	24	+	+	+	-	1980	2006	-	-									
								perfluidone				+	+	+	-	-	-	-	-	-								
				Sulfonyl-isoxazoles				fénoxasulfone	U-D2h	K3	15	+	+	-	-	-	-	-	+									
								pyroxasulfone				+	+	-	-	-	-	-	-	-	+							
				Thiolocarbamates					butylate				-	+	-	-	1973	1988	-	+								
									cycloate				(+)	+	-	-	1970	2003	-	+								
									diallate				-	+	-	-	1961	1990	-	+								
									dimépipérate				+	+	-	-	-	-	-	-	+							
									EPTC				(+)	+	-	-	1963	2002	-	+								
									esprocarb				+	+	-	-	-	-	-	-	+							
									éthiolate				(+)	+	-	-	-	-	-	-	+							
			isopolinate									+	+	-	-	-	-	-	-	+								
			méthiobencarbe									+	+	-	-	-	-	-	-	+								
			molinate						U-D2i	N	8	(+)	+	-	-	1965	2009	-	+						6/7/12	D1-D2a-D2i-D2k-F2-XH9		
			orbencarbe									(+)	+	-	-	-	-	-	-	+								
			pébulate									+	+	-	-	-	-	-	-	+								
			prosulfocarbe									+	+	-	+	1990	-	-	-	+								
			thiobencarbe = benthio-carbe									+	+	-	-	-	-	-	-	+								
			thiocarbazil									(+)	+	-	-	1976	1981	-	+									
triallate									-	+	-	+	1963	-	-	-	+											
sulfallate									+	+	-	-	1964	1980	-	+												
vernolate									+	+	-	-	1980	1995	-	+												
Indanediones				indanofan	U-D2j	Z	-	+	(+)	-	-	-	-	-	-													

 Modes d'action biochimiques			Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales	secondaires					Dicotylédones	Graminées	Autres						Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	
E : Métabolisme stéroïdique	E1 - Biosynthèse des stérols - squalène epoxydase	SBI-SE	Thioncarbamates	-	pyributicarbe	U-E1b	Z	-	-	+	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F1 - Biosynthèse des acides aminés aromatiques - S-énolpyruvil shikimate-3-phosphate synthase	EPSPSI	Organophosphonates	Dérivés de la glycine	glyphosate	U-F1	G	9	+	+	+	+	1975	-	+	+	8/9	F1	-	3/4/5/12	F1	-	-
e d'acides aminés	F2 - Biosynthèse des acides aminés ramifiés - acétolactate synthase ou	ALSI ou AHASI	Imidazolinones	-	imazaméthabenz	U-F2a			+	(+)	-	-	1986	2007	+	+	9	F2	-	6/7	B1a-D1-D2-F2	-	-
					imazamox				+	+	-	+	2002	-	+	+							
					imazapic				+	+	-	-	-	-	+	+							
					imazapyr				+	+	-	-	-	-	+	+							
					imazaquin				+	+	R	-	-	-	+	+							
					imazéthapyr				+	+	-	-	-	-	+	+							
					bispyribac				+	(+)	-	-	-	-	+	+							
					pyribambenz				+	-	-	-	-	-	+	+							
					pyribenzoxime				+	+	-	-	-	-	+	+							
					pyriminobac				-	+	-	-	-	-	+	+							
					pyriftalide				-	+	-	-	-	-	+	+							
					pyrithiobac				+	-	-	-	-	-	+	+							
					pyrimisulfan				-	+	+	-	-	-	+	+							
					triafamone				+	+	+	-	-	-	+	+							
					amidosulfuron				+	-	-	+	1991	-	+	+							
					azimsulfuron				+	(+)	-	+	1999	-	+	+							
					bensulfuron				+	(+)	-	+	1991	-	+	+							
					chlorimuron				+	-	-	-	-	-	+	+							
					chlorsulfuron				+	(+)	-	+	1984	-	+	+							
					cinosulfuron				+	(+)	-	-	1994	2003	+	+							
					cyclosulfamuron				+	(+)	-	-	-	-	+	+							
					éthametsulfuron				+	-	-	-	-	-	+	+							
					éthoxysulfuron				+	(+)	-	-	-	-	+	+							
					flazasulfuron				+	(+)	-	+	2000	-	+	+							
					flucétosulfuron				+	(+)	-	-	-	-	+	+							
					flupyrsulfuron				+	+	-	-	1999	2017	+	+							
					foramsulfuron				+	+	-	+	2004	-	+	+							
					halosulfuron				+	(+)	-	+	2017	-	+	+							
imazosulfuron	+	-	-	-	-	-	+	+															
iodosulfuron	+	+	-	+	2002	-	+	+															
iofensulfuron	?	?	-	-	-	-	+	+															
mésosulfuron	+	+	-	-	2003	-	+	+															
métazosulfuron	+	(+)	-	-	-	-	+	+															

Modes d'action biochimiques			Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé														
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales	secondaires					Dicotylédones	Graminées	Autres						Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible															
F - Biosynthèse	acétohydroxy-acide synthase		Sulfonylurées		metsulfuron	U-F2d			+	(+)	-	+	1986	-	+	+																					
					methiopyrisulfuron				+	+	-	-	-	-	+																						
					nicosulfuron				(+)	+	-	+	1993	-	+	+																					
					monosulfuron				+	+	-	-	-	-	+																						
					orthosulfamuron				(+)	+	-	-	-	-	+																						
					oxasulfuron				+	+	-	-	-	-	+																						
					primisulfuron				+	+	-	-	-	-	+																						
					propyrisulfuron				+	(+)	-	-	-	-	+																						
					prosulfuron				+	-	-	+	1999	-	+	+																					
					pyrazosulfuron				+	(+)	-	-	-	-	+																						
					rimsulfuron				+	+	-	+	1993	-	+	+																					
					sulfométuron				+	+	-	-	-	-	+																						
					sulfosulfuron				+	+	-	+	2001	-	+	+																					
					thifensulfuron				+	-	-	+	1987	-	+	+																					
					triasulfuron				+	-	-	-	1989	2002	+	+																					
					tribénuron				+	-	-	+	1991	-	+	+																					
					trifloxysulfuron				+	+	-	-	-	-	+																						
			triflusulfuron	+	-	-	+	1994	-	+	+																										
			tritosulfuron	+	-	-	+	2011	-	+	+																										
			zuomihuanglong	?	?	?	-	-	-	+																											
			(+)	+	-	-	-	-	-	+																											
			Triazolines	N-sulfonyltriazolinone carboxamides				U-F2e				+	(+)	-	+	2004	-	+	+																		
												+	(+)	-	+	2013	-	+	+																		
			Triazolopyrimidines	Triazolopyrimidine-sulfonamides				U-F2f				+	-	-	-	-	-	-	+	+																	
												+	-	-	-	-	-	-	+	+																	
												+	-	-	+	2002	-	+	+																		
												+	(+)	-	-	-	-	-	+																		
+	-	-										-	1995	2015	+	+																					
+	-	-										+	2010	-	+	+																					
+	+	-	+	2010	-	+	+																														
F3 - Biosynthèse de la glutamine - glutamine-synthase	GSI	Organo-phosphinates	Dérivés de l'homoalanine		U-F3	H	10										9	F3	-	-	-	-	13														
																								glufosinate	+	+	+	-	1986	2017	-	+					
F4 - Biosynthèse de l'histidine - glycérol phosphate deshydratase	IGPDI	Triazoles	-		U-F4 (Voir U-H2)																																
H1 - Biosynthèse des carotènes ou caroténoïdes - phytoène désaturase ou PDS		PDSI	Carboxamides		U-H1b	F1	12																														
																									Alcanamides	beflubutamide	+	+	-	+	2010	-	-	+			
																										diflufenicanil	+	+	-	+	1988	-	-	+			
																									Pyridine-carboxamides	flufenican	+	-	-	-	-	-	+				
																										picolinafène	+	-	-	+	2003	-	-	+			
			Cétones (hétérocycliques ou non)					U-H1c																													
																												Furanones	flurtamone	+	(+)	-	+	1998	-	-	+
																												Pyridazinone	metflurazone	+	+	-	-	-	-	+	
																													norflurazone	+	+	-	-	1988	2003	-	+
																												Pyridinones	fluridone	+	+	+	-	-	-	+	
Pyrrolidinones	flurochloridone	+	(+)	-	+	1985	-	-	+																												

