



HAL
open science

La résistance du colza à la hernie peut-elle être modulée par la fertilisation azotée ?

Yoann Aigu

► **To cite this version:**

Yoann Aigu. La résistance du colza à la hernie peut-elle être modulée par la fertilisation azotée ?. Sciences agricoles. Université de Rennes, 2017. Français. NNT : 2017REN1B032 . tel-01822959

HAL Id: tel-01822959

<https://theses.hal.science/tel-01822959>

Submitted on 25 Jun 2018

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.

THÈSE / UNIVERSITÉ DE RENNES 1
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

pour le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE RENNES 1

Mention : Biologie

Ecole doctorale EGAAL

présentée par

Yoann Aigu

Préparée à l'unité de recherche 1349 IGEPP
Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes
UFR Sciences de la Vie et de l'Environnement

**La résistance du
colza à la hernie peut-
elle être modulée par
la fertilisation
azotée ?**

**Soutenance le 16 novembre 2017
à Rennes**

devant le jury composé de :

Laurence MOREAU

Chargé de recherche INRA / *rapporteur*

Richard BERTHOME

Chargé de recherche INRA / *rapporteur*

Jean Benoit MOREL

Directeur de recherche INRA / *examineur*

Stephen STRELKOV

Professor University of Alberta / *examineur*

Malika AINOUCHE

Professeur Université Rennes 1 / *examineur*

Maria MANZANARES-DAULEUX

Professeur Agrocampus Ouest / *directeur de thèse*

Antoine GRAVOT

Maitre de conférence Université Rennes 1 / *co-
directeur de thèse*

REMERCIEMENTS

Trois ans se sont écoulés depuis mon arrivée au sein de l'équipe « Résistance et Adaptation » de l'UMR IGEPP de l'INRA du Rheu et pourtant je me souviens encore des débuts comme si c'était hier. Pour autant, je pense pouvoir affirmer que beaucoup de choses ont changé depuis mon arrivée en tant que nouveau doctorant et c'est peu de le dire. En effet, cette aventure m'a permis de m'épanouir tant d'un point de vue professionnel que personnel, et pour cela je tenais à remercier l'ensemble des personnes que j'ai eu la chance de côtoyer de près ou de loin lors de ma thèse.

Et comment ne pas commencer par mes deux encadrants, sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu, Maria Manzaneres-Dauleux et Antoine Grivot. Je les remercie de m'avoir proposé ce sujet et surtout de m'avoir accordé leur confiance tout au long de ces trois ans, notamment dans les moments « un peu plus stressants » de la fin de thèse. J'ai également beaucoup apprécié les nombreuses discussions scientifiques que l'on a pu avoir, cela m'ayant permis d'énormément progresser autant d'un point de vue de mes connaissances que de mon raisonnement scientifique. Je retiendrais également la chance qu'ils m'ont offerte de m'impliquer dans la réflexion ainsi que dans la manière d'aborder ce projet de thèse. J'avais le sentiment d'être un élève lors de mon arrivée, mais aujourd'hui, grâce à eux, je pense être un collègue.

Je tenais également à remercier Anne Laperche, qui malgré le fait qu'elle n'apparaisse pas officiellement dans l'encadrement de ma thèse, s'est énormément impliquée dans mes travaux. En effet, elle a grandement contribué à mon apprentissage de la rédaction d'article scientifique, et ce au prix de longues sessions de correction ensemble, mais toujours avec un regard bienveillant sur mon travail, ce qui est très motivant. J'ai également beaucoup apprécié découvrir le monde des analyses génétiques à son contact.

J'aimerais également remercier l'ensemble des membres de l'équipe « Résistance et Adaptation » pour leur aide. Et tout particulièrement Christine Lariagon, Stéphanie Daval, Kevin Gazengel et Jocelyne Lemoine, qui m'ont aidé au quotidien dans mes expérimentations, et ceux peu importe l'heure de la journée ou la charge de travail à effectuer (qui parfois en aurai découragé plus d'un). Grâce à eux, et à leur bonne humeur, mes souvenirs ne sont faits que de bons moments en leur compagnie, et ce même lorsqu'un matin on a cru perdre 6 mois de travail à cause d'un lyophilisateur récalcitrant.

Je n'oublie pas non plus les membres du plateau P2M2, tout spécialement Nathalie Marnet, qui m'a initié à la métabolomique, thématique qui m'était en grande partie inconnue avant ma thèse, et que j'apprécie tout particulièrement aujourd'hui. Parmi, les personnes qui m'ont fait découvrir de nouvelles thématiques, comment ne pas remercier aussi Fabrice Legeai (IRISA), qui m'a enseigné l'art des analyses transcriptomiques et également initié à la programmation.

Un grand merci également à l'ensemble des personnes de l'équipe de recherche dirigée par Stephen Strelkov de l'université d'Alberta à Edmonton, au Canada, qui m'ont accueilli au sein de leur laboratoire durant trois mois. Je remercie tout particulièrement Ileana pour tous les bons moments de rigolade, que se soit au laboratoire, durant nos poses déjeunées, mais également leur de nos balades à la découverte de cette jolie ville d'Edmonton.

Je remercie également l'ensemble des doctorants, post-doctorants et ingénieurs que j'ai eu la chance de côtoyer au quotidien au sein du LBDF (Sylvain, Alexandre, Erwan, Benjamin, Anne-Sophie, Julie, ...). Merci pour tous ces bons moments passés au sein de ce bureau, que ce soit durant nos interminables discussions « scientifiques » agrémentées de raisonnement plus ou moins absurde ou lors de nos fous rires qui devaient s'entendre à l'autre bout du couloir. Toujours est-il, que nous avons su faire de ce bureau un lieu incontournable du bâtiment où régnait une atmosphère décontractée, avec ces habitués comme Mathieu ou encore Patrick, et j'espère qu'il le restera.

Pour finir, j'ai également une pensée pour l'ensemble des joueurs et membres du « staff » du FC Celtic INRA (Romain, Nico, Fred, Gaëtan, Sylvain, Huges, Vincent, Laurent, ...) avec qui j'ai eu le plaisir de vivre trois saisons fortes en émotions, s'achevant par une très jolie place de vice-champion cette année. Cela est bien la preuve que les entraînements du mercredi, que nous avons dû faire sur un terrain plus adapté au beach soccer qu'au football ont fini par porter leurs fruits. Je les remercie également d'avoir dû supporter ma seconde personnalité (un peu comme Docteur Jekyll et Mister Hyde) lorsque je joue au football, et qu'ils ont affectueusement appelé Yann. En parlant de football, je remercie également Bernard Rolant et Sylvain Guyot, deux amoureux de l'En Avant de Guingamp, travaillant en terre Rennaise, avec qui j'ai partagé mon amour du maillot lors de folles soirées au Roudourou, lieu de nombreux exploits sportifs. L'EAG qui restera toujours mon seul club de cœur malgré les nombreuses tentatives de Gaël Le Trionnaire de me convertir au Stade Rennais en me soudoyant avec des places gratuites pour assister à des matches au Roazhon Park.

Liste des abbréviations

Abbréviation	Définition
ABA	Acide Abscissique
ABC	ATP Binding Cassette
ACP (PCA)	Analyse en Composante Principale
APCI	Atmospheric Pressure Chemical Ionization
AS	Asparagine Synthétase
ATP	Adénosine Triphosphate
BABA	3-AminoButyric Acid
BSTFA	N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide
C	Carbone
c/iHATS	Constitutive/Inductive High Affinity Transport Systems
CEP	C-terminally Encoded Peptide
CEPD	C-terminally Encoded Peptide Downstream
CEPR	C-terminally encoded peptide Receptor
CERK	Chitin Elicitor Receptor Kinase
CLC	Chloride Channel Family
CPM	Count Per Million
CPSase	Carbamoyl Phosphate Synthétases
CR	Clubroot Resistant
CSSL	Chromosomal Segment Substitution Lines
CTPS	Comité Technique Permanent de la Détection
dai	Day After Inoculation
DAMP	Damage Associated Molecular Patterns
das	Day After Sowing
DEG	Differentially Expressed Gene
DH	Doubled Haploïde
DI	Disease Index
dpi	Day Post-Inoculation
DY	Darmor-bzh et Yudal
EDS	Enhanced Disease Susceptibility
EFR	Elongation Factor Tu Receptor
EF-Tu	Elongation Factor Tu
ESI	Electrospray Ionization
ETI	Effector Triggered Immunity
ETS	Effector-Triggered Susceptibility
Fd	Ferrédoxine
FDR	False Discovery Rate
FID	Flame Ionization Detector
FR	Iron-metalloReductase
FSC	Forwar-SCatter detector
FSD	Fe Superoxide Dismutase
G	Genotype
GABA	γ -AminoButyrique Acid
GC	Gas Chromatography

Abbréviation	Définition
GOGAT	Glutamine 2-Oxoglutarate AminoTransférase
GS	Glutamine Synthétase
GWAS	Genome-Wide Association Study
HMBG	High Mobility Group box
HR	Hypersensitive Response
HTAP	High Temperature Adult Plant
ICS	IsoChorismate Synthétase
IGEPP	Institut de Génétique Environnement et Protection des Plantes
IP	Indice Pathologique
JA	Jasmonate
LC	Liquid Chromatography
LHT	Lysine-Histidine Transporter
LRR	Leucine Rich Repeat
LYK	Lysin motif containing receptor-like Kinases
SAM (MAS)	Sélection Assistée par Marqueurs
MDS	MultiDimensional Scaling
MLM	Modèle Linéaire Mixte
MOREAZ	MOdulation de la REponse de résistAnce du colZA
mRNA	ARN messenger
MS	Mass Spectrometry
N	Nitrogen
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide réduit
NBS	Nucleotide-Binding Site
NGS	Next-Generation Sequencing
NiR	Nitrite Réductase
NIS	Nitrogen-induced susceptibility
NO	Monoxyde d'azote
NO₃⁻	Nitrate
NPF	Nitrate transporter Peptide Transporter Family
NR	Nitrate Réductase
NRT	Nitrate Transporter Family
NUE	Nitrogen Use Efficiency
OPLS-DA	Orthogonal Partial Least Square Discriminant Analysis
PAMP	Pathogen-Associated Molecular Patterns
PCNB	Pentachloronitrobenzène
PLS-DA	Partial Least Square Discriminant Analysis
PPS	Peak Picking Score
PR	Pathogen related
PROMOSOL	Association pour la Promotion de la Sélection des Plantes Oléagineuses
PRR	Pattern Recognition Receptors
PSII	Photosystem II
PTI	Patterns Triggered Immunity
qPCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
QTL	Quantitative Trait Loci
R	Résistance