 Modes d'action biochimiques			Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé																						
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales	secondaires					Dicotylédones	Graminées	Autres						Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible																							
H - Biosynthèse des substances pigmentées				Benzophénones	méthoxyphénone				+	+	-	-	-	-	-	+																													
			Diphényléthers ou phénoxyéthers	Nitrophénoxyanilines	aclonifène	U-H1d (Voir U-H3a)	F3	11	+	+	-	+	1988	-	-	-																													
		H2 - Biosynthèse des carotènes ou caroténoïdes - lycopène cyclase	LCI	Triazoles		amitrole=aminotriazole	U-H2 (Voir U-F5)	F3	11	+	+	-	-	1958	2016	-	+							13																					
	H3 - Biosynthèse des chlorophylles - Protoporphyrinogène oxydase IX		PPOI	Diphényléthers ou phénoxybenzènes	Nitrophénoxybenzènes et apparentés	acifluorfène	U-H3a	E	14	-	+	-	-	1991	2003	-	+	9	H3a		F1			13																					
						bifénox				+	-	-	+	1983	-	-	+																												
						chlométhoxyfène				+	+	-	-	1984	1995	-	+																												
						chlornitrofène				-	+	-	-	-	-	-	-																												
						éthoxyfène				(+)	+	-	-	-	-	-	+																												
						etnipromide				+	+	-	-	-	-	-	+																												
						fluorodifène				+	+	-	-	-	-	-	+																												
						fluoroglycofène				+	+	-	-	1991	2002	-	+																												
						fluoronitrofène				+	+	-	-	-	-	-	+																												
						fomésafène				+	-	-	-	1991	2007	-	+																												
						fucaomi				?	?	?	-	-	-	-	+																												
						furyloxyfène				+	(+)	-	-	-	-	-	+																												
						halosafène				-	+	-	-	-	-	-	+																												
						lactofène				+	-	-	-	-	-	-	+																												
						nitrofène				+	+	-	-	1969	1987	-	-																												
						nitrofluorfène				+	+	-	-	-	-	-	+																												
						oxyfluorfène				+	+	-	+	1982	-	-	+																												
						profluzole				+	-	-	-	-	-	-	-																												
						Imidazolidinedione				oxadiargyl	U-H3b	E	14	+	+	-	-								2004	2015	-	+											13						
						Oxadiazolones				oxadiazon				+	+	-	-								1972	2015	-	+																	
						Oxazolidinediones				pentoxazone				+	+	-	-								-	-	-	-	-	-	-														
						Phthalimides ou isoindoldiones				chlorphthalim	U-H3b	E	14	+	(+)	-	-								-	-	-	-	+											13					
										cinidon				+	-	-	-								2001	2013	-	+																	
										flumiclorac				+	-	-	-								-	-	-	+																	
										flumipropyne				+	+	-	-								-	-	-	+																	
										flumioxazine				+	+	-	+								1999	-	-	+																	
										Pyridazinones				flufenpyr	U-H3b	E	14								+	-	-	-	-	-	-	-	+												
														benzfenidzone											+	+	-	-	-	-	+														
														butafénacile											+	+	-	-	-	-	+														
														fluproacile											+	+	-	-	-	-	+														
										Pyrimidinediones ou uraciles				saflufénacile	U-H3b	E	14								+	+	-	-	-	-	-	-	+												
						tiafénacile					+	+	-	-											-	-	+																		
						azafénidine					+	+	-	-											-	-	+																		
						bencarbazone					+	-	-	-											-	-	+																		
						Triazolinones				carfentrazone	U-H3b	E	14	+	-	-	+								1999	-	-	+																	
										sulfentrazone				+	(+)	-	-								-	-	+																		
										fluthiacet				+	-	-	-								-	-	+																		
						Imino-thiadiazolinones				thidiazimine	U-H3b	E	14	+	-	-	-								-	-	-	+																	
										fluazolate				+	+	-	-								-	-	+																		

Modes d'action biochimiques			Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé						
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales	secondaires					Dicotylédones	Graminées	Autres						Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible							
			Autres hétérocycles	Phénylpyrazoles	nipyraclofène pyraflufène	U-H3c			+	-	-	-	-	-	-	+													
				Bi-pyrazoles	cyclopyranil pyraclonil				+	?	?	-	-	-	-	-													
I - Biosynthèse de coenzymes	I1 - Homogentisate précurseur de quinones - tyrosine transaminase	TTAI	Isoxazolinés	-	méthiozoline	U-11	NC	NC	-	+	-	-	-	-	-	-													
			Oxabicyclohexanes	-	cinméthylène	U-11	Z	17	-	+	-	-	-	-	-	-	-												
	I2 - Homogentisate précurseur de quinones - hydroxyphénylpyruvate deshydrogénase	HPPDI	Dicétones ou β-cétoénols et précurseurs	Benzoyl-isoxazoles	isoxachlortole	U-12a	F2	27	+	+	-	-	-	-	-	-	+							13					
					isoxaflutole	U-12a			+	+	-	+	1999	-	-	-	-	+											
					benzofénap	U-12b			+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
					pyrasulfotole	U-12b			+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
			pyrazolinate	U-12b	+	+			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
			pyrazoxyfène	U-12b	+	+			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
			tolpyralate	U-12b	+	+			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
			topramézone	U-12b	-	+			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
			benzobicyclone	U-12c	+	+			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
			bicyclopyrone	U-12c	+	+			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-										
	Tricétones	Benzoyl-cyclohexanediones	fénquinotriane	U-12d	+	(+)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+													
ketospiradox			U-12d	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+													
lancotriane			U-12d	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+													
mésotriane			U-12d	+	+	-	+	2002	-	-	-	-	-	-	-	+	8	12	6/7	12									
sulcotriane			U-12d	+	+	-	+	1994	-	-	-	-	-	-	-	+													
téfuryltriane			U-12d	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+													
tembotriane			U-12d	+	+	-	+	2010	-	-	-	-	-	-	-	+													
I3 - Folates impliqués dans la biosynthèse d'acides nucléiques et de certains acides aminés - 7,8-dihydropteroate synthase	DHPSI	Carbamates	Sulfonyl-carbamates	asulame	U-13	I	18	+	-	-	-	1972	2012	-	-														
				carbasulame	U-13			+	+	-	-	-	-	-	-	-													
				fenasulame	U-13			+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-											
quette cellulaires	K1 - Microtubules du fuseau achromatique - α-tubuline	-	Dinitroanilines	-	benfluraline = benefin	U-K1	K1	3	+	+	-	+	1974	-	-	+													
					butraline				U-K1	+	+	-	-	1977	2009	-	-	+											
					chlornidine				U-K1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+								
					dinitramine				U-K1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+								
					dipropaline				U-K1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+								
					éthalfiuraline				U-K1	+	+	-	-	1978	1991	-	-	-	-	-	+								
					fluchloraline				U-K1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+								
					isopropaline				U-K1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+								
					méthalphopaline				U-K1	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	9	K1-K2d-K3	K2c	2/3/6/7	D1-K1	-	-	
					nitraline				U-K1	+	+	-	-	1972	1987	-	-	-	-	-	+								
					oryzalin				U-K1	+	+	-	+	1984	-	-	-	-	-	-	+								
					pendiméthaline				U-K1	+	+	-	+	1980	-	-	-	-	-	-	+								

Modes d'action biochimiques			Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé							
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales	secondaires					Dicotylédones	Graminées	Autres						Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible								
K : Divisions (fuseaux achromatiques) ou cytos	K2 - Microtubules du fuseau achromatique - β-tubuline	-	Carboxamides	Benzamides	pénoxaline				+	+	-	-	1975	1979	-	+														
						prodiamine				+	+	-	-	-	-	-	-	+												
						profluraline						+	+	-	-	-	-	-	+											
						prosuifaline						+	+	-	-	-	-	-	+											
						trifluraline						+	+	-	-	1966	2008	-	+											
					Carbamates	N-phénylcarbamates ou carbanilates	propyzamide = pronamide	U-K2a			+	(+)	-	+	1970	-	-	+												
							tébutame					+	+	-	-	1980	2000	-	+											
							barbane						-	+	-	-	1962	1987	-	+										
							BCPC						+	+	-	-	-	-	-	+										
							carbétamide						+	+	-	+	1967	-	-	+										
			Organophosphorés	Phosphoro-amidothioates	CEPC	U-K2c	K2	23	+	+	-	-	-	-	-	-	+													
					chlorbufame									+	+	-	-	1960	1992	-	+									
					chlorprophame									+	-	-	+	1958	-	-	+									
		CPPC											+	+	-	-	-	-	-	+										
		prophame											(+)	+	-	-	1963	1964	-	+										
		swep											+	+	-	-	-	-	-	+										
		amiprofos											+	+	-	-	-	-	-	+										
		butamifos			U-K2d	K1	3	(+)	+	-	-	-	-	-	+															
		DMPA								+	+	-	-	-	-	+														
		shuangjiaancaoilin								+	+	-	-	-	-	+														
	K3 - Microtubules du fuseau achromatique - cibles incertaines ou inconnues	-	Téréphtalates	-	chlortal-diméthyl = DCPA	U-K3a	K1	3	+	+	-	-	1970	2011	-	+														
			Pyridines	-	dithiopyr	U-K3b					+	+	-	-	-	-	-	+												
monale	L1 - Mimétiques de l'auxine naturelle des plantes (acide indole acétique ou AIA)	-	Acides benzoïques	-	2,3,6-TBA	U-L1a			+	-	-	-	1958	1989	+	+														
					chlorambène									+	+	-	-	1964	1969	-	+									
					dicamba									+	-	-	+	1969	-	-	+									
					tricamba									+	-	-	-	-	-	-	+									
					2,4-D									+	-	R	+	1946	-	+	+									
				Acides phénoxyalcanoïques et précurseurs	-	2,4-DB					+	-	-	+	1961	-	+	+												
						2,4-DEP						+	-	-	-	-	-	+												
						2,4-DES = disul = seasoine						+	-	-	-	1952	1957	+	+											
						2,4,5-T						+	-	-	-	1949	1987	+	+											
						2,4,5-TB						+	-	-	-	-	-	-	+											
						3,4-DA						+	-	-	-	-	-	-	+											
						3,4-DB						+	-	-	-	-	-	-	+											
						3,4-DP						+	-	-	-	-	-	-	+											
						4-CPA = PCPA						+	-	R	-	-	-	-	+											
						4-CPB				U-L1b	O	4	+	-	-	-	-	-	+											
						4-CPP								+	-	-	-	-	-	+										
						chloméprop								+	(+)	-	-	-	-	+	+									
						chlorfénac = fénac								+	+	-	-	-	-	-	+									
						chlorfenprop								-	+	-	-	-	-	-	+									
						cloprop								+	-	R	-	-	-	-	+									
	dichlorprop = 2,4-DP						+	-	R	+			1963	-	+	+														

Modes d'action biochimiques			Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé		
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales	secondaires					Dicotylédones	Graminées	Autres						Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible			
L - Régulation hor			Pyridines	Acides (6)-chloropicoliniques	fénoprop = 2,4,5-TP	U-L1c			+	-	R	-	1966	1986	+	+	9	L1a-L1b-L1e							
					mécoprop = MCPP				+	-	-	+	1957	-	+	+									
					MCPA = 2,4-MCPA				+	-	-	-	1946	-	+	+									
					MCPB = 2,4-MCPB				+	-	R	+	1955	-	+	+									
					aminopyralide				+	-	-	+	2012	-	+	+									
					clopyralide				+	-	-	+	1978	-	+	+									
					piclorame				+	-	-	-	1965	2016	+	+									
					florpyrauxifène				+	(+)	-	-	-	-	-	-									
					halauxifène				+	-	-	+	2016	-	-	-									
					fluroxypyr				+	-	-	+	1987	-	-	+									
					triclopyr				+	-	-	+	1982	-	-	+									
					aminocyclopyrachlor				+	-	-	-	-	-	-	-									
					quinclorac				+	+	-	-	1991	2004	-	+									
quinmércac	+	(+)	-	+	1994	-	-	+																	
benzoline	+	-	-	-	1975	1981	-	-																	
L2 - Inhibition du transport de l'auxine naturelle des plantes (acide indole acétique ou AIA)	-		Acides carboxyliques	Acides fluorène carboxyliques	chlорflurénol	U-L2	Z	17	+	+	-	-	-	-	-	-									
				Acides phthalamiques	naptalame				P	19	+	+	-	-	1957	2007								-	-
				Acides nicotiniques	diflufenzopyr						+	-	-	-	-	-								-	-
L3 - Biosynthèse des gibberellines - inhibition de la formation du kaurène	-		Inhibiteurs lipidiques LCEI			Voir U-D2																			
M - Signalisation cellulaire	M3 - Régulation du cycle cellulaire - Protéine phosphatase?		Acides dicarboxyliques	Epoxy cyclohexanes	endothal	U-M3	NC	NC	+	+	+	-	-	-	-	+								13	
Intégrité des membranes cellulaires	O3 - Perméabilisation des membranes aux protons			Alkylphénols	cryptophénoi	U-O3 (Voir U-A10b et U-B3b)	NC	NC	+	-	-	-	1954	1962	-	-									
					dichlorophène				+	+	B/F/X	-	-	-	-										
					Chlorophénols				trichlorophénoi	+	-	F	-	1944	1956	-									-
					pentachlorophénoi				+	+	F/I	-	1946	1962	-	-									
					dinofénate				+	+	-	-	-	-	-	-									
					dinoprop				+	-	-	-	-	-	-	-									
					dinosame				+	+	-	-	-	-	-	-									
					dinosébe				+	+	-	-	1950	1991	-	-									
					dinoterbe				+	-	-	-	1967	1997	-	-									
					DNOC				+	-	I	-	1933	1997	-	-									
					étinofène				+	+	X	-	-	-	-	-									
					médinoterbe				+	-	-	-	-	-	-	-									
					O5 - Autre						Huiles minérales	huiles de pétrole	U-O5a	NC	NC	+									+

 Modes d'action biochimiques			Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé								
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales	secondaires					Dicotylédones	Graminées	Autres						Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible									
	interaction membranaire	-	Substances lipidiques	Acides gras	acide oléique acide pélargonique	U-O5b	Z	17	+ +	+ +	A/I/F -	- +	- 2012	- -	- -	- -															
W : Multi-sites ou Multi-cibles	W1-W9 Substances affectant divers composants et fonctions cellulaires (en particulier la respiration), en réagissant notamment avec des groupements thiols ou amines	MSI	Substances minérales à base de bore	Borates	borax	U-W1	NC	NC	+ +	+ +	F/I F/I	- -	- -	- -	- -	- -															
					sodium métaborate				+ +	+ +	F/I F/I	- -	- -	- -	- -	- -															
			Substances minérales à base de cuivre	-	nitrate de cuivre	U-W2	NC	NC	+ +	- -	- -	- -	1944 1944	1960 1950	- -	- -	- -	- -													
					sulfate de cuivre				+ +	- -	F/X F/X	- -	1944 1944	1950 1950	- -	- -	- -	- -													
			Substances à base d'arsenic	Substances minérales	arsénites de potassium	U-W5a	Z	17	+ +	+ +	X X	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -												
					arsénite de sodium				+ +	+ +	X X	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -									
					hexafluorure				+ +	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -								
			Aldéhydes et précurseurs	-	Organo-arsenic	acide diméthylarsinique = acide cacodylique	U-W5b	Z	17	+ +	+ +	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	+ +						13						
						acide méthylarsonique = CMA = DSMA = MSMA = MAA = MAMA				- -	+ +	F F	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -					13		
			Alcanes ou alcènes halogénés et apparentés	-	-	-	acroléine	U-W7	NC	NC	+ +	- -	X -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -											
ally-alcool	+ +	- -					- -				- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -									
Thiocyanates et précurseurs	-	-	-	bromure de méthyle	U-W8	NC	NC	+ +	+ +	A/F/I/N A/F/I/N	- -	1971 -	2015 -	- -	- -	- -	- -														
				iodométhane				+ +	+ +	A/F/I/N A/F/I/N	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -									
				dazomet				U-W9	Z	17	+ +	+ +	A/F/I/N F	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -								
métam	+ +	+ +	F F	- -	1961 1961	1969 1969	- -				- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -													
méthyl-isothiocyanate	+ +	+ +	A/F/I/N A/F/I/N	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -														
des d'action incertains ou inconnus	XH - Herbicides de mode d'action inconnu ou incertain	-	Substances minérales	-	acide sulfurique	U-XH1	NC	NC	+ +	- -	F -	- -	1933 1944	1979 1990	- -	- -	- -	- -													
					chlorate de sodium				+ +	+ +	- -	- -	1944 1933	1990 1958	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -								
					chlorure de sodium				+ +	+ +	- -	- -	1933 1944	1958 1950	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -							
					hydroxyethylenediamine triacétique de fer				+ +	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -						
					hyponitrate alcalin				+ +	- -	- -	- -	1947 1944	1950 1950	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -						
					nitrate de zinc				+ +	- -	- -	- -	1944 1944	1950 1950	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -						
					sulfate d'aluminium				+ +	- -	- -	- -	1944 1944	1950 1950	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -						
					sulfamate d'ammonium				+ +	- -	- -	- -	1955 1944	2008 1950	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -						
					sulfate de cuivre				+ +	- -	- -	- -	1944 1944	1950 1950	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -						
					sulfate ferreux				+ +	- -	- -	- -	1944 1944	1950 1960	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -						
					cyanamide				+ +	- -	- -	- -	1944 1944	1950 1961	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -						
					cyanate de potassium				+ +	- -	- -	- -	1955 1955	1961 1961	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -						
					cyanogène				+ +	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -						
					acide acétique				+ +	- -	- -	- -	U-XH3	NC	NC	+ +	+ +	F F	+ -	2011 1972	- 1984	- -	- -	- -	- -						
					benzoylprop				- -	- -	- -	- -	U-XH4	NC	NC	- -	+ +	- -	- -	1972 1974	1984 2003	- -	- -	- -	- -						
					flamprop				- -	- -	- -	- -	Z	25	- -	+ +	- -	- -	- -	- -	1974 2003	- -	- -	- -	- -						13
bromobutide	Alcanamides	U-XH5	Z	17	+ +	+ +	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -														
étobenzanide	Benzamides	U-XH6	Z	17	+ +	+ +	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -														
difénamide	Alcanamides	U-XH3	K3	15	(+) +	+ +	- -	- -	- -	1965 1972	1996 -	- -	- -	- -	- -	- -	- -														
napropamide					+ +	+ +	- -	- -	+ +	1972 -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -												
naproanilide					+ +	+ +	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -											

 Modes d'action biochimiques			Classes chimiques		Substances actives	Code R4P	Code HRAC	Code WSSA	Usage			Homologué en France	Date homologation	Date retrait homologation	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce en France	Présence de plantes résistantes chez au moins une espèce hors France	Résistance liée à la cible			Résistance non liée à la cible			Mécanisme de résistance non élucidé	
Fonctions ou structures majeures	Cibles ou sites et mécanismes d'action	Abréviations des inhibiteurs	principales	secondaires					Dicotylédones	Graminées	Autres						Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible	Mécanisme de résistance	Résistance croisée positive possible	Résistance croisée négative possible		
X - Moc			Organophosphonates	Carbamoylphosphonates	fosamine	U-XH8	Z	17	+	+	-	-	1982	2002	-	-								
			Bipyridines ou bipyridiniums	Pyrazoliums	difenzoquat	U-XH9	Z	26	-	+	F	-	1974	1996	-	+				4/6/7	D2i			
			Benzylurées	-	cumyluron daimuron = dymron = dimuron	U-XH10	NC	NC	-	+	-	-	-	-	-	-								
			Oxazinones	-	oxazicloméfone	U-XH11	Z	17	-	+	-	-	-	-	-	-								

Annexe 2 : Articles de vulgarisation



Résistances aux phytos : le diagnostic passe au haut débit

L'application des techniques de séquençage à haut débit (SHD) au diagnostic permet désormais une recherche intensive des résistances. Démonstration avec l'ambrosie.

INGVILD LOUBET*, **FANNY PERNIN***, **SÉVERINE FONTAINE****, **LAËTTIA CADDOUX****, **BENOÎT BARRÈS****, **VALÉRIE LE CORRE*** ET **CHRISTOPHE DÉLYE*** *Inrae - UMR Agroécologie - Dijon. **Anses - Laboratoire de Lyon - USC Casper - Lyon.

D iagnostiquer rapidement la présence de plantes résistantes dans une parcelle est indispensable pour une gestion optimale de l'emploi des produits phytosanitaires. L'emploi des techniques de séquençage d'ADN dites « à haut débit » rend désormais possible l'analyse rapide d'un très grand nombre de plantes et la détection avec une haute précision de mutations en cause dans la résistance. En 2018, la preuve de concept de cette technique a été faite sur la recherche de résistance aux herbicides inhibiteurs de l'ALS (groupe HRAC B⁽¹⁾) chez l'ambrosie à feuilles d'armoise.

Diagnostiquer les résistances pour gérer les phytos

Les tests ADN « classiques » :

une capacité d'analyse limitée

Le diagnostic rapide et précis des résistances aux produits phyto est essentiel pour préserver l'efficacité du contrôle chimique dans la durée (R4P, 2020). Les tests « ADN », qui permettent de rechercher par PCR (voir encadré) des mutations en cause dans la résistance, sont les outils les plus rapides et les plus fiables pour le diagnostic des résistances liées à la cible des herbicides. Cependant, la recherche de résistances dans un grand nombre de plantes se heurte à deux



1

^ Inflorescences d'ambrosie *Ambrosia artemisiifolia*.

obstacles : les capacités de traitement des laboratoires et le coût des analyses.

Séquençage à haut débit : le diagnostic massif à portée de main

Les techniques de séquençage à haut débit (SHD), aussi appelées « séquençage massivement parallèle » ou « séquençage de nouvelle génération », génèrent des dizaines de millions de séquences (voir encadré) par analyse. Elles permettent de séquencer en une seule fois l'ADN d'un grand nombre

d'échantillons, et donc d'augmenter considérablement les capacités de diagnostic des tests « ADN ». Lorsqu'on effectue un prélèvement pour analyse sur une parcelle, on collecte un ensemble d'individus représentant la population d'un bioagresseur pré-

(1) La classification HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) répertorie les substances actives herbicides selon leurs modes d'action.