Abbréviation	Définition
RCS	Retention time Correction Score
RIL	Lignées Recombinantes
RIN	RPM1 interacting protein
RKS	Resistance-related kinase
RNA-seq	RNA sequencing
ROS	Reactive Oxygen Species
rRNA	ARN ribosomique
RS	Resting spores
RUBISCO	ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygénase
SA	Salicylate
SAR	Systemic Acquired Resistance
SHMT	Sérine hydroxy-méthyl-transférase
SIM	Simple interval mapping
SLAH	Slow Anion Channel Associated Homologues
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
ST	Sulfotransferase
TDM	Total dry mass
TMM	Trimmed Mean of M-values
TSWV	Tomato spotted wilt virus
WOSR	Winter oilseed rape
WSK	Wheat Kinase Start
YSL	Nicotianamine metal transporter

Sommaire

INTRODUCTION GÉNÉRALE	1
------------------------------------	----------

CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	5
--	----------

I	LE SYSTÈME IMMUNITAIRE CHEZ LES PLANTES.....	5
I-1	La résistance totale ou le modèle en zig-zag (Jones et Dangl, 2006).....	6
I-2	La résistance quantitative	10
I-3	L'impact des facteurs abiotiques sur la résistance des plantes aux agents pathogènes.....	14
II	IMPACT DE LA FERTILISATION AZOTÉE SUR LE DÉVELOPPEMENT DES MALADIES ET LES MÉCANISMES DE RÉSISTANCE ASSOCIÉS	16
II-1	L'absorption du nitrate chez les plantes.....	16
II-2	Assimilation du nitrate	19
II-3	Réponse de la plante à la carence en nitrate.....	21
II-4	Relation entre le statut métabolique azoté de la plante et l'infection par un agent pathogène.....	21
II-5	Impact de la fertilisation azotée sur la défense des plantes.....	23
II-6	Implication des transporteurs d'azote dans l'interaction plante hôte-agent pathogène	25
III	LE PATHOSYSTÈME BRASSICA NAPUS - <i>PLASMODIOPHORA BRASSICAE</i>	26
III-1	<i>Brassica napus</i> , une espèce d'intérêt agronomique	26
III-2	<i>Plasmodiophora brassicae</i> , l'agent causal de la hernie des crucifères.....	28
III-3	Analyse moléculaire de l'interaction <i>P. brassicae</i> - <i>Brassicaceae</i>	37

CHAPITRE II : ANALYSE GÉNÉTIQUE DE L'IMPACT DE LA FERTILISATION AZOTÉE SUR LA RÉSISTANCE DU COLZA À LA HERNIE.....	44
---	-----------

PRÉAMBULE.....	44	
ARTICLE I: CLUBROOT RESISTANCE QTL ARE MODULATED BY NITROGEN INPUT IN BRASSICA NAPUS	47	
I	INTRODUCTION.....	48
II	MATERIALS AND METHODS.....	49
III	RESULTS	55
IV	DISCUSSION	59
V	SUPPLEMENTARY DATA S3: RELATIONSHIP BETWEEN PLANT GROWTH UNDER N1 CONDITION AND CLUBROOT DEVELOPMENT UNDER N1 CONDITION ON A SUBSET OF 11 HD GENOTYPES FROM THE CROSS DARMOR-BZH X YUDAL	63
VI	REFERENCES	64

ARTICLE II: NITROGEN SUPPLY EXERTS A MAJOR/MINOR SWITCH BETWEEN TWO QTL CONTROLLING PLASMODIOPHORA BRASSICAE SPORE CONTENT IN RAPESEED.....	68
I INTRODUCTION.....	69
II MATERIAL AND METHOD.....	71
III RESULTS.....	73
IV DISCUSSION.....	76
V REFERENCES.....	78
ARTICLE III: IDENTIFICATION OF WINTER AND SPRING <i>BRASSICA NAPUS</i> GENOTYPES WITH PARTIAL RESISTANCE TO CANADIAN ISOLATES OF <i>PLASMODIOPHORA BRASSICAE</i>.....	81
I INTRODUCTION.....	82
II MATERIALS AND METHODS.....	84
III RESULTS.....	85
IV DISCUSSION.....	87
V REFERENCES.....	89
CONCLUSIONS PARTIELLES.....	92
<u>CHAPITRE III : CARACTÉRISATION DE LA RÉPONSE TRANSCRIPTOMIQUE ET MÉTABOLOMIQUE LIÉ À L'AUGMENTATION DE RÉSISTANCE DU GÉNOTYPE 'YUDAL' VIS-À-VIS DE L'ISOLAT EH EN CONDITION DE FAIBLE APPORT AZOTÉ</u>	<u>94</u>
PREAMBULE.....	94
ARTICLE IV: LOW-NITROGEN CONDITIONAL RESISTANCE TO CLUBROOT IN THE <i>BRASSICA NAPUS</i> GENOTYPE 'YUDAL' IS ASSOCIATED WITH THE INDUCTION OF GENES INVOLVED IN NITRATE ASSIMILATION	96
I INTRODUCTION.....	97
II MATERIALS AND METHODS.....	99
III RESULTS.....	102
IV DISCUSSION.....	107
V CONCLUSION.....	111
VI REFERENCES.....	111
ANALYSE METABOLOMIQUE DE LA MODULATION DE RESISTANCE A LA HERNIE DU GENOTYPE 'YUDAL' PAR LA FERTILISATION AZOTEE.....	117
I MATERIEL ET METHODE.....	117
II RESULTATS.....	119
CONCLUSION PARTIELLE	125
<u>CHAPITRE IV : DISCUSSION GÉNÉRALE.....</u>	<u>126</u>

I	FERTILISATION ET RESISTANCE : APPORTS DES APPROCHES GENETIQUES	128
II	DIVERSIFICATION DES VARIABLES DE PHENOTYPAGE	131
III	UTILISATION D'APPROCHES OMIQUES POUR IDENTIFIER LES REPONSES MOLECULAIRES IMPLIQUEES DANS LA RESISTANCE A LA HERNIE	133
IV	PERSPECTIVES	136
	<u>RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</u>	140

INTRODUCTION GENERALE

INTRODUCTION GENERALE

Aujourd'hui, face à l'accroissement de la population mondiale et à l'amélioration des standards de qualité de vie, les objectifs de production de l'agriculture mondiale ne cessent d'être revus à la hausse. Compte tenu du caractère non extensible des surfaces arables, ces objectifs ne peuvent reposer que sur une augmentation et une meilleure stabilité des rendements. En parallèle, afin de réduire l'empreinte négative sur l'environnement, l'agriculture intensive actuelle amorce une transition vers des systèmes culturels plus durables à bas intrant. Cette transition s'effectue notamment sous l'impulsion de directives européennes, telles que la directive nitrate (The Nitrates Directive, Directive 91/676/CEE du Conseil, du 12 décembre 1991), dont l'objectif est de protéger la qualité de l'eau en Europe, par la promotion de pratiques culturales plus responsables visant à limiter la pollution des nappes phréatiques et des eaux de surface par les nitrates d'origine agricole. Cette transition a lieu dans un contexte où les changements climatiques entraînent de plus en plus d'anomalies climatiques ayant pour conséquence d'augmenter la fréquence et l'intensité des stress abiotiques et biotiques sur les cultures et entraînant des impacts destructeurs sur les productions.

Afin de répondre à la transition agricole bas intrant, plusieurs projets scientifiques ont été amorcés dont certains s'intéressent à comment augmenter l'efficacité d'utilisation de l'azote ou NUE ("Nitrogen Use Efficiency") afin de pouvoir réduire les apports azotés tout en augmentant le rendement des plantes particulièrement demandeuses en azote (comme par exemple le colza, Projet d'Investissement d'Avenir Rapsodyn). La diminution des apports azotés peut toutefois entraîner une contrainte nutritionnelle pouvant affecter la relation de la plante avec son environnement biotique et abiotique. Les connaissances actuelles sur la réponse de la plante à des stress multiples biotiques/abiotiques en interaction, concomitants ou séquentiels sont limitées et ne permettent pas de prédire l'effet d'un stress sur la réponse à un autre stress. Le problème se pose notamment sur l'impact potentiel d'une carence azotée sur la réponse de défense/résistance de la plante face à des bioagresseurs. La résistance génétique aux maladies est aujourd'hui une composante essentielle de la durabilité des agroécosystèmes, mais pour de nombreuses espèces végétales il n'est pas possible d'anticiper l'efficacité du déploiement de cultivars résistants sur le contrôle des épidémies dans des nouveaux agroécosystèmes en bas intrants.

Cette thèse s'insère ainsi dans le contexte scientifique d'une meilleure caractérisation et compréhension de l'effet d'une contrainte nutritionnelle, la contrainte azotée, sur la réponse de la plante aux agents pathogènes. Le modèle d'étude choisi, l'interaction Colza (*Brassica napus*)/Hernie, est particulièrement pertinent pour cette étude. Le colza est en effet une plante particulièrement demandeuse en azote et la hernie, provoquée par le protiste obligatoire *Plasmodiophora brassicae*, une des plus graves maladies des Brassica cultivées pour laquelle la

résistance variétale constitue la principale méthode de lutte. Les objectifs de ma thèse ont été de caractériser l'impact de la réduction de fertilisation azotée sur l'effet des facteurs génétiques de résistance à la hernie et d'identifier les réponses transcriptomiques et métaboliques responsables de la modulation de la réponse de résistance par la réduction de l'apport azoté.

Cette thèse a été réalisée dans l'équipe "Résistance et Adaptation" de l'IGEPP (Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, UMR 1349 INRA, AGROCAMPUS OUEST, Université de Rennes 1) sous la direction d'Antoine Gravot et de Maria Manzanares-Dauleux et, en partie, (séjour de trois mois) dans le laboratoire du Pr. Stephen Strelkov à l'Université d'Alberta (Edmonton, Canada). J'ai également bénéficié de l'expertise d'Anne Laperche (équipe Rendement sous Contraintes Abiotiques, IGEPP). Ce travail de thèse s'intègre dans l'un des objectifs de recherche de l'équipe « Résistance et Adaptation », à savoir l'identification et la compréhension des bases moléculaires et physiologiques de la réponse des plantes à leur environnement biotique, au travers d'approches de génétique structurale et fonctionnelle. Les travaux de recherche ont été financés en partie par PROMOSOL (Association pour la promotion de la sélection des plantes oléagineuses) dans le cadre du projet MOREAZ (Modulation de la réponse de résistance du colza à des agents pathogènes (hernie et phoma) en situation de contrainte azotée). J'ai bénéficié d'une bourse de trois ans de l'Université de Rennes 1, et d'une bourse de trois mois de Rennes Métropole pour mon séjour à l'Université d'Alberta.