RÉSUMÉ

CONTEXTE - Les tests « ADN » permettent de rechercher des mutations en cause dans la résistance des bioagresseurs aux produits phytosanitaires.

Jusqu'à peu, ces techniques ne permettaient que difficilement de rechercher des résistances dans un grand nombre d'échantillons, car elles né-

cessitaient autant d'analyses que d'individus étudiés.

ÉTUDE - Le séquençage à haut débit (SHD), aussi appelé « séquençage de nouvelle génération », permet d'analyser en une seule fois l'ADN d'un grand nombre d'échantillons, et donc de multiplier les capacités de diagnostic

des tests « ADN ». La technique a été testée avec succès sur l'ambrosie pour détecter les résistances liées à l'ALS. Sur 219 parcelles étudiées (cinquante plantes analysées par parcelle), quinze ont été testées positives et un total de cinq mutations de l'ALS en cause dans la résistance aux herbicides a été détecté. Le foyer le plus important a été identifié

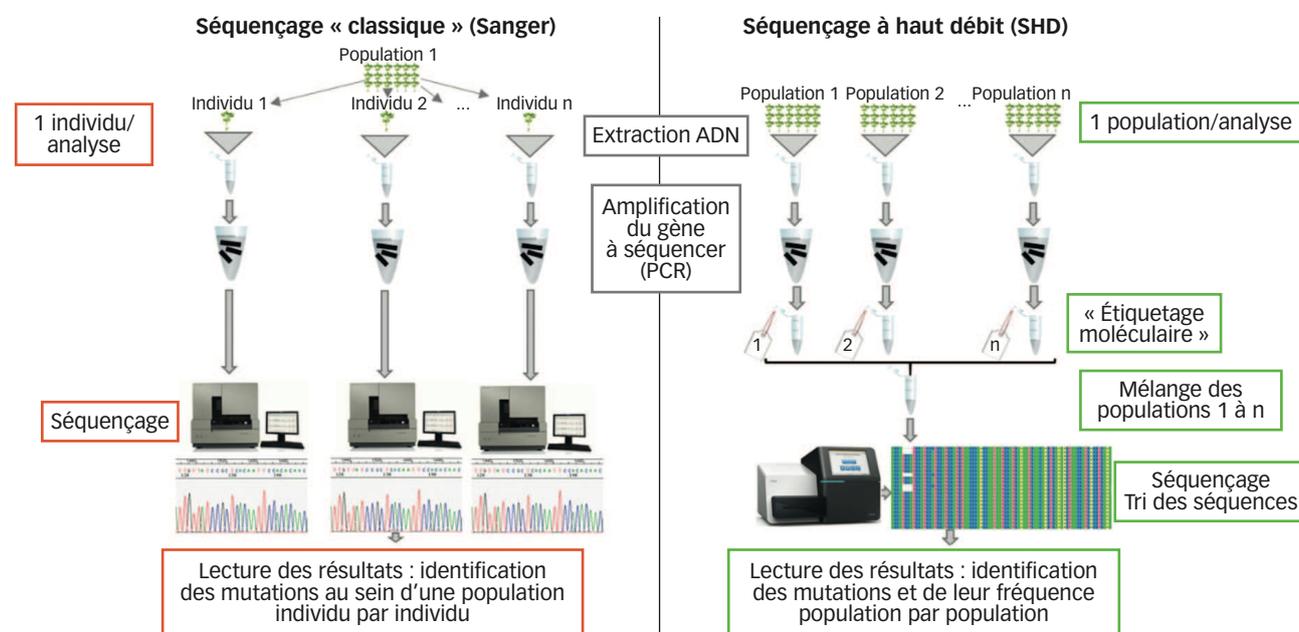
en Occitanie, dans la zone d'origine du premier cas historiquement signalé en France.

MOTS-CLÉS - Résistance, ambrosie à feuilles d'armoise *Ambrosia artemisiifolia*, mutation de l'ALS, séquençage à haut débit (SHD), analyses moléculaires, test ADN.



Fig. 1 : Séquençage « classique » et séquençage à haut débit (SHD)

Dans le premier cas, l'analyse s'effectue individu par individu. Dans le second, elle s'effectue population par population et il est possible de passer plusieurs dizaines de populations par analyse.



sente sur cette parcelle. Avec le séquençage « classique » de type Sanger, les analyses se font individu par individu. Pour analyser un échantillon prélevé sur une parcelle, on doit donc réaliser autant de séquençages qu'on a prélevé d'individus (Figure 1). Le SHD, lui, donne non seulement la possibilité de rechercher des mutations directement dans un ensemble d'individus (= dans une population), mais en plus celle d'analyser plusieurs dizaines de populations en une seule fois. Grâce à un système « d'étiquetage moléculaire », il est possible de trier les séquences et de les assigner à la population d'origine (Figure 1), ce qui permet d'obtenir, en sortie d'analyse, la fréquence de chacune des mutations recherchées dans chaque population. Cet outil donne donc potentiellement accès à un débit de criblage jamais atteint jusqu'alors pour le diagnostic de résistance aux produits phytosanitaires. Restait à apporter la preuve de son intérêt en l'utilisant pour étudier un cas concret.

Recherche de résistance chez l'ambrosie

Une adventice envahissante, allergisante, allergène... et résistante

L'ambrosie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia*, photo 1, nommée ambrosie dans la suite du texte) est une « espèce dont la prolifération constitue une menace pour la santé humaine » (article D. 1338-1 du code de la santé humaine), en raison de son

pollen très allergisant (rendant allergique) et allergène (induisant un symptôme d'allergie). Cette plante envahissante d'origine nord-américaine est présente en France,

notamment dans le milieu agricole. Elle se développe particulièrement bien dans les cultures d'été comme le tournesol, le soja et le maïs (photos 2 à 4). Pour la combattre, les

Quelques définitions

Allèle Variant d'un gène. Diffère du gène d'origine par une ou des mutations.

Codon Succession de trois nucléotides dans une séquence d'ADN codant pour un acide aminé (élément de base d'une protéine).

Homozygote (pour un gène) Possédant deux allèles identiques du gène.

Hétérozygote (pour un gène) Possédant deux allèles différents du gène.

Nucléotide Élément de base des acides nucléiques (ADN et ARN).

PCR (Polymerase Chain Reaction = Réaction en chaîne de la polymérase) Technique de biologie moléculaire permettant de multiplier *in vitro* et en grande quantité un fragment d'ADN ciblé.

Population (dans cet article) Ensemble d'individus d'une espèce de bioagresseur présents dans une même parcelle et susceptibles de se reproduire entre eux, et donc d'échanger des gènes⁽¹⁾.

Résistance liée à la cible (RLC) Résistance causée par une ou des mutations affectant le gène de la

protéine-cible du produit phytopharmaceutique (par exemple, l'ALS⁽¹⁾).

Résistance non liée à la cible (RNLC) Résistance causée par des mécanismes autres que la RLC⁽¹⁾.

Séquençage Détermination de l'ordre d'enchaînement des nucléotides dans un fragment d'ADN.

Séquence (d'ADN) Enchaînement ordonné et orienté de nucléotides. Les nucléotides sont les « lettres » de l'ADN ou de l'ARN ; les codons en sont les « mots ».

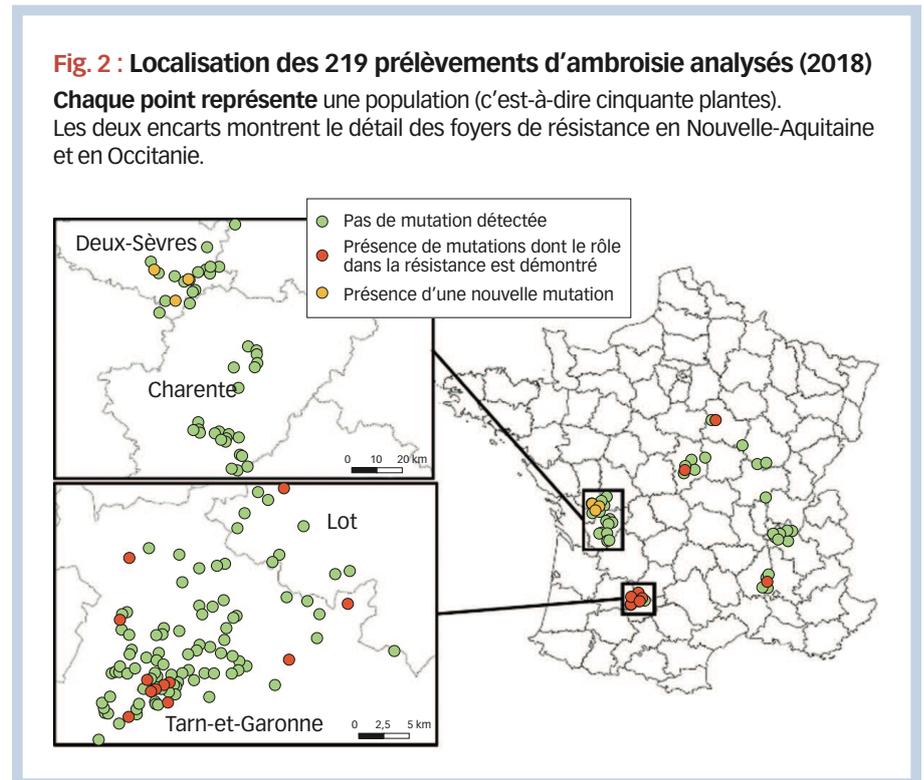
(1) D'après « Les "mots" de la résistance », Phytoma n° 733, p. 12-14.



herbicides inhibiteurs de l'acétolactate-synthase (ALS, groupe HRAC B) sont le levier chimique le plus efficace, particulièrement en tournesol. Cependant, les inhibiteurs de l'ALS utilisables sur cette culture (à base d'imazamox ou de tribénuron) ne sont utilisables que sur les variétés rendues tolérantes aux herbicides dites « VrTH » (Clearfield et Clearfield Plus ou ExpressSun, respectivement). Mais l'utilisation mal raisonnée de ces substances a contribué à l'évolution de résistances chez l'ambrosie. Les premiers cas observés remontent à 2013 (Délye *et al.*, 2015). Les tests biologiques de sensibilité aux herbicides sont longs et complexes chez l'ambrosie, à cause notamment de la maturité tardive et de la dormance des semences. De ce fait, cette espèce a été choisie pour effectuer la preuve de concept du diagnostic de résistances aux phytosanitaires par SHD.