Dans le premier chapitre de ce manuscrit de thèse, afin de replacer le contexte socioéconomique et scientifique dans lequel s'inscrit ma thèse, sera présenté une synthèse bibliographique faisant un état des lieux des connaissances actuelles sur (i) le système immunitaire des plantes, (ii) l'impact de la fertilisation azotée sur le développement des maladies et les mécanismes de résistance associés ainsi que (iii) la description du pathosystème étudié *Brassica napus* - *Plasmodiophora brassicae*. Les résultats obtenus feront l'objet des Chapitres II et III, où ils seront présentés sous forme de quatre articles, dont un publié et un soumis pour publication. Une discussion générale de l'ensemble des travaux sera proposée dans le chapitre IV.

Objectifs et stratégies de la thèse

La transition agricole qui s'amorce actuellement en France, des systèmes de culture intensifs vers des systèmes plus durables (notamment des systèmes bas intrants), constitue un défi majeur pour la création variétale, notamment en ce qui concerne le développement de variétés portant des résistances génétiques aux agents pathogènes. En effet, il existe aujourd'hui plusieurs exemples de modulation de l'efficacité de ces résistances par des facteurs environnementaux. En ce qui concerne l'impact de la fertilisation azotée sur la résistance aux agents pathogènes, les résultats des différentes études réalisées sur plusieurs espèces végétales, ainsi que plusieurs agents

pathogènes, mettent en évidence des résultats contradictoires quant au sens de la modulation non seulement entre pathosystèmes mais aussi au sein d'un même pathosystème. Résultats contradictoires que l'on observe également dans le cas de la résistance de *B. napus* à la hernie. Ces désaccords entre études pourraient être expliqués par le fait que l'impact de la fertilisation azotée puisse différer selon le génotype de la plante hôte et/ou l'isolat de l'agent pathogène.

Dans ce contexte, mon travail de thèse s'est attaché à répondre aux questions suivantes :

1. La modulation de la résistance à la hernie par la réduction de l'apport azoté est-elle génotype de colza/isolat de *P. brassicae* dépendante ?
2. Y-a-t-il un effet de la réduction des apports azotés sur l'architecture génétique de la résistance à la hernie chez le colza ?
3. Quels sont les mécanismes transcriptomiques, métaboliques impliqués dans la réduction du développement des symptômes de la hernie en condition de faible apport azoté ?

Dans la première partie de cette étude, nous avons étudié la réponse de différents génotypes de colza (provenant d'origines diverses) vis-à-vis de plusieurs isolats de *P. brassicae* européens et canadiens, en deux conditions de fertilisation azotée (8 mM de nitrate, correspondant à la condition standard des tests hernie et 1 mM de nitrate, correspondant à une condition carencée), afin d'identifier d'éventuels patterns de modulation de la réponse du colza à la hernie par l'azote. Nous avons ensuite étudié le contrôle génétique du développement des symptômes lors de l'infection par *P. brassicae* chez le colza, en conditions différentielles d'apport azoté (8 mM de nitrate et 1 mM de nitrate). Deux analyses ont été réalisées : une par génétique de liaison chez une population d'haploïdes doublés (issue du croisement entre deux génotypes au comportement contrasté, Darmor-*bzh* et 'Yudal') et une par génétique d'association chez un panel de diversité de colza d'hiver en utilisant deux isolats européens de *P. brassicae* (eH et K92-16). De façon originale, nous avons également identifié les facteurs génétiques contrôlant la quantité de spores de repos de *P. brassicae* produites par plante sous différents apports azotés, un trait d'histoire de vie encore peu étudié chez *P. brassicae*, mais dont la prise en compte est essentielle pour la durabilité des résistances. Le développement d'une nouvelle méthode de quantification des spores de repos basé sur la cytométrie en flux, mise au point au laboratoire, a permis de réaliser cette étude sur la population d'haploïdes doublés (issue du croisement entre Darmor-*bzh* et 'Yudal') inoculée par l'isolat eH de *P. brassicae*.

Dans la deuxième partie de la thèse, nous avons étudié les réponses transcriptomiques et métabolomiques impliquées dans la réduction du développement des symptômes de la hernie

Introduction générale

observée chez un génotype en condition de faible apport azoté. Cette étude a été réalisée en associant des méthodes de RNA-seq et de métabolomique ciblée et non ciblée. Pour cela, nous avons comparé les réponses du génotype 'Yudal', dont les symptômes sont réduits en condition 1 mM de nitrate lors de l'infection par l'isolat eH, avec celles du génotype HD018 (un haploïde doublé issu de la population utilisée pour les analyses génétiques), dont le développement des symptômes est identique en condition 1 mM et 8 mM de nitrate. Ces comparaisons ont été effectuées selon plusieurs combinaisons de facteurs tels que l'inoculation, la fertilisation azotée et le temps après inoculation.

CHAPITRE I

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

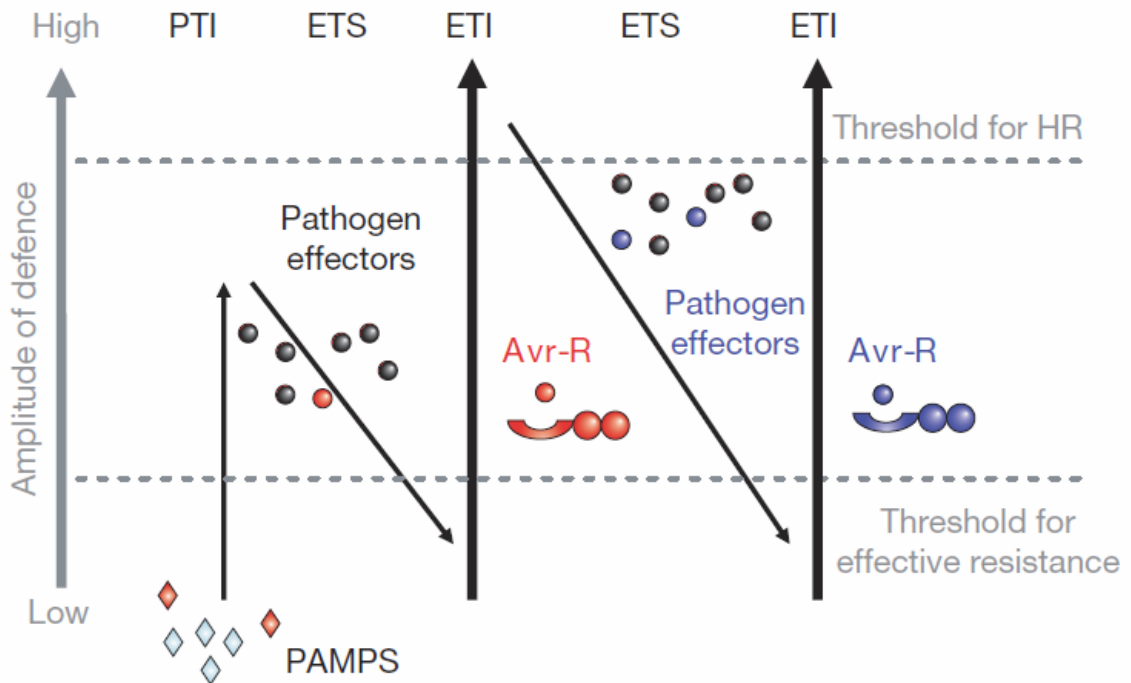


Figure 1: Le modèle en zig-zag de Jones et Dangl (2006), illustrant la résistance totale.

Lors de la phase 1, la plante détecte les MAMPs/PAMPs (losanges rouges), grâce aux PRR et déclenche alors la PTI. En phase 2, l'agent pathogène sécrète des effecteurs qui interfère avec la PTI, afin de permettre au pathogène de se développer et de se multiplier, conduisant à l'ETS. Durant la phase 3, un effecteur (rond rouge) est reconnu par une protéine de type NBS-LRR, ce qui entraîne l'activation de l'ETI. L'ETI correspond à une amplification de la réponse PTI, qui aboutie à une réponse de type HR. En phase 4, la pression de sélection imposée par la reconnaissance de l'effecteur (rond rouge) entraîne une perte ou une modification de cet effecteur, qui n'est alors plus reconnu, ce qui entraîne une nouvelle ETS. Enfin, en phase 5, une nouvelle protéine de type NBS-LRR reconnaît un nouvel effecteur (rond bleu), ce qui entraîne le déclenchement de l'ETI.

MAMPs/DAMPs: microbial/pathogen-associated molecular patterns; **PRR:** pattern recognition receptor; **PTI:** PAMP-triggered immunity; **ETS:** effector triggered susceptibility; **ETI:** effector-triggered immunity; **HR:** hypersensitive response

CHAPITRE I : INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I Le système immunitaire chez les plantes

Dans leur environnement naturel, les plantes sont continuellement exposées à de nombreux stress biotiques, causés par une large gamme d'agents pathogènes (bactéries, champignons, virus, insectes, nématodes...), qui altèrent leur survie et leur reproduction. La dynamique d'interaction entre les agents pathogènes et leurs plantes hôtes est le résultat de millions d'années de coévolution. La relation entre ces deux organismes est souvent décrite comme une "course à l'armement", au cours de laquelle l'objectif de la plante est de rester saine et fertile, et celui de l'agent pathogène est d'utiliser les ressources de la plante afin de terminer son cycle de vie, que ce soit en tuant les cellules de la plante (nécrotrophe) soit en les gardant en vie au moins jusqu'aux derniers stades de l'infection (biotrophe et hémibiotrophe). Il existe deux principaux types de relation entre les plantes et les agents pathogènes, qui mettent en jeu des mécanismes communs, la relation non hôte, qui représente la grande majorité des relations, se caractérisant par une incompatibilité entre l'ensemble des cultivars d'une espèce végétale et l'ensemble des biotypes d'un agent pathogène (Lepoivre, 2003 ; Uma *et al.*, 2011), et la relation hôte, se caractérisant par une interaction soit compatible, soit incompatible (Lepoivre, 2003), en fonction du cultivar et du biotype.