Recherche de résistance liée à l'ALS : un échantillonnage sans précédent !

Des prélèvements ont été effectués sur 219 parcelles agricoles avec de fortes densités d'ambrosie à travers la France (Figure 2). Chaque prélèvement consistait en 50 feuilles, chacune prélevée sur une plante différente. C'est donc un total de 10 950 plantes qui ont été échantillonnées. L'ADN de ces échantillons a été extrait sur les mélanges de 50 feuilles (une extraction par lot de 50 feuilles), puis trois fragments du gène de l'ALS ont été amplifiés par PCR. Ces trois fragments portent tous les codons auxquels sont attendues des mutations pouvant conférer une résistance (Figure 3). Les échantillons ont ensuite été séquencés en utilisant la technologie Illumina, qui fait partie des techniques de SHD. Quinze codons de l'ALS ont été ciblés par nos analyses. Huit peuvent porter des mutations déjà connues pour conférer une résistance aux herbicides chez des adventices (Tranel *et al.*, 2020). Sur les sept autres, des mutations conférant une résistance aux inhibiteurs de l'ALS en laboratoire ou chez d'autres organismes ont



été décrites dans la littérature, mais n'ont pas été signalées à ce jour chez des adventices (Duggleby *et al.*, 2008).

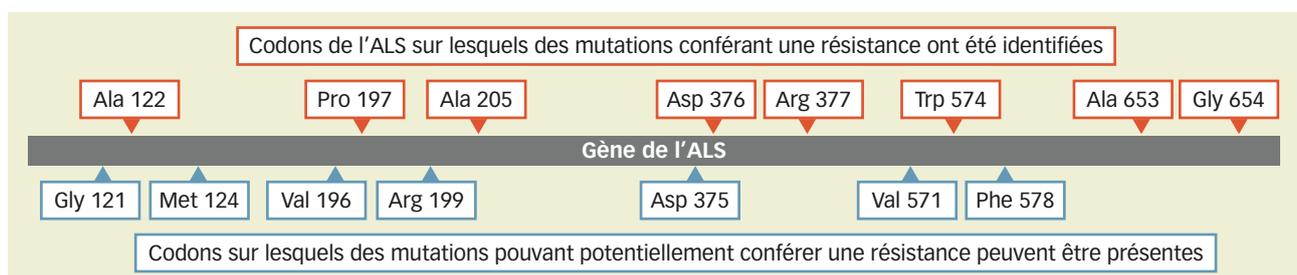
Calibrage de la méthode : le crash-test

Les analyses de SHD s'effectuent sur des lots de cinquante plantes dont l'ADN a été extrait en mélange. Pour vérifier que les fréquences de mutations détectées par SHD sont du même ordre de grandeur que celles qui seraient obtenues par séquençage de plantes individuelles, 31 échantillons « contrôlés » ont été analysés par SHD en même temps que ceux de terrain. Ces échantillons sont des lots de 50 plantes contenant chacun un nombre connu de plantes homozygotes ou hétérozygotes mutantes, de façon à obtenir

une fréquence attendue de mutation allant de 0% à 50% selon l'échantillon. La corrélation entre les fréquences attendues dans les échantillons « contrôlés » et celles observées par SHD donne une mesure de la fiabilité de la méthode. Dans notre cas, le coefficient de corrélation linéaire est de 0,979 (Figure 4), ce qui est largement suffisant pour assurer la fiabilité de la méthode. En outre, aucun faux positif n'a été identifié. L'ambrosie étant diploïde, les cinquante plantes d'un échantillon contiennent chacune deux allèles de l'ALS, soient en tout cent allèles. Les résultats montrent qu'il est possible de détecter une plante hétérozygote mutante dans un lot de cinquante individus, soit un allèle mutant sur 100 : la détection de mutations

Fig. 3 : Les deux types de mutations recherchées sur le gène de l'ALS

En rouge, la localisation des mutations dont le rôle dans la résistance a été prouvé chez des adventices. En bleu, la localisation de mutations qui pourraient être impliquées dans la résistance, mais dont le rôle reste à démontrer chez des adventices.





par SHD est donc possible et fiable pour des mutations présentes à une fréquence aussi faible que 1% dans les échantillons.

Cartographie des mutations détectées et perspectives

Cinq foyers de résistance liée à la cible identifiés

Cinq mutations, dont le rôle dans la résistance aux herbicides est établi, ont été détectées dans quinze des 219 prélèvements (Figure 2). Le foyer le plus important (douze prélèvements positifs) a été identifié en Occitanie, dans la zone d'où est originaire le premier cas signalé en France (Délye *et al.*, 2015). Une mutation au codon 205 y est particulièrement présente et des mutations aux codons 197, 574 et 654 (Figure 3) y ont également été observées. La fréquence des mutations dans les populations étudiées varie de 1% à 11,5%. Un autre foyer est situé en Centre-Val de Loire : dans le Cher, des mutations aux codons 205 et 654 ont été détectées dans un prélèvement, avec une fréquence de 4% et 1% respectivement. Un troisième foyer est présent en Bourgogne-Franche-Comté, dans l'Yonne, où une mutation au codon 654 a été détectée dans un prélèvement avec une fréquence de 3%. Un quatrième foyer provient d'Auvergne-Rhône-Alpes (en Ardèche), avec un pré-

lèvement contenant une mutation au codon 197 (différente de celle d'Occitanie) à la fréquence de 2%. Enfin, un cinquième foyer a été identifié en Nouvelle-Aquitaine, dans les Deux-Sèvres, avec trois prélèvements positifs où une mutation sur le codon 578 a été détectée avec une fréquence allant de 1,5 à 5%. Il s'agit dans ce cas d'une mutation potentiellement impliquée dans la résistance, mais dont le rôle reste à démontrer chez une adventice.

Aucune mutation sur le gène de l'ALS n'a été détectée parmi les 204 prélèvements restants. Cela ne signifie pas pour autant qu'il n'y a pas de résistance liée à la cible dans les régions échantillonnées, mais simplement que nous n'en avons pas trouvée dans notre échantillonnage. Rappelons que l'étude n'a concerné « que » 10950 plantes sur les millions qui sont présentes dans les zones étudiées. Il est donc possible qu'une mutation présente avec une très faible fréquence dans les populations échantillonnées ou qu'une mutation présente dans une population non échantillonnée n'ait pas été détectée.

En outre, la présence de résistance non liée à la cible n'a pas été recherchée par ce test.

10950 plantes à analyser ? C'est possible avec le SHD

Pour réaliser ce travail, nous avons analysé 10950 plantes. La même étude réalisée par séquençage « classique » (méthode dite « Sanger », Figure 1) aurait nécessité d'extraire l'ADN de chacune de ces plantes individuellement, puis d'amplifier par PCR les trois fragments de l'ALS à partir de chaque extraction, et enfin de séquencer individuellement les fragments obtenus. Cela aurait impliqué de réaliser 10950 extractions, 32850 PCR et 32850 réactions de séquençage « Sanger »... Autrement dit, mission impossible !

Avec le SHD, il a suffi de réaliser 219 extractions d'ADN (une extraction par prélèvement de cinquante plantes), 657 PCR pour obtenir les trois fragments de l'ALS et une réaction de SHD avec la technologie Illumina pour obtenir les mêmes données. Le gain de temps obtenu est donc considérable.

Cinq mutations ont été détectées dans quinze des 219 prélèvements.



^ 2. Infestation d'ambrosie dans du soja. > 3 et 4. Infestations d'ambrosie dans du tournesol.



Qu'en est-il de la détection de la résistance non liée à la cible ?

Chez l'ambrosie, la résistance non liée à la cible (par exemple : détoxification exacerbée des herbicides) semble bien plus répandue que la résistance liée à la cible (Délye *et al.*, 2015, (Meyer *et al.*, 2020 ; voir article p. 34). Les mécanismes de résistance non liée à la cible n'ont pas été recherchés dans cette étude. En effet, pour pouvoir développer un test « ADN » de détection de ce type de résistance, il faut connaître non seulement les gènes en cause, mais aussi les mutations qui confèrent une résistance. Or, les gènes des mécanismes de résistance non liés à la cible sont encore inconnus chez l'ambrosie. Un travail de thèse conjoint entre l'Inrae, l'Anses et l'Acta est actuellement en cours sur ce sujet. Son but est de contribuer au développement d'outils moléculaires à haut débit pour la détection des résistances non liées à la cible chez l'ambrosie.

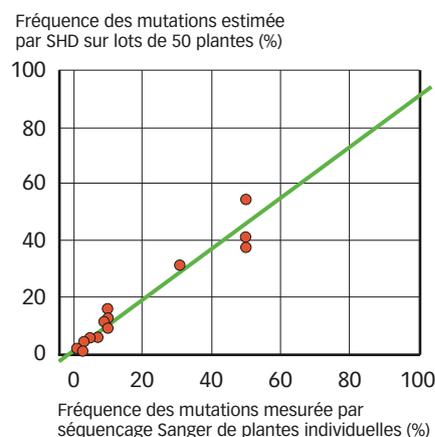
Une technique universelle

Cette étude a montré l'intérêt du SHD pour le diagnostic rapide de résistances aux inhibiteurs de l'ALS chez l'ambrosie. Mais les possibilités ne s'arrêtent pas là : ce qui a été possible pour l'ambrosie l'est aussi pour d'autres espèces. Le diagnostic par SHD peut tout aussi bien s'appliquer à d'autres espèces d'adventices chez lesquelles les mutations en cause dans la résistance sont connues, et les parcelles concernées nombreuses. On peut penser, par exemple, aux résistances aux inhibiteurs de l'ALS et de l'AC-Case (groupe HRAC A) chez les graminées ou aux résistances aux inhibiteurs de l'ALS chez le coquelicot ou les matricaires. Cette technique peut aussi être utilisée pour détecter

Ce qui a été possible pour l'ambrosie le sera pour d'autres bioagresseurs.

l'émergence d'une résistance. Il suffit dans ce cas d'analyser plus d'individus par parcelle, afin de pouvoir détecter de très faibles fréquences de résistants. En effet, plus une résistance est détectée précocement, moins il est difficile de se débarrasser des individus résistants. Enfin, au-delà des adventices, le diagnostic par SHD peut concerner tout bioagresseur (insecte, micro-organisme...) chez lequel une ou des mutations en cause dans une résistance à des phytos est connue. La seule limite à son emploi pourrait bien être la capacité à collecter les prélèvements sur le terrain. Si notre étude sur l'ambrosie a nécessité deux « runs » (unités de séquençage) de SHD Illumina pour analyser 219 prélèvements, les nouveaux développements de cette technologie permettent d'envisager de passer cent fois ce nombre de prélèvements sur un seul « run ».

Fig. 4 : Comparaison des fréquences des mutations dans le gène de l'ALS obtenues par analyse de plantes individuelles par séquençage Sanger ou par analyse par SHD (séquençage à haut débit) de populations (cinquante plantes)



POUR EN SAVOIR PLUS

CONTACT : christophe.delye@inrae.fr

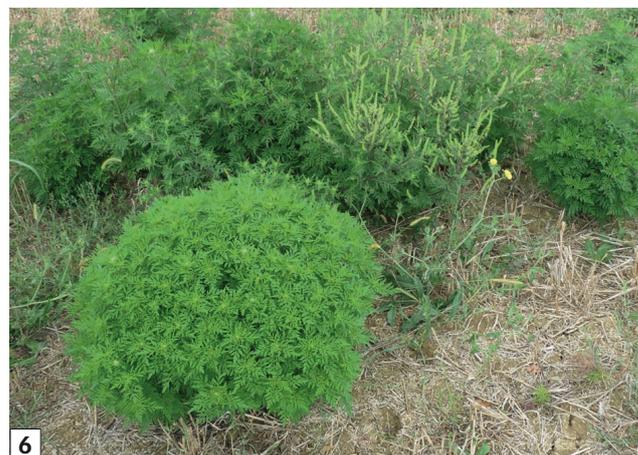
BIBLIOGRAPHIE : - Délye C., Meyer L., Causse R., Pernin F., Michel S. & Chauvel B., 2015, Résistances aux herbicides : les estivales en force ! *Phytoma* n° 689, p. 39-42.

- Duggleby RG., McCourt JA., & Gaddat LW., 2008, *Plant Physiology and Biochemistry* n° 46 (2008), p. 309-324.

- R4P (Réseau de réflexions et de recherches sur les résistances aux pesticides), 2020, Prévenir et gérer les résistances aux produits phyto, *Phytoma* n° 733, p. 15-20.

- Tranel PJ., Wright TR. & Heap IM., 2020, Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. <http://www.weedscience.com>

REMERCIEMENTS La mise au point de la technique de SHD et la partie des analyses réalisées à l'Inrae de Dijon ont bénéficié d'un soutien de l'Agence française pour la biodiversité, dans le cadre du plan d'action national *Écophyto*, et de BASF France SAS. L'échantillonnage et les analyses réalisées à l'USC Casper ont bénéficié d'un financement Anses via la taxe sur les ventes de produits phyto. Le produit de cette taxe est affecté à l'Anses pour financer la mise en place du système de surveillance des effets néfastes des produits phytopharmaceutiques, appelé « phytopharmacovigilance » (PPV), institué par la loi française du 13 octobre 2014 sur l'avenir de l'agriculture.



5. Ambrosie dans une culture de blé. 6. Ambrosie en boule sur chaume de blé non travaillé.



Résistance de l'ambrosie : état des lieux et préconisations

La résistance non liée à la cible prédomine chez l'ambrosie à feuilles d'armoise. Il existe des solutions pour réduire le risque d'émergence tout en gérant cette adventice allergène.

LUCIE MEYER*, **INGVILD LOUBET****, **SÉVERINE MICHEL****, **ALAIN RODRIGUEZ***** ET **CHRISTOPHE DÉLYE****

*BASF France Division Agro - Écully. **Inrae - UMR Agroécologie - Dijon. ***Acta - Station inter-instituts - Baziège.

Des tests de sensibilité aux herbicides inhibiteurs de l'ALS (HRAC⁽¹⁾ B) effectués de 2013 à 2019 sur plus de 80 parcelles ont permis d'identifier des foyers de résistance chez l'ambrosie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia* L.) en Auvergne-Rhône-Alpes, Centre-Val de Loire, Nouvelle-Aquitaine et Occitanie. Mauvaise nouvelle supplémentaire : l'essentiel de la résistance est de type non lié à la cible. Toutefois, le risque de résistance peut être réduit en alternant, combinant et diversifiant les pratiques de désherbage. Les mêmes mots-clés (alterner, combiner, diversifier) valent pour la gestion de l'ambrosie quand la résistance est présente.

État des lieux

Surveiller la résistance : une tâche de longue haleine

Le plan de surveillance biologique du territoire (article L. 251-1 du code rural et de la pêche maritime) a pour objectif de « s'assurer de l'état sanitaire et phytosanitaire des végétaux, et de suivre l'apparition des effets non intentionnels des pratiques agricoles sur l'environnement », y compris les résistances aux produits de protection des plantes chez les bioagresseurs. L'ambrosie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia* L.) fait



Photo : C. Délye - Inrae

< Culture de tournesol dans une mer d'ambrosie en floraison.

partie des espèces ciblées. Cette adventice, largement présente en milieu cultivé, pose un problème de santé publique majeur en raison de son pollen allergène et allergisant. Elle infeste principalement les cultures d'été (tournesol, soja et maïs, photo 1). L'implantation de variétés de tournesol rendues tolérantes aux herbicides inhibiteurs de l'ALS, dites « VrTH » (Clearfield et Clearfield Plus tolérantes à l'imazamox ; Express Sun tolérante au tribénuron) permet de contrôler chimiquement l'ambrosie dans cette culture. Mais pour permettre un contrôle durable de l'ambrosie, les inhibiteurs de l'ALS doivent impérativement être associés à des « bonnes pratiques » agronomiques.

L'usage non raisonné et systématique de ces herbicides a en effet sélectionné des résistances chez l'ambrosie. Les premiers cas en France ont été détectés en 2013 (Délye *et al.*, 2015). Afin de préserver l'efficacité des inhibiteurs de l'ALS utilisables contre l'ambrosie, il est indispensable de connaître l'étendue et la nature de cette résistance, et de promouvoir des stratégies de gestion durables.

(1) La classification HRAC (Herbicide Resistance Action Committee) répertorie les substances actives herbicides selon leur mode d'action.

RÉSUMÉ

▮ **CONTEXTE** - L'ambrosie à feuilles d'armoise est une espèce envahissante et adventice des cultures. Un premier cas de résistance aux inhibiteurs de l'ALS avait été identifié en France en 2013. Cet article présente la situation actuelle de la résistance à ce mode d'action chez l'ambrosie en France, ainsi qu'une description des techniques culturales à risque, et dresse une liste de

préconisations pour la gestion durable de cette espèce.

▮ **RÉSULTATS** - Quatre-vingt-sept parcelles à risque en termes de résistance ont été analysées. Deux inhibiteurs de l'ALS (imazamox et tribénuron) ont été testés. Sur les 85 parcelles testées avec l'imazamox, 26 sont concernées par la résistance. Sur les 35 testées avec

le tribénuron, 23 sont concernées. Les fréquences de plantes résistantes observées pour ces deux inhibiteurs de l'ALS vont de 2% à 72,5%. En outre, la résistance non liée à la cible (exemple : « détoxification ») est prédominante. L'analyse des itinéraires techniques montre qu'une faible diversité de pratiques culturales (rotations courtes, gestion chimique non raisonnée...) a

favorisé l'émergence de ces résistances. La solution, en prévention comme en gestion de la résistance, se résume en trois mots : alterner, combiner et diversifier les pratiques de désherbage.

▮ **MOTS-CLÉS** - *Ambrosia artemisiifolia* L., ambrosie à feuilles d'armoise, herbicides inhibiteurs de l'ALS, résistance, mutations.



Échantillonnage de graines d'ambrosie de 2013 à 2019, tests herbicides effectués et prévalence de la résistance à l'imazamox et/ou au tribénuron

Année	Nombre de parcelles échantillonnées	Nombre de populations testées avec l'imazamox (Pulsar 40)	Nombre de populations testées avec le tribénuron (Express SX)	Nombre de parcelles où la résistance est présente		
				À l'imazamox uniquement	Au tribénuron uniquement	À l'imazamox et au tribénuron
2013	6	6	1	0	0	1
2014	17	17	3	1	0	1
2015	13	13	0	0	0	0
2016	15	15	0	13	0	0
2017	21	21	17	2	11	5
2018	8	8	7	1	3	1
2019	7	5	7	1	1	0
Total	87	85	35	18	15	8

À la recherche des ambrosies résistantes

De 2013 à 2019, des semences mûres d'ambrosie (photo 2) ont été collectées sur 87 parcelles situées dans des zones à risque en termes de résistance, c'est-à-dire où les cultures de printemps/été, favorables au développement de l'ambrosie, sont majoritaires. Les parcelles ciblées étaient implantées en tournesol VrTH ou en soja, et les inhibiteurs de l'ALS y étaient fréquemment utilisés dans les rotations. Les tests de sensibilité aux inhibiteurs de l'ALS (voir tableau) ont été réalisés en serre à l'Inrae de Dijon. Les deux spécialités les plus utilisées pour lutter contre cette espèce, le Pulsar 40 (imazamox) et l'Express SX (tribénuron), ont été appliquées en une seule fois à la dose maximale autorisée au champ (Pulsar 40 : 1,25 l/ha + adjuvant Dash HC à 1,25 l/ha ; Express SX : 60 g/ha + adjuvant Trend 90 à 0,25 l/ha). Le phénotype des plantes testées a été noté un mois après traitement pour déterminer la fréquence de plantes résistantes dans chaque parcelle (Figure 1).