Dans le cadre de l'interaction hôte incompatible, la progression et la multiplication de l'agent pathogène, dans les tissus de la plante hôte, sont arrêtées rapidement. La résistance est alors qualifiée de totale, n'entraînant pas d'apparition de symptômes. Ce type de résistance est principalement sous contrôle mono ou oligogénique, impliquant notamment des gènes de résistance majeurs, les gènes *R*. Ce type de résistance a été conceptualisé dans le cadre du modèle en "zig zag" par (Jones et Dangl, 2006) (Figure 1).

Par opposition, lors de l'interaction compatible, l'agent pathogène réussit à infecter la plante hôte et à se multiplier, de façon plus ou moins importante. Dans ce cas, la plante hôte peut mettre en place des mécanismes de défense susceptibles de ralentir la progression de l'agent pathogène, aboutissant à des résistances dites 'partielles'. Les phénotypes des plantes sont qualifiés de "partiellement résistant" à "sensible" selon les niveaux de symptômes. Ce type de résistance est souvent sous contrôle polygénique, même s'il existe des exemples de résistance partielle contrôlés par un seul gène.

Dans la suite de cette introduction bibliographique, seule l'interaction hôte sera décrite.

I-1 La résistance totale ou le modèle en zig-zag (Jones et Dangl, 2006)

La résistance totale, conceptualisée dans le cadre du modèle en “zig zag” par (Jones et Dangl 2006) (Figure 1), se décompose en deux parties, la “Pathogen Associated Molecular Patterns Triggered Immunity” (PTI) et l’ “Effector Triggered Immunity” (ETI).

La PTI ou “PAMPs Triggered Immunity”

Au cours de la relation hôte, la plante reconnaît différents types de motifs, ceux qui sont issus des dommages entraînés chez la plante par l’agent pathogène (“Damage-Associated Molecular Patterns” ou DAMP) (Cantu *et al.*, 2008) et ceux qui sont issus de l’agent pathogène lui-même (“Pathogen-Associated Molecular Patterns” ou PAMP) (Malinovsky *et al.*, 2014). La reconnaissance de ces motifs par la plante se fait grâce à des récepteurs membranaires de type “Pattern Recognition Receptors” (PRR). Les PRR sont généralement constitués d’un domaine riche en leucine (“Leucine Rich Repeat”), d’un domaine transmembranaire et d’un domaine sérine/thréonine kinase intracellulaire (“Receptor Like Kinase”). Il existe de nombreux PRR identifiés sur la base de leur structure, cependant sans démonstration biochimique de leur fonction (Tang *et al.*, 2017).

Il existe différents types de DAMPs identifiés chez les végétaux, comme par exemple la “systemin” (et autres peptides produits à partir de protéines précurseurs plus grandes), des oligogalacturonides, l’ATP extracellulaire et la high mobility group box (HMGB) nucléaire protéine HMGB3 (Gust *et al.*, 2017). Les PAMPs correspondent à des molécules possédant des motifs fortement conservés, tels que les lipopolysaccharides, la chitine ou la flagelline (Bittel et Robatzek, 2007), du fait de leur caractère essentiel à l’agent pathogène. Le PAMP le mieux caractérisé est le peptide flg22, issu de la flagelline bactérienne, reconnu par le récepteur FLS2 de la plante, entraînant une induction de l’expression de plus de 1 000 gènes chez *Arabidopsis thaliana* (Zipfel *et al.*, 2004). D’autres exemples de PAMPs identifiés sont le facteur d’élongation Tu (Ef-Tu), la chitine et la xylanase fongique, respectivement reconnus par les récepteurs EF-Tu Receptor, CERK1 et LeEix (Göhre et Robatzek, 2008).

La perception de ces motifs entraîne une réponse immunitaire de la plante, nommée PTI. En cas d’absence de contournement de cette réponse par l’agent pathogène, sa croissance est arrêtée précocement et peu ou pas de symptômes sont visibles. Cependant, s’il parvient à contourner cette réponse immunitaire, à l’aide d’effecteurs, cela entraîne une ETS (“Effector-Triggered susceptibility”), on dit alors que l’agent pathogène est “virulent”.

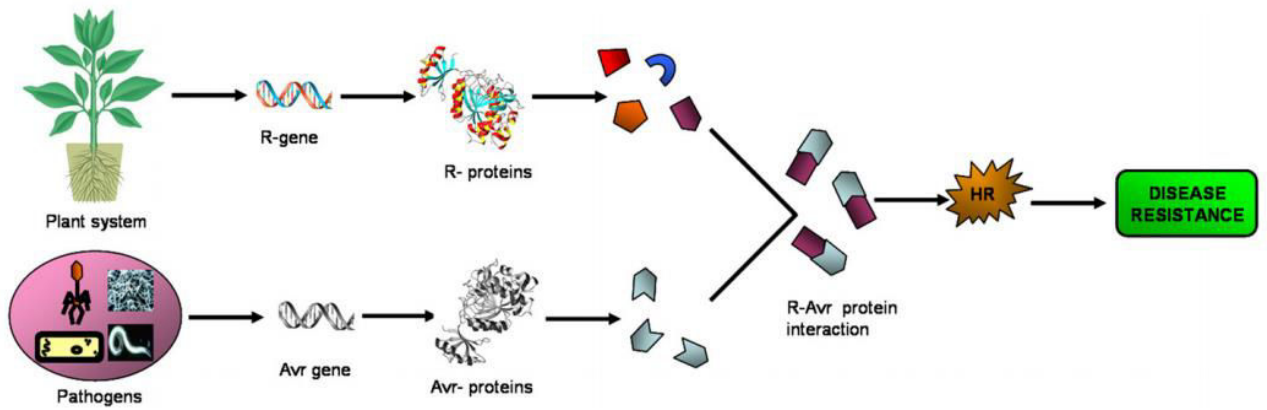


Figure 2: Schématisation du fonctionnement des gènes *R* (d'après Gururani *et al.*, 2012)

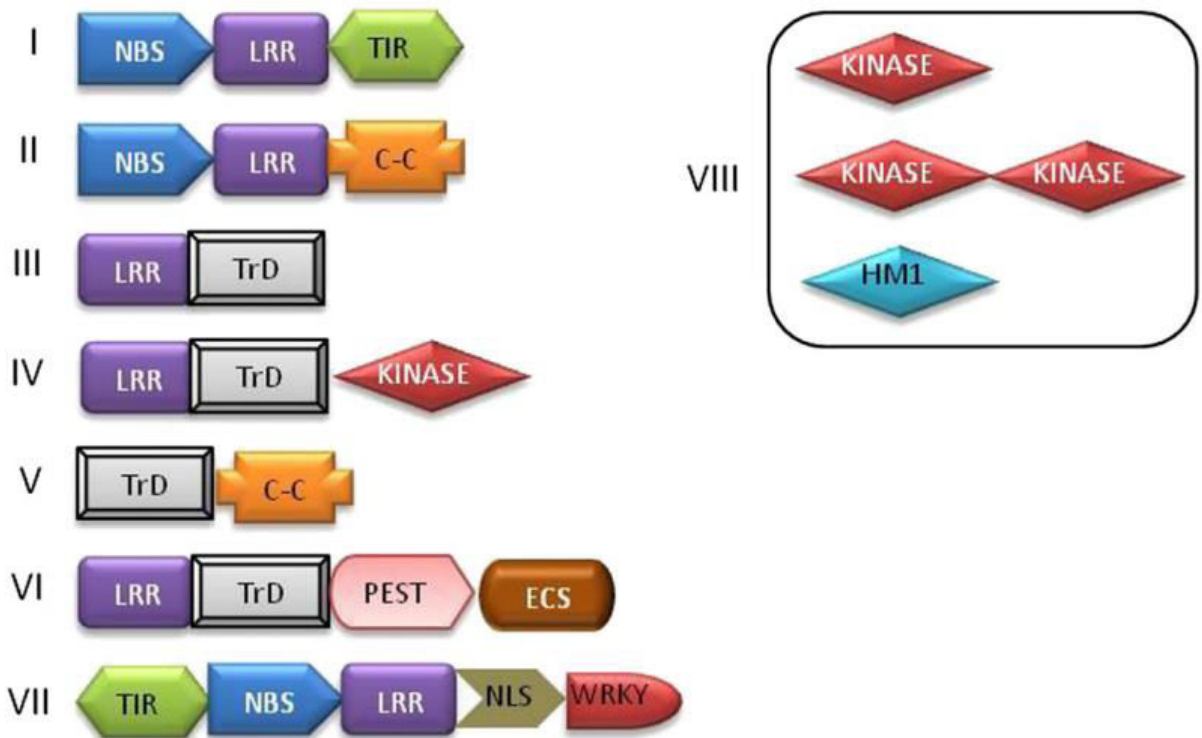


Figure 3: Les 8 classes de gènes *R*, sur la base de l'organisation de leurs domaines fonctionnels (d'après Gururani *et al.*, 2012)

LRR: leucine rich repeats; **NBS**: nucleotide-binding site; **TIR**: toll-interleukin-1 receptors; **C-C**: coiled coil; **TrD**: transmembrane domain; **PEST**: protein degradation domain (proline-glycine-serine-threonine); **ECS**: endocytosis cell signalling domain; **NLS**: nuclear localization signal; **WRKY**: amino acid domain; **HM1**: *Helminthosporium carbonum* toxin reductase enzyme

L'ETI ou "Effector Triggered Immunity"

Les effecteurs des agents pathogènes ont pour objectif premier de supprimer la PTI. Il existe de nombreux effecteurs dont le rôle est de contribuer à la virulence de l'agent pathogène, que ce soit en mimant ou en inhibant les fonctions cellulaires de la plante hôte. Parmi les effecteurs décrits à ce jour, certains sont impliqués dans la modulation de processus induits chez la plante (signalisation/mort cellulaire (Kay *et al.*, 2007) ; réponse hormonale (Brooks *et al.*, 2005)), ou sont des inhibiteurs de protéases (Rooney *et al.*, 2005 ; Catanzariti *et al.*, 2006).