Il existe deux types de résistances : la résistance liée à la cible (RLC), due à des mutations dans le gène de la cible de l'herbicide (ici, l'ALS), et la résistance non liée à la cible (RNLC), due à d'autres mécanismes (exemple : détoxification exacerbée des herbicides).

La RLC ne concerne que des herbicides agissant sur cette cible, c'est-à-dire un seul mode d'action. En revanche, la RNLC peut concerner des substances avec des modes d'action différents (R4P, 2020). Afin de déterminer le type de résistance en cause dans les parcelles étudiées, le gène de l'ALS des plantes ayant survécu aux herbicides appliqués a été systématiquement séquencé afin d'y rechercher les mutations connues pour conférer une résistance.

Dix départements touchés par la résistance

Sur les 87 parcelles à risque étudiées, 41 sont concernées par la résistance à l'imazamox

et/ou au tribénuron (tableau). Elles sont réparties dans dix départements de quatre régions : Occitanie (Ariège, Lot, Tarn et Tarn-et-Garonne), Auvergne-Rhône-Alpes (Isère et Rhône), Nouvelle-Aquitaine (Charente et Deux-Sèvres), et Centre-Val de Loire (Cher et Indre-et-Loire) (Figure 2). Le Tarn-et-Garonne et l'Isère sont particulièrement concernés par la résistance aux deux spécialités testées.

Quelques cas de résistance liée à la cible (RLC)...

La RLC a été détectée dans trois régions. En Auvergne-Rhône-Alpes (Isère et Rhône), une mutation au codon 205 du gène de l'ALS a été identifiée chez des plantes résistantes au tribénuron comme à l'imazamox. Elle

est présente dans trois parcelles (Figure 2) en fréquences faibles à élevées (de 5 % à 72,5%). Une mutation au codon 574 a été également détectée dans cette région dans une parcelle (une seule plante mutante) (Figure 2).

En Nouvelle-Aquitaine, mais surtout en Occitanie dans le Tarn-et-Garonne, une mutation au codon 205 différente de celle présente en Auvergne-Rhône-Alpes a été identifiée dans des plantes résistantes au tribénuron comme à l'imazamox dans trois parcelles (Figure 2), avec une fréquence de 2,5 à 16% selon la parcelle. Les mutations au codon 205 donnent donc *a priori* une résistance à la fois à l'imazamox et au tribénuron, en cohérence avec ce qui est déjà connu (Tranel *et al.*, 2020).

Fig. 1 : Tests de sensibilité à l'imazamox et au tribénuron

N, plantes traitées à la dose maximale autorisée en une seule application sur tournesol VrTH. Imazamox : N = 1,25 l/ha Pulsar 40 + 1,25 l/ha Dash HC. Tribénuron : N = 60 g/ha Express SX + 0,25 l/ha Trend 90. TNT, témoin non traité.

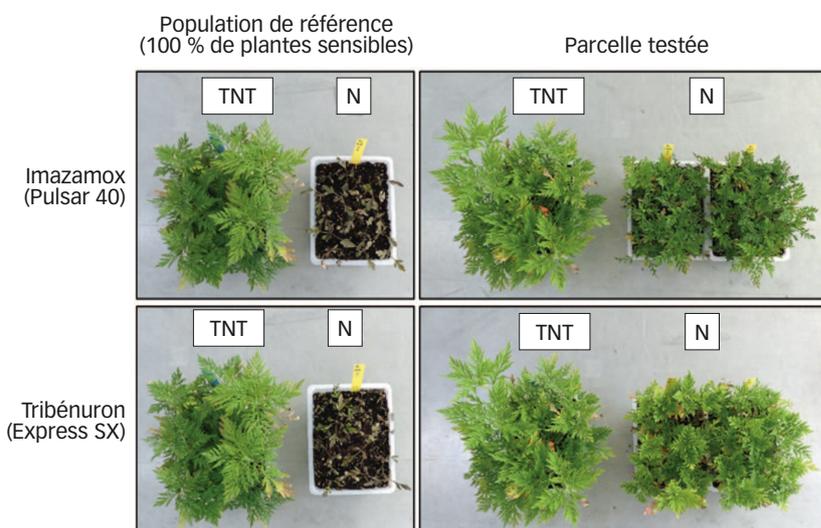
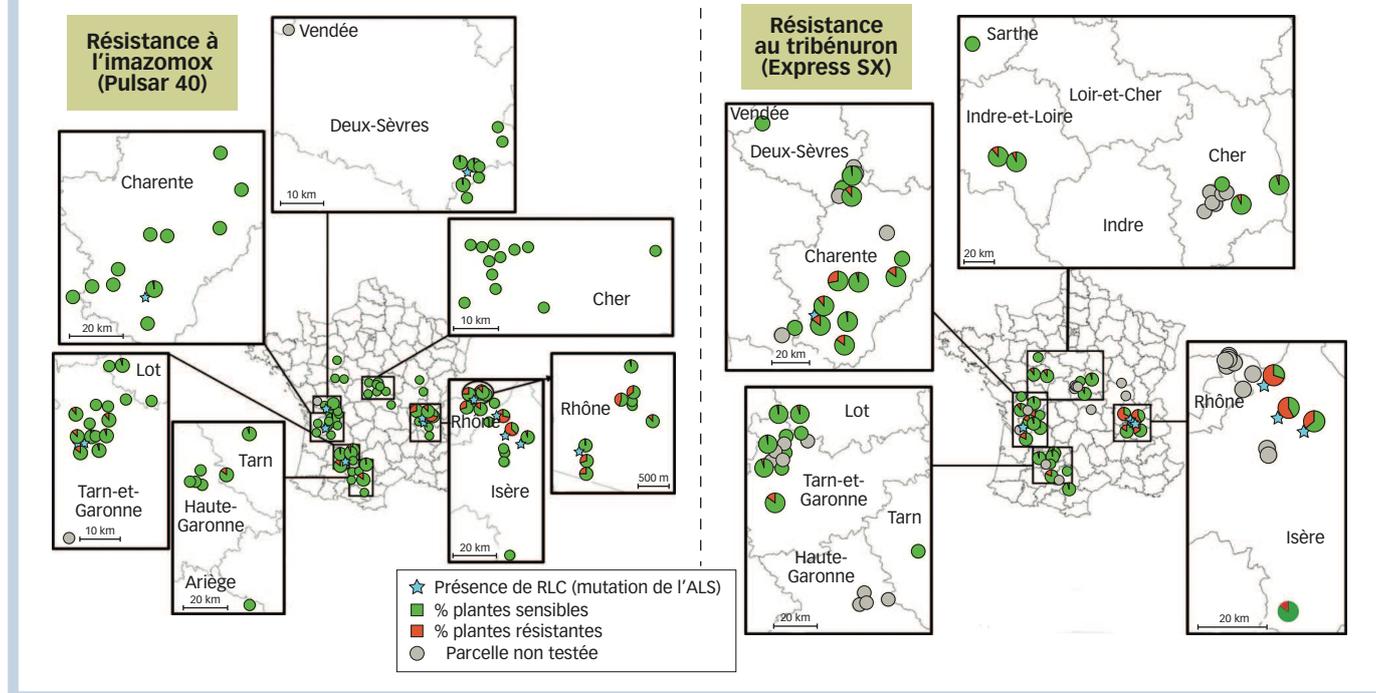




Fig. 2 : Distribution géographique des quatre-vingt-sept parcelles étudiées et prévalence de la résistance à l'imazamox (à gauche) et au tribénuron (à droite)



En Charente et dans les Deux-Sèvres, deux autres mutations (codons 376 et 197) ont été détectées, chacune dans une parcelle différente, et dans une seule plante (Figure 2). Selon la littérature (Tranel *et al.*, 2020), les mutations aux codons 376 et 574 confèrent une résistance aux deux substances actives testées, tandis que celle présente au codon 197 affecte plus fortement le tribénuron.

La résistance non liée à la cible (RNLC) domine

Les mécanismes de RLC sont minoritaires dans les parcelles étudiées : la RLC n'a été détectée que dans dix des 41 parcelles où des plantes résistantes ont été identifiées (Figure 2). Globalement, 75% des plantes résistantes identifiées ne possèdent pas de mutation de l'ALS et sont donc très probablement résistantes par des mécanismes de RNLC. La RNLC est vraisemblablement la cause la plus fréquente de résistance aux inhibiteurs de l'ALS chez l'ambrosie. Ces données confirment une étude précédente (Délye *et al.*, 2015). Ce n'est pas une bonne nouvelle. En effet, la gestion de la RNLC est complexe, puisque d'autres modes d'action que les inhibiteurs de l'ALS peuvent être concernés.

La gestion des bordures et abords des parcelles est indispensable pour éviter la propagation.

Analyse des itinéraires techniques

Une utilisation inappropriée des herbicides favorise la résistance

Les premiers cas de résistance sont souvent la conséquence d'une utilisation non raisonnée et non durable des herbicides. Il s'agit en général de désherbage exclusivement chimique et très peu diversifié,

associé à de la monoculture ou au retour fréquent de cultures « à risque » et à des pratiques culturales minimalistes (Délye, 2013). L'étude des itinéraires techniques des parcelles où la résistance aux inhibiteurs de l'ALS a été identifiée chez l'ambrosie a effectivement montré que les techniques culturales étaient simplifiées : rotations courtes (tournesol/blé ou soja/blé) ou contenant quasi exclusivement des cultures de printemps/été, voire monoculture (exemple : soja sur quatre ans

désherbé uniquement avec des inhibiteurs de l'ALS !), travail du sol réduit (peu/pas de faux semis pour diminuer la pression en ambrosie). Dans ces parcelles, le désherbage était essentiellement chimique et majoritairement à base d'inhibiteurs de l'ALS y compris à l'échelle de la rotation, avec dans quelques cas un non-respect des recom-

mandations d'utilisations des spécialités herbicides, y compris une sur-application (illégal !) visant probablement à tenter de contrôler une émergence de résistance. De telles pratiques sont en inadéquation totale avec les stratégies de gestion durables des adventices mises en avant aussi bien par les firmes que les instituts techniques ou les organismes de recherche, et ont favorisé une sélection rapide de la résistance aux inhibiteurs de l'ALS chez l'ambrosie.

Diversification, désherbage mécanique et travail du sol réduisent le risque

A contrario, les parcelles ayant une succession culturale diversifiée, intégrant notamment des cultures d'hiver (exemples : blé, orge et colza), et sur lesquelles le pro-



2 ^ Semences mûres d'ambrosie (à gauche), à ne pas confondre avec les fleurs mâles fanées (à droite).

Photo : B. Chauvel - Inrae



gramme de désherbage ciblant l'ambrosie fait intervenir plusieurs modes d'action (pas de « tout ALS ») sont peu ou pas affectées par la résistance. Ainsi, une rotation de type tournesol VrTH/orge/blé tendre introduit des cultures d'hiver qui perturbent le cycle de l'ambrosie, tandis qu'un programme pré-/post-levée (dans ce cas d'étude, un herbicide du groupe HRAC F1 en PRE et un mélange HRAC F3+B en POST) sur tournesol cumulé avec l'emploi d'autres modes d'action (exemple : « auxiniques » [HRAC O] en céréales) permet de diversifier la chimie. Sur ce type de parcelles, les tests de l'Inrae ont montré un contrôle total de l'ambrosie (100% des plantes détruites à la dose recommandée des deux inhibiteurs de l'ALS testés). Attention, ces résultats ont été obtenus par application de la pleine dose de ces herbicides sur des plantes toutes au stade physiologique recommandé pour l'application (4 vraies feuilles). Au champ, les levées échelonnées d'ambrosie font que l'efficacité d'une application en post-levée d'inhibiteurs de l'ALS effectuée seule est rarement de 100% : certaines plantes peuvent être trop développées au moment du traitement, et d'autres peuvent lever après que les spécialités ont été appliquées. Pour cette raison, il est important d'associer plusieurs pratiques (programme pré/post, désherbage mécanique, possibilité de fractionner en demi-dose en respectant les recommandations [appliquer les deux demi-doses !], choix de la succession culturale...) pour optimiser le contrôle de l'ambrosie sur la durée dans ces cultures, en particulier en situation de forte infestation.

Prévention : réduire le risque de résistance

Empêcher par tous les moyens la prolifération de l'ambrosie

Pour éviter la sélection de résistances aux herbicides chez l'ambrosie, il faut juguler la démographie de cette espèce en employant tous les leviers agronomiques : succession culturale, désherbage mécanique, désherbage chimique. Au niveau de la succession des cultures, l'inclusion de cultures d'hiver permet de « casser » le cycle de développement de l'ambrosie. Les semences d'ambrosie étant viables une dizaine d'années dans le stock semencier, il faut absolument éviter de les enfouir (pas de labour). Si le stock semencier est constitué, il est nécessaire d'implanter des successions culturales longues et variées incluant le plus possible de cultures défavorables à l'ambrosie (cultures d'hiver, cultures très compétitives) pour l'amenuiser, en tenant compte des contraintes pédoclimatiques locales. Avant l'implantation des cultures de printemps dont le tournesol, le faux semis (travail fin et rappuyage léger du sol) permettra une levée homogène des ambrosies qui pourront être détruites



Photo : C. Bègue - Inrae

3 ^ Plantes d'ambrosie en fleur dans des chaumes de blé non entretenus.

par des moyens mécaniques ou chimiques. L'ambrosie est peu compétitive, un interrang le plus réduit possible est donc à privilégier. Une culture avec couvert associé (luzerne...) est aussi un levier efficace pour limiter le développement de l'ambrosie. Après une céréale d'hiver, l'ambrosie peut se développer et grainer dans les chaumes (photo 3) si ceux-ci ne sont pas entretenus correctement. L'interculture doit donc être gérée de préférence par du déchaumage mécanique très superficiel (deux passages à deux-trois semaines d'intervalle). En zone « ambrosie », il sera préférable de reporter l'implantation des couverts à la fin de l'été pour optimiser les déstockages en période estivale. La gestion des bordures et abords des parcelles est indispensable pour éviter la propagation de l'ambrosie : réaliser plusieurs fauchages ou broyages avant sa floraison. Enfin, il faut récolter les parcelles infestées en dernier et nettoyer soigneusement le matériel de récolte à la sortie de ces parcelles pour éviter la dispersion des semences.

Une diversification valable pour la chimie

Contre l'ambrosie, il n'y a pas que les herbicides inhibiteurs de l'ALS. Des substances appartenant à cinq autres modes d'action ont une efficacité relativement satisfaisante contre cette espèce (note commune inter-instituts, 2019). L'application d'un herbicide non sélectif est une alternative au levier mécanique pour la destruction de l'ambrosie en interculture (ne pas utiliser d'inhibiteurs

de l'ALS !) même si la situation risque de se compliquer à partir de janvier 2021 avec l'interdiction programmée du glyphosate. Si le précédent cultural est une culture d'hiver, il est impératif de contrôler le développement des ambrosies dans les chaumes : intervenir tôt et avant floraison de l'ambrosie. En tournesol et soja, si une destruction mécanique n'est pas envisageable, utiliser systématiquement un herbicide de prélevée tel que le métobromuron (HRAC C2) avant d'employer un inhibiteur de l'ALS, notamment pour détruire les levées d'ambrosie après un faux semis. La pendiméthaline (HRAC K1) et le diméthénamide (HRAC K3) associés au métobromuron apporteront un complément d'efficacité sur ambrosie tout en diversifiant les modes d'action et en élargissant le spectre d'action sur renouées, morelles, mercuriales, pensées, véroniques, amarantes, chénopodes et PSD (panics, sétaires, digitaires).

Il est possible d'utiliser les inhibiteurs de l'ALS en l'absence de résistance à ce mode d'action. Ces herbicides sont très efficaces contre l'ambrosie en post-levée du tournesol ou du soja. L'imazamox est autorisé sur soja ou tournesol (uniquement les VrTH Clearfield ou Clearfield Plus) et le tribénuron sur tournesol (uniquement les VrTH Express Sun). Pour ces variétés de tournesol, deux modalités d'application sont possibles : application unique à la pleine dose homologuée au stade 4 feuilles des ambrosies, ou deux applications en fractionnement demi-doses. Dans ce cas, la première application est à effectuer au stade 2-4 feuilles des ambrosies et doit obligatoirement être suivie huit à dix jours plus tard par la deuxième application. N'effectuer qu'une seule application à la demi-dose ou fractionner le produit différemment sont deux mauvaises pratiques qui augmentent fortement le risque de sélectionner de la RNLC aux inhibiteurs de l'ALS. Enfin, si des VrTH de tournesol et/ou du soja sont présents dans la rotation, il faut utiliser d'autres modes d'action pour la gestion des dicotylédones (dont l'ambrosie) en cultures d'hiver et maïs, tels que les tricétones (HRAC F2), les auxiniques (HRAC O) ou la bentazone (HRAC C3) afin de réduire le risque de sélectionner des résistances. De plus, le strict respect des doses et des usages recommandés pour tous les herbicides est incontournable.

Dernier point, le désherbinage qui combine le désherbage chimique dans le rang et mécanique dans l'interrang permet de réduire le risque de sélection de résistance en exposant seulement une partie des plantes présentes dans la parcelle aux herbicides. On améliore considérablement l'efficacité de ce désherbage « mixte » en faisant deux passages pour se positionner dans les conditions météorologiques optimales pour le désherbage chimique (conditions fraîches

matinales) et mécanique (conditions sèches de fin d'après-midi) (Terres Inovia, 2020).

Gestion de la résistance

Quelles adaptations supplémentaires du désherbage en cas de résistance ?

En cas de résistance avérée de l'ambrosie aux inhibiteurs de l'ALS, l'emploi de ce mode d'action pour contrôler cette espèce est à proscrire pour ne pas aggraver la situation (N. B. : Si l'emploi d'un inhibiteur de l'ALS est absolument nécessaire pour contrôler d'autres adventices que l'ambrosie, il faudra s'assurer que l'ambrosie est totalement détruite par d'autres moyens : mécaniques, chimiques...). Il faudra également réduire la fréquence de retour du tournesol dans la rotation (pas plus d'une fois tous les cinq ans) et décaler sa date de semis à fin avril-début mai. À part cela, toutes les autres recommandations précédentes sont à suivre. Il faut garder en tête que, pour préserver l'efficacité du désherbage dans la durée, il faut diversifier au maximum la succession culturale et alterner ou combiner le plus de pratiques agronomiques non chimiques et chimiques possible.

La clé du succès ?
Alterner,
combiner et
diversifier les
pratiques
de désherbage.

POUR EN SAVOIR PLUS



CONTACTS : lucie.meyer@basf.com
christophe.delye@inrae.fr

LIEN UTILE : <https://www.r4p-inra.fr/fr/home/>



BIBLIOGRAPHIE : - Délye C, 2013, Adventices : tour d'horizon des résistances, *Phytoma* n° 669, p. 24-29.

- Délye C, Meyer L, Causse R, Pernin F, Michel S & Chauvel B, 2015. Résistances aux herbicides : les estivales en force ! *Phytoma* n° 689, p. 39-42.

- Note commune inter-instituts pour la gestion des résistances des adventices aux herbicides en grandes cultures, 2019. Disponible sur : <https://www.r4p-inra.fr/fr/la-note-commune-herbicides-est-en-ligne/>

- R4P (Réseau de réflexions et de recherches sur les résistances aux pesticides), 2020, Prévenir et gérer les résistances aux produits phyto, *Phytoma* n° 733, p. 15-20.

- Terres Inovia, projet PLEVOP, com. pers., 2020.

- Tranel PJ, Wright TR, Heap IM, 2020, Mutations in herbicide-resistant weeds to ALS inhibitors. <http://www.weedscience.com/Pages/MutationDisplayAll.aspx>

REMERCIEMENTS Les auteurs remercient chaleureusement toutes les personnes sur le terrain qui ont collecté et envoyé des semences d'ambrosie à l'Inrae pour les tests de sensibilité aux herbicides. Cette étude a été financée par BASF (contrat de recherche Inrae-BASF 29000868) et par la surveillance biologique du territoire (SBT) entrant dans le cadre du plan Écophyto 2 (circulaire CAB/C2009-002 du 4 mars 2009).