Ces effecteurs, essentiels à l'agent pathogène pour contourner la PTI, sont spécifiquement reconnus par la plante à l'aide de gènes de résistance *R* (Figure 2). La plupart de ces gènes *R* codent des protéines cytoplasmiques appelées "nucleotide-binding site leucine-rich repeat" (NBS-LRR), du fait de la présence d'un domaine NBS en 5' et LRR en 3' dans la protéine. Plus de 70 gènes *R* ont été clonés chez les monocotylédones et dicotylédones (Liu *et al.*, 2007 ; Gururani *et al.*, 2012). Les gènes *R* possèdent des séquences étonnamment conservées et ont été classés en 8 différents groupes en se basant sur leur séquence protéique (Figure 3). Le domaine LRR, possédé par la quasi-totalité des gènes *R*, jouerait un rôle essentiel dans la reconnaissance spécifique des effecteurs des agents pathogènes (Jones, 2001). Chez *A. thaliana*, en se basant sur la séquence génomique du cultivar Col-0, 149 gènes codant des protéines de type NBS-LRR ont été identifiés (Meyers *et al.*, 2003).

Une fois les effecteurs reconnus par les NBS-LRR, la réponse immunitaire appelée "Effector-Triggered Immunity" (ETI) se déclenche. Les effecteurs alors reconnus ne sont plus appelés effecteurs, mais protéines d'avirulence. Contrairement aux gènes *R*, ces protéines d'avirulence possèdent une grande diversité de séquence et de fonction (Rouxel et Balesdent, 2010 ; Gururani *et al.*, 2012). La réponse immunitaire caractérisant l'ETI, souvent associée à une réponse de type hypersensible (HR), est plus intense et plus rapide que celle de la PTI (Jones et Dangl, 2006). Cette réaction HR correspond à une mort cellulaire programmée des cellules au niveau du point d'infection, arrêtant la progression de l'agent pathogène, qui est alors dit "avirulent". Certaines réponses immunitaires décrites lors de la PTI, sont également associées à l'ETI. Parmi ces réponses, on retrouve les flux calciques, provenant des espaces extracellulaires, la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) ainsi que la synthèse de composés antimicrobiens (Dodds et Rathjen, 2010).

La reconnaissance des effecteurs par les NBS-LRR a tout d'abord été décrite comme une relation "gène pour gène" par (Flor, 1971). Ce modèle se basait sur l'interaction incompatible entre le lin (*Linum usitatissimum*) et la rouille du lin (*Melampsora lini*). Le postulat de départ de ce modèle était que pour chaque gène *R* correspondait un gène d'avirulence de l'agent pathogène et

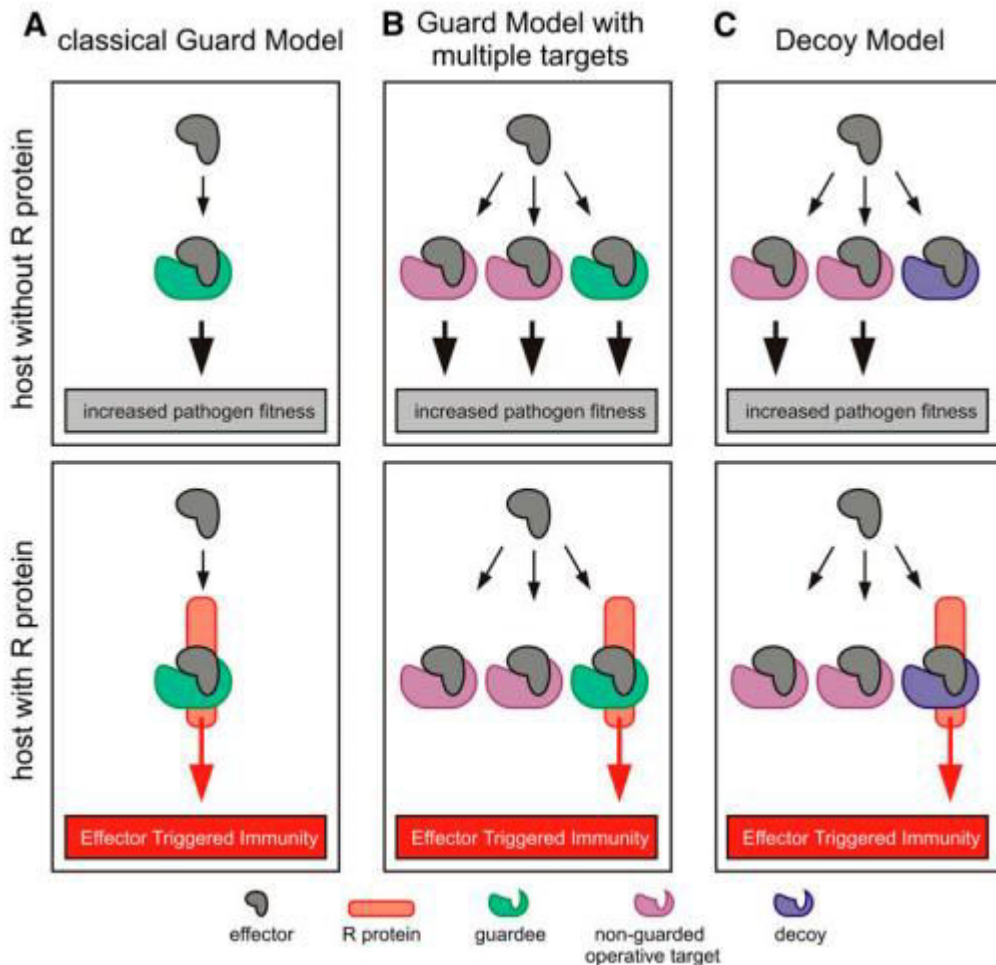


Figure 4: Comparaison des modèles de garde et de leurre (d'après van der Hoorn *et al.*, 2008).

Le modèle de garde suppose que la protéine R interagit indirectement avec l'effecteur (ou facteur d'avirulence) de l'agent pathogène. En effet, la protéine R ne détecterait pas la présence de l'effecteur, mais détecterait la modification de la protéine cible de l'effecteur ayant lieu lors de leur interaction. Dans ce cas, en présence d'une protéine R fonctionnelle, la reconnaissance des modifications effectuées sur la protéine gardée déclenche l'ETI, mais en l'absence de cette protéine, l'effecteur entraîne une ETS. Dans le cas d'un modèle de leurre, l'interaction est toujours indirecte entre la protéine R et l'effecteur. Cependant, lorsqu'il n'y a pas de protéine R fonctionnelle, la sélection naturelle entraîne l'appariation de mutation sur la protéine leurre qui alors évite les modifications induites par l'effecteur, et n'entraîne pas le déclenchement de l'ETS.

que la reconnaissance se faisait par une interaction protéine-protéine. Cependant, au vu du faible nombre d'interactions directes démontrées entre les protéines R et les protéines d'avirulence Michelmore *et al.*, 2013), ce modèle a été remis en question. Dangl et Jones (2001) ont proposé un nouveau modèle nommé « modèle de garde », dans lequel les protéines R interagiraient avec une protéine cible de l'hôte, dont la structure aurait été au préalable modifiée par la protéine d'avirulence. Ce modèle permet d'expliquer comment plusieurs effecteurs peuvent être reconnus par une seule et même protéine R, malgré les fortes variations de séquence entre les effecteurs. L'exemple le plus couramment utilisé afin d'illustrer le modèle de "garde" est celui de la protéine de RIN4 (« RPM1 interacting protein 4»). En effet, cette protéine, présente chez *A. thaliana* est la cible de plusieurs effecteurs de type III (AvrRpm1 et AvrRpt2) par différents isolats de *P. syringae* (Mackey *et al.*, 2002 ; Chung *et al.*, 2014). Cependant, le bénéfice retiré de cette modification de la protéine RIN4 par les effecteurs de l'agent pathogène n'est pas clairement établi, même si (Chung *et al.*, 2014) ont émis l'hypothèse que cela jouerait un rôle dans le maintien de la répression de la PTI.

Par la suite, un nouveau modèle a été proposé par van der Hoorn et Kamoun (2008), le modèle de "leurre" (Figure 4). Ce modèle est dépendant de la présence ou non de gènes *R* fonctionnel associé à la reconnaissance de l'effecteur. En effet, lorsqu'il existe un gène *R* fonctionnel associé à la reconnaissance de l'effecteur, la sélection naturelle va favoriser l'interaction des protéines gardées avec l'effecteur (mutations adaptatives de la protéine cible), afin d'optimiser la reconnaissance de l'agent pathogène et le déclenchement de la réponse de défense. Dans le cas où il n'y a pas de gène *R* fonctionnel, la sélection naturelle va diminuer son affinité d'interaction avec l'effecteur (mutations évatives de la protéine cible), afin d'échapper aux modifications structurales induites par cet effecteur et ainsi ne pas augmenter la fitness de l'agent pathogène.

Utilisation et limites des gènes *R*

Les gènes *R* ont été très largement utilisés en sélection variétale (Mundt, 2014). En effet, ils permettent d'obtenir une résistance pouvant être totale, selon la race d'agent pathogène ciblée, à partir de l'introgession d'une seule région génomique, contenant le gène de résistance *R*. Cette résistance est alors dite qualitative. Toutefois, il existe des limites à l'utilisation unique de gènes *R* : (i) la HR, réponse immunitaire de la plante, déclenchée par les gènes *R* ne permet pas de lutter contre les agents pathogènes nécrotrophes, et *a contrario*, elle est même considérée comme étant favorable à ce type d'agents pathogènes, puisque par définition ils puisent leur nourriture des cellules mortes de leur hôte, (ii) le risque de contournement, par l'agent pathogène, des gènes *R* est

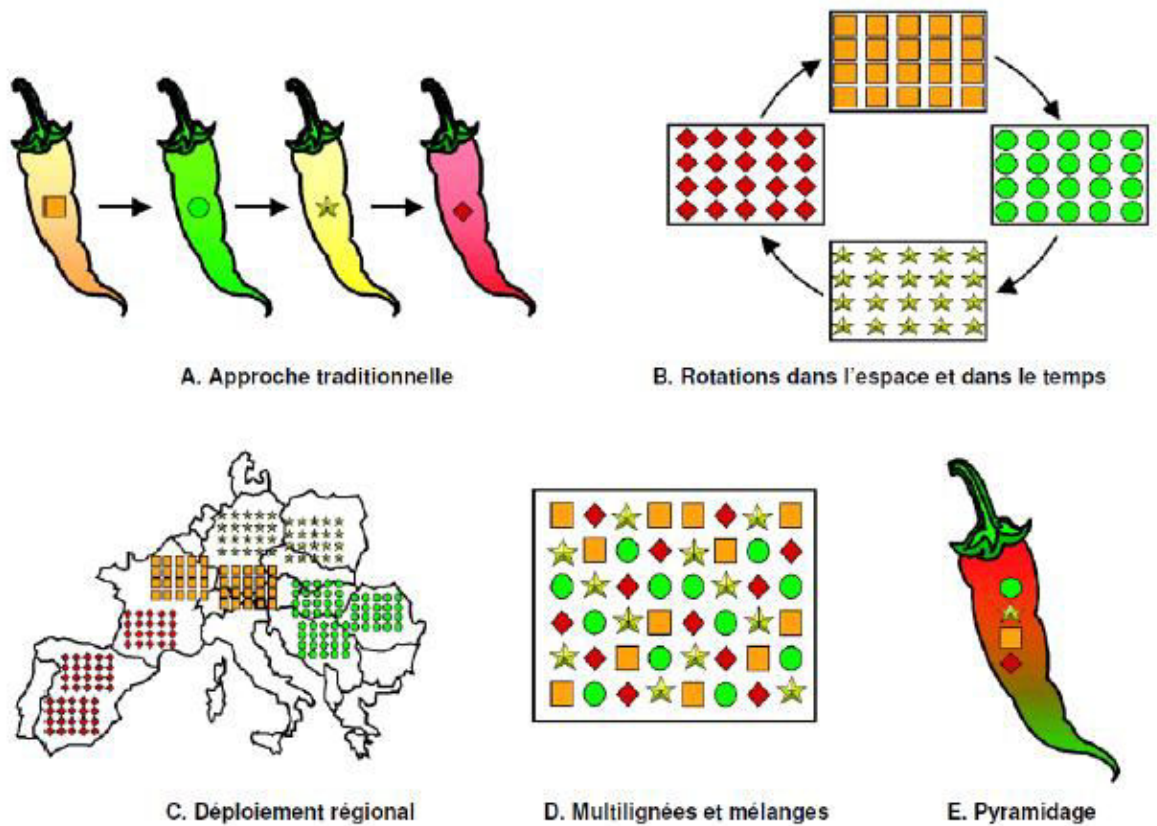


Figure 5: Les différentes stratégies de déploiement des gènes de résistance R (d'après McDonald et Linde, 2002).

Chaque symbole correspond à un facteur génétique de résistance différent.

très important, du fait de la très forte pression de sélection imposée par ces gènes de résistance et du fort pouvoir évolutif de la majorité des agents pathogènes.

Le caractère transitoire de la résistance acquise par le déploiement d'un seul gène *R* au champ a été démontré sur plusieurs exemples. Le gène *Yr17*, permettant la résistance à *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici*, l'agent de la rouille jaune du blé, a été introduit à partir de 1975 et les premiers contournements ont été détectés en 1994 (Bayles *et al.*, 2000). Pour d'autres gènes, le contournement a été encore plus rapide. En effet, le gène *Rlm1*, introgressé chez *Brassica napus* et permettant la résistance à *Leptosphaeria maculans*, a été contourné moins de 5 ans après son déploiement (Sprague *et al.*, 2006). Il existe toutefois des exemples de résistance sous contrôle d'un gène *R* qui reste toujours efficace ou partiellement efficace après une longue période d'utilisation, tel que le gène *mlo* utilisé dès 1979 dans des variétés d'orge pour lutter contre *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* (Humphry et Consonni, 2006). Le contournement des facteurs de résistance est lié à la capacité d'adaptation de l'agent pathogène, qui est contrôlée par cinq forces évolutives : la mutation, la dérive génétique, la migration, la recombinaison et la sélection (McDonald et Linde, 2002). Les exemples de contournement de résistance qualitative dans le contexte agricole se multipliant, la prise en compte de la notion de durabilité des résistances dans les programmes de sélection variétale est devenue inévitable. Cette notion de résistance durable a été définie par Johnson (1981). Elle correspond à une résistance restant efficace dans le temps, c'est à dire sur de longues périodes de culture, et dans l'espace, c'est à dire sur un ensemble de parcelles utilisant le même cultivar dans un environnement favorable au développement de la maladie, sans prendre en compte la structure de la résistance. Cependant, le problème majeur de la caractérisation de la durabilité d'une résistance vient du fait que la composante temporelle de cette résistance ne peut être mesurée qu'*a posteriori*. En effet, comment déterminer le temps nécessaire au contournement d'une résistance si ce n'est par l'observation du contournement de celle-ci.

Afin de retarder le phénomène de contournement de résistance, plusieurs stratégies ont été explorées ou ré explorées (Figure 5). La première stratégie vise à réduire la pression de sélection, en comparaison à la monoculture, grâce à l'utilisation de variétés multilignées, pour laquelle chaque lignée contient un gène *R* différent, mais ciblant le même agent pathogène (Johnson et Allen, 1975). Une autre stratégie, appelée le pyramidage de gènes *R*, a pour objectif de cumuler plusieurs gènes *R* au sein d'un même cultivar. Cette approche est basée sur l'hypothèse que même si l'un des gènes *R* est contourné, les autres continueraient d'être efficaces. Ceci a été particulièrement mis en œuvre chez la pomme de terre pour la lutte contre le mildiou (Kim *et al.*, 2012 ; Jo *et al.*, 2014). Cependant, ces stratégies comportent un inconvénient majeur qui est l'utilisation exclusive de gènes *R*. En effet, d'une part, le nombre de gènes *R* connus à ce jour est limité pour de nombreux pathosystèmes, et d'autre part leur combinaison pourrait provoquer à plus

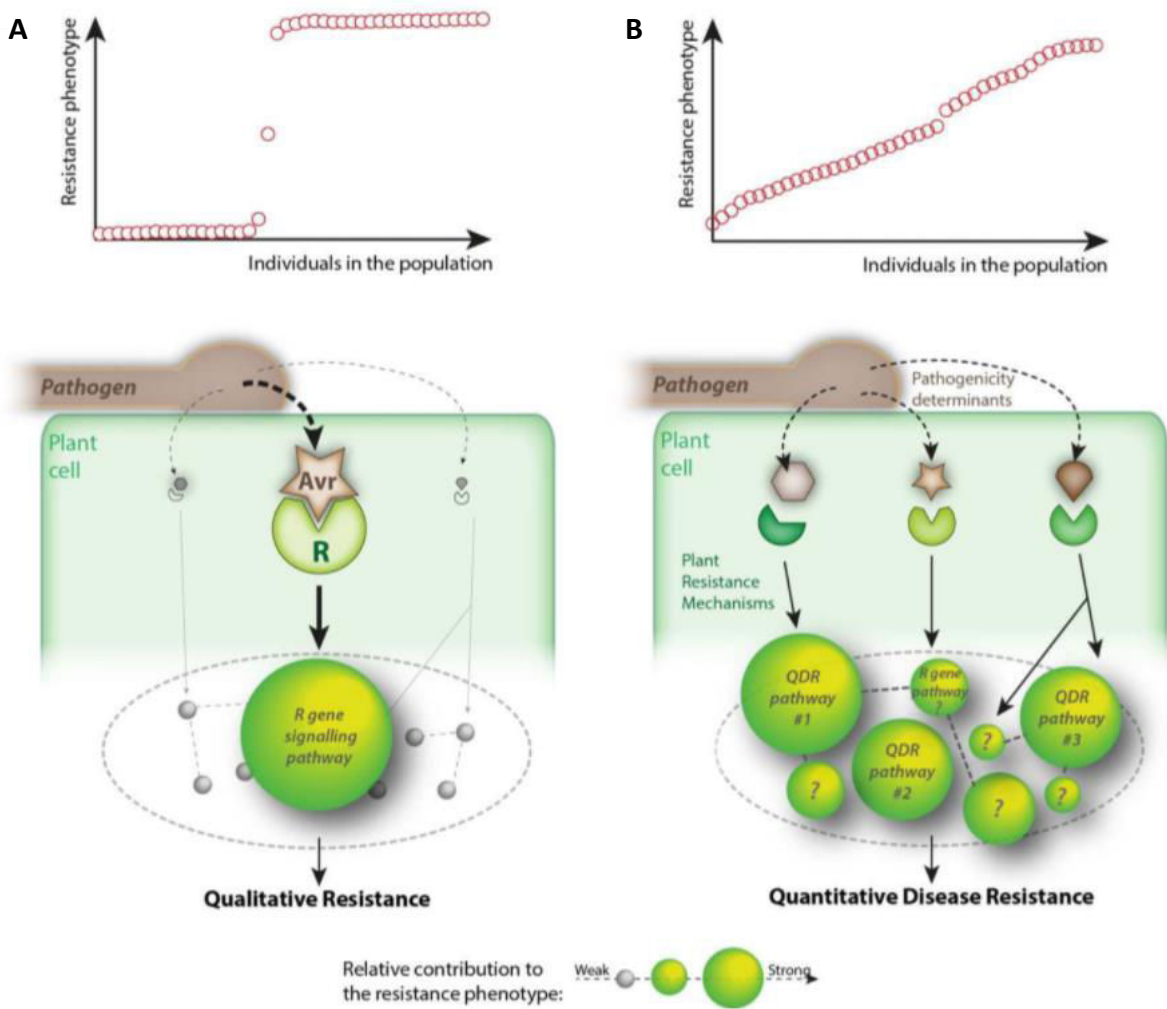


Figure 6: Les concepts de la résistance totale qualitative (A) et de la résistance quantitative (B) (d'après Roux *et al.*, 2014).

D'un point de vue phénotypique, la résistance qualitative totale se caractérise par la binarité de sa distribution (résistant ou sensible) dans une population. De plus, cette résistance est contrôlée par un (voir quelques) gène *R* impliqué dans la perception des effecteurs de l'agent pathogène.

Le cas de la résistance quantitative est quant à lui plus complexe, puisqu'il se traduit dans une population par une distribution continue des phénotypes (allant de résistant à sensible). De plus, ce type de résistance est contrôlée par plusieurs facteurs génétiques de résistance, ayant un rôle simultané et dont les effets sont différents et plus ou moins importants sur la résistance.

ou moins long terme l'apparition d'agents pathogènes super-virulents contournant l'ensemble des gènes *R* disponibles.

Partant de cette observation, de nouvelles stratégies de sélection variétale, intégrant des facteurs de résistance contrôlant un caractère quantitatif (Quantitative Trait Loci-QTL), ont vu le jour, que ce soit par pyramidage avec un gène *R* ou par pyramidage de QTL. En effet plusieurs auteurs suggèrent que l'utilisation de QTL dans le pyramidage permettrait également d'augmenter la durabilité de la résistance procurée par un gène *R* (Rousseau *et al.*, 2014 ; Delourme *et al.*, 2014).

I-2 La résistance quantitative

Concept et définition

D'après Roux *et al.* (2014), la résistance quantitative est caractérisée par la présence simultanée de 2 critères : (i) le phénotype de la résistance à l'agent pathogène étudié présente une distribution continue, allant de sensible à résistant ou partiellement résistant dans une population d'hôte, par opposition à la binarité du phénotype observé dans le cas d'une résistance totale (résistant ou sensible), (ii) le phénotype de la résistance à l'agent pathogène étudié est contrôlé par de multiples QTL. Sur la base de cette définition, l'architecture moléculaire de la résistance quantitative s'apparenterait à un réseau de facteurs génétiques de résistance intriqués, intégrant de multiples voies de réponse à plusieurs déterminants moléculaires de l'agent pathogène (Figure 6).

Relation avec le modèle en “zig zag”

Dans un premier temps, Poland *et al.* (2009) et Roux *et al.* (2014) ont proposé une explication de la résistance quantitative en se basant sur le modèle en “zig zag” de Jones et Dangl (2006). Le caractère non binaire des phénotypes s'expliquerait par des facteurs tels que l'isolat de l'agent pathogène, les conditions environnementales ou les mutations naturelles des gènes *R*. En effet, certains gènes *R* de résistance ne confèrent qu'une résistance partielle aux agents pathogènes (Wang *et al.*, 1998). Dans ce contexte, comme suggéré par Poland *et al.* (2009) et Roux *et al.* (2014), la résistance quantitative serait représentée, au niveau phénotypique, comme un continuum allant de la sensibilité à la résistance totale (Figure 6). Le contrôle génétique de cette résistance serait effectué par des gènes *R* se situant à l'extrémité de ce continuum et par des QTL de résistance (gènes *R* partiellement efficaces) se distribuant tout au long de ce continuum. Chez la variété de blé Camp Rémy par exemple, Mallard *et al.* (2005) ont mis en évidence que l'association de facteurs de résistance quantitatifs pouvait conduire à une résistance dite totale à la rouille jaune. Cependant, il est clair aujourd'hui que les facteurs génétiques impliqués dans la résistance quantitative ne se limitent pas exclusivement à des gènes *R*.

Les facteurs génétiques de résistance clonés liés à la résistance quantitative

Les mécanismes potentiels sous-jacents aux QTL de résistance ont été discutés dans la littérature (Poland *et al.*, 2009 ; St Clair, 2010 ; Kou et Wang, 2010 ; Roux *et al.*, 2014). Poland *et al.* (2009) classent ces mécanismes en six catégories : (1) contrôle de fonctions cellulaires atypiques (différentes de celles contrôlées par les gènes *R*), (2) contrôle de réponses similaires à l'ETI (gènes *R* partiellement contournés dont l'effet est devenu quantitatif), (3) modulation de la morphologie/développement de la plante, (4) perception des PAMPs, (5) détoxification de phytotoxines, et (6) transduction de signaux induisant les réponses de défense.

A ce jour, peu de loci associés à la résistance quantitative ont été clonés afin de valider leur rôle dans la résistance aux agents pathogènes (French *et al.*, 2016). Ce faible nombre de gènes clonés s'explique par la difficulté d'observer un phénotype tranché et constant entre les génotypes possédant l'allèle de résistance au QTL et ceux possédant l'allèle de sensibilité. Deux facteurs sont à l'origine de cette difficulté: (i) l'effet du QTL, car plus il est faible et moins son impact sur le phénotype sera observable, (2) la complexité de la résistance (nombre de QTL et interaction entre QTL), plus la résistance est complexe, plus il est difficile de découpler l'effet d'un QTL par rapport aux autres. Au cours des dernières années, le clonage de plusieurs loci liés à la résistance quantitative a permis de mettre en évidence des QTL dont l'effet est sous le contrôle de gènes autres que des gènes *R*. Cependant, il reste encore beaucoup d'inconnues quant aux liens mécanistiques entre ces gènes et la résistance.

Les gènes spécifiques du stade de développement de la plante ou de l'environnement

Le QTL *Lr34*, codant un transporteur ABC (« ATP Binding Cassette ») putatif, confère une résistance à plusieurs agents pathogènes, incluant *Puccinia striiformis*, *P. triticina*, *P. graminis* et *B. graminis* (Krattinger *et al.*, 2009) chez le blé. *Lr34* induit une résistance partielle chez les plantes adultes à 20 °C et chez les plantules à faible température. Cette résistance demeure toujours efficace après plus de 50 ans d'utilisation. Ce gène s'exprime dans les feuilles les plus hautes du blé durant la phase de remplissage des grains. Le clonage ainsi que l'analyse de mutants ont permis de mettre en évidence des similitudes avec deux autres QTL, *Yr18* (résistance à la rouille jaune) et *Pm38* (résistance au mildiou). Trois variations de séquence ont été mises en évidence entre l'allèle résistant et sensible de *Lr34*. Deux de ces variations sont présentes dans un exon qui code la région transmembranaire de la protéine. La présence de ces variations pourrait impacter la conformation de la protéine et altérer sa spécificité de substrat. Le mécanisme sous-jacent à ce QTL n'est pas bien caractérisé à ce jour, mais pourrait être lié au processus de sénescence.

Chez le blé, le fonctionnement du QTL *Yr36*, impliqué dans la résistance quantitative vis-à-vis de plusieurs souches de *P. striiformis* f. sp. *tritici*, est particulier puisqu'il ne s'exprime qu'à des températures élevées (25 °C-35 °C) (Fu *et al.*, 2009). Le gène responsable de l'effet de ce QTL est le gène *WSK1.1* ("Wheat Kinase Start 1") (Clark, 2012). Bien que 6 copies de ce gène existent dans le génome du blé, *WSK1.1-6*, seul *WSK1.1* est surexprimé dans des conditions de températures élevées et présente de façon spécifique un domaine START. Ce domaine aurait comme rôle d'interagir avec les lipides de l'agent pathogène et grâce au domaine kinase, permettrait d'initier la mort cellulaire programmée.

Les gènes R dont la fonction est altérée

Plusieurs études ont mis en évidence le rôle de gènes *R* dans la résistance quantitative. Chez *A. thaliana*, Debieu *et al.* (2016) ont démontré que la résistance quantitative à *Xanthomonas campestris* était contrôlée notamment par deux gènes *R*, *RRS1* et *RPS4*, présents sous le même locus. Cette paire de gènes avait été précédemment décrite pour son rôle dans le déclenchement de l'ETI en réponse à l'infection par les souches de *P. syringae* sécrétant les effecteurs AvrRps4, de *Ralstonia solanacearum* sécrétant l'effecteur Pop2, ainsi que par le champignon *Colletotrichum higginsianum* (Narusaka *et al.*, 2009 ; Le Roux *et al.*, 2015 ; Sarris *et al.*, 2015). Chez les mutants d'*Arabidopsis* *rsp4*, *rrs1* et le double mutant *rsp4 rrs1*, il y a une augmentation de la colonisation et du nombre de lésions après inoculation, mais uniquement avec les souches de la race 6 de *X. campestris*.

Le QTL *Pi35*, utilisé au Japon depuis les années 1960, est une source de résistance durable chez le riz vis-à-vis de l'infection par *Magnaporthe oryzae* (Fukuoka *et al.*, 2014). Les travaux menés par Fukuoka *et al.* (2014) ont permis de mettre en évidence que *Pi35* code un allèle différent de *Pish*, un gène codant un NBS-LRR impliqué dans la résistance totale à l'isolat Kyu77-07A de *M. oryzae*, notamment par activation d'une réponse de type HR. Contrairement à *Pish*, *Pi35* ne provoque pas de réponse de type HR, mais entraîne une résistance partielle à de multiples races de *M. oryzae*. Ces deux NBS-LRR diffèrent de par la séquence de leurs domaines NBS et LRR, cependant l'étude de protéines chimériques a permis de mettre en évidence le rôle spécifique du domaine LRR dans le passage d'une résistance totale (*Pish*) à une résistance partielle (*Pi35*).

Lorsqu'un gène *R* est contourné par une nouvelle souche de l'agent pathogène, il n'est pas rare que ce gène conserve un effet résiduel sur la résistance. Le gène de résistance *Xa4*, impliqué dans la résistance du riz à *X. oryzae*, est un très bon exemple de ce phénomène. Ce gène *R* a été contourné par la souche CR6 suite à une mutation du gène *avrXa4*. Pourtant, Li *et al.* (1999) ont mis en évidence, à l'aide d'une population RIL, que ce gène agissait encore comme un QTL récessif vis-à-vis de la résistance à la souche CR6 de *X. oryzae*, conférant un niveau de résistance

équivalente à 50 % de la résistance observée avant le contournement de ce gène. De plus, une grande partie des QTL détectés lors de cette analyse était précédemment décrits comme des gènes *R*.

Les “Pattern recognition receptors” ou PRR

Les PRR, récepteurs notamment décrits pour leur implication dans le déclenchement de la PTI, sont également parfois impliqués dans des résistances quantitatives. Le niveau d'expression du gène *FLS2*, impliqué dans la reconnaissance de la flagelline bactérienne (*flg22*), varie de manière quantitative entre les différents écotypes d'*A. thaliana*. De plus, la quantité de protéine *FLS2* est corrélée positivement au nombre de liaisons avec *flg22*, qui elles-mêmes sont corrélées négativement avec la prolifération de *P. syringae* chez *A. thaliana* (Vetter *et al.*, 2012). Lacombe *et al.* (2010), ont mis en évidence une relation entre PRR et résistance quantitative en introduisant chez *Nicotiana benthamiana* et *Solanum lycopersicum* l'Elongation Factor Tu Receptor (EFR), le PRR exclusif des Brassicaceae impliqué dans la reconnaissance du PAMP bactérien elongation factor Tu (EF-Tu). Ils ont observé chez ces Solanacées une résistance quantitative à *R. solanacearum* et *Xanthomonas perforans*. Les kinases CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE1 (CERK1) (Miya *et al.*, 2007 ; Petutschnig *et al.*, 2010, 2014) et LYSIN MOTIF-CONTAINING RECEPTOR-LIKE KINASE5 (LYK5) (Cao *et al.*, 2014), deux autres PRR ont également été décrits pour leur rôle dans la résistance quantitative chez *Arabidopsis*.

Les gènes impliqués dans le métabolisme de la plante

Le gène *Rhg4* est impliqué dans la résistance quantitative du soja à *Heterodera glycines*, un nématode à kyste. La sérine hydroxy-méthyl-transférase (SHMT), codée par *Rhg4* (Liu *et al.*, 2012), catalyse la synthèse de 5,10 méthylène Tetrahydrofolate (THF) (Fox et Stover, 2008 ; Locasale, 2013), un substrat métabolique central pour l'ensemble des réactions regroupées sous le terme de “one-carbon metabolism”. Le métabolisme associé à l'acide folique joue avant tout un rôle essentiel pour la plante, mais il joue également un rôle important dans le développement du site d'alimentation des nématodes, le syncytia, et donc en aval sur le cycle de vie du nématode. Cinq variations nucléotidiques, dont deux entraînant un changement d'acide aminé, ont été mises en évidence entre l'allèle résistant et sensible du gène *Rhg4*. La complémentation fonctionnelle réalisée chez *E. coli*, avec l'allèle résistant et sensible, indique que ces deux variants alléliques sont fonctionnels.

Les gènes de sensibilité perdant leur fonction

Le QTL *pi21*, détecté chez le riz et impliqué dans la résistance à *M. oryzae*, a été utilisé au Japon durant plus d'un siècle (Fukuoka *et al.*, 2009). Chez les cultivars possédant l'allèle de résistance à ce QTL, le champignon peut pénétrer dans les cellules, mais n'arrive pas à infecter les

cellules adjacentes et les premiers signes d'une réponse de type HR sont observés 96 h après l'infection. Le délai de la mise en place de la réponse HR paraît donc légèrement plus long que celui observé classiquement avec les gènes *R* (Faris *et al.*, 2010). Le clonage de ce QTL par Fukuoka *et al.* (2009) a permis d'identifier une protéine riche en proline, ayant un rôle dans le transport de métaux. La transformation de cultivars sensibles avec l'allèle de résistance au QTL ne permet pas d'obtenir un phénotype résistant, alors que la transformation de cultivars résistants avec l'allèle de sensibilité permet d'obtenir un phénotype sensible. Ce résultat suggère que ce gène est un gène de sensibilité dont la perte de fonction provoquée par une mutation permet d'augmenter la résistance.

Les gènes dont le niveau d'expression module la résistance

Le QTL *Rgh1*, impliqué dans la résistance du soja à *H. glycines*, contient 11 gènes prédits dans un intervalle de 67 kb (Cook *et al.*, 2012). Parmi ces 11 gènes, le silencing de l'un des 3 gènes suivants, un transport d'acide aminé, une protéine α -SNAP et une protéine non caractérisée possédant une région inductible par les blessures, provoque une diminution de la résistance. Cependant, seule la surexpression de ces trois gènes en même temps permet d'augmenter le niveau de résistance. Il a été mis en évidence que la séquence génomique (31.2 kb) regroupant ces trois gènes est présente en une seule copie chez les cultivars sensibles, alors qu'elle l'est en plusieurs copies chez les cultivars résistants, ce qui se traduit par une augmentation de leur niveau d'expression.

Le QTL *QRX3*, codant le gène *RKSI* ("Resistance-related KinaSe1"), est impliqué dans la résistance quantitative des Brassicaceae à *X. campestris* (Huard-Chauveau *et al.*, 2013). L'analyse de la séquence de *RKSI* a permis de mettre en évidence l'absence d'un résidu essentiel à la fonction catalytique de cette kinase. Seul un acide aminé varie entre les allèles résistant et sensible de ce gène. *RSK1* inhibe la colonisation des tissus vasculaires dans les feuilles ayant comme conséquence une diminution des symptômes qui est au même temps reliée à l'augmentation de l'expression du gène *RSK1* (plus de 235 fois supérieure chez les cultivars possédant l'allèle de résistance au gène *RSK1*).

I-3 L'impact des facteurs abiotiques sur la résistance des plantes aux agents pathogènes

Dans leur environnement, les plantes sont confrontées à de nombreux stress, biotiques (champignons, bactéries, virus...) et abiotiques (salinité, température, inondation, nutrition...), et il est fréquent que plusieurs stress affectent les plantes simultanément. Malgré ce constat, et afin de simplifier l'interprétation des résultats, l'analyse de la résistance des plantes aux agents pathogènes est souvent réalisée dans des conditions contrôlées, où le seul facteur variable est

l'infection par l'agent pathogène. Cette stratégie a permis de développer de nombreux cultivars résistants aux agents pathogènes. Cependant, il a été observé que dans certains environnements, l'efficacité de ces résistances pouvait être différente de celle observée en conditions contrôlées.

En effet, lorsque deux stress surviennent simultanément, la stratégie d'adaptation de la plante est gouvernée par l'interaction de ces stress, ce qui implique alors des réponses différentes de celles déployées lorsque la plante est affectée par les stress individuellement (Mittler, 2006).

Les contraintes abiotiques, telles que la sécheresse, la température ou la salinité, peuvent altérer la réponse de la plante au stress biotiques, de même que les stress biotiques peuvent interférer avec la réponse aux stress abiotiques. L'effet des facteurs abiotiques sur la réponse de résistance de la plante aux agents pathogènes peut être positif, négatif ou nul, selon l'espèce de plante, l'agent pathogène et le facteur abiotique considérés (Tippmann *et al.*, 2006 ; Suzuki *et al.*, 2014).

La sécheresse et les fortes températures sont les deux contraintes abiotiques les plus étudiées pour leurs effets sur la résistance des plantes aux agents pathogènes. Par exemple, dans le cas de *Lycopersicon esculentum*, la sécheresse provoque une réduction de 50 % d'infection par le champignon nécrotrophe *Botrytis cinerea* et augmente également significativement la résistance au champignon biotrophe *Oidium neolycopersici* (Achujo *et al.*, 2006). Cette augmentation de résistance est liée à un doublement de la quantité d'acide abscissique, décrit pour son rôle dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. *A contrario*, en condition de sécheresse il y a une augmentation des symptômes provoqués par *Phytophthora cryptogea* chez *Carthamus tinctorius* (Duniway, 1977). La résistance du tabac au virus de la mosaïque de la tomate, conférée par une réponse de type HR, est contournée au-dessus de 28 °C (Király *et al.*, 2008). En effet, la nécrose des tissus accompagnant la réponse de type HR ne s'effectue pas au-dessus de cette température. Les auteurs de cette étude associent cette réponse à une diminution de la quantité de ROS et à une activation de gènes codant des enzymes antioxydantes. De même, la réponse de type HR du piment lors de l'infection par le TSWV (*Tomato spotted wilt virus*) est également altérée au-dessus de 32 °C particulièrement chez les jeunes plantules (Moury *et al.*, 1998). Dans le cas de la résistance de *Triticum aestivum* L. à *Cochliobolus sativus*, Sharma *et al.* (2007) ont mis en évidence sur la base de données obtenues sur 6 années une corrélation négative entre le niveau de résistance et la température durant la nuit. Cependant, d'autres études ont mis en évidence un effet positif des fortes températures sur la résistance des plantes. En effet, dans le cadre de l'infection de *T. aestivum* par *P. striiformis* f. sp. *tritici*, une résistance est observée chez les plantes adultes en condition de forte température (HTAP), et cette résistance serait contrôlée par plusieurs QTL (Chen, 2005).

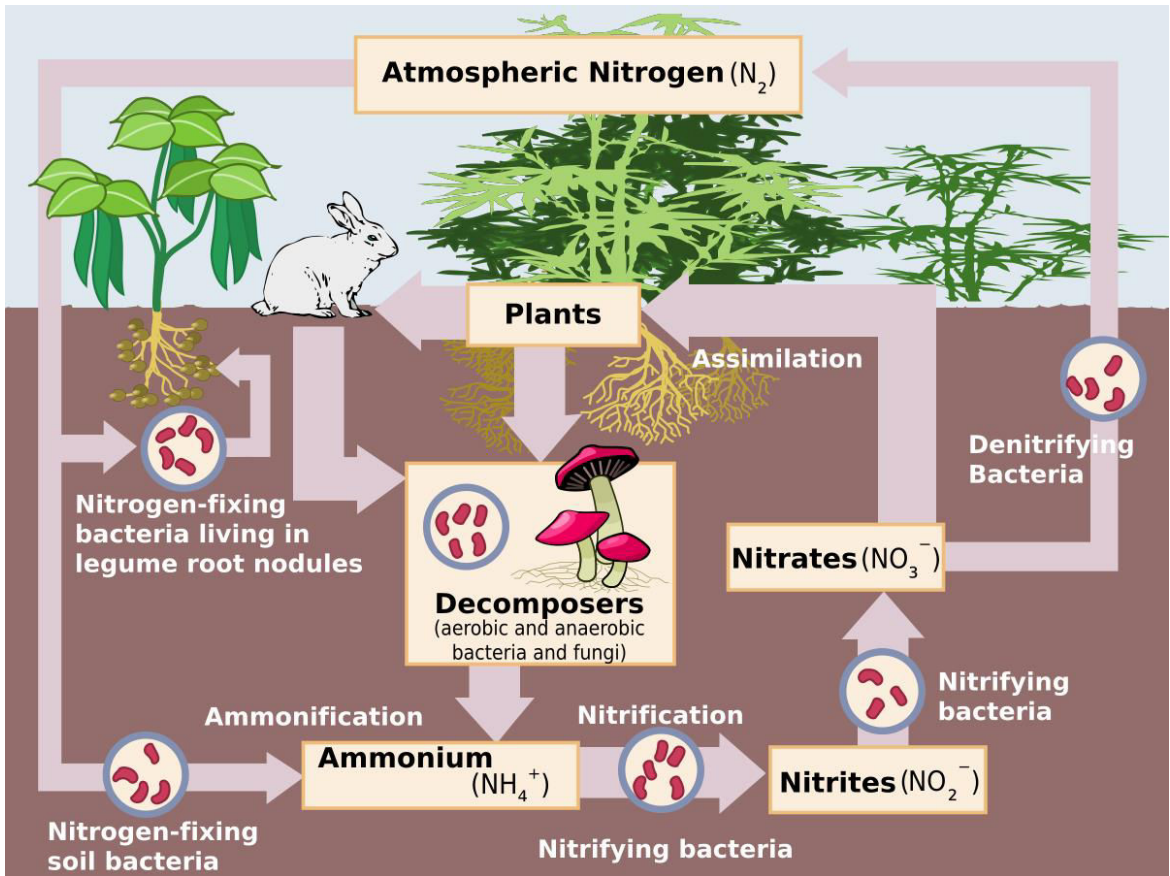


Figure 7: Le cycle de l'azote

Les résultats de ces études montrent que l'on ne peut pas généraliser l'effet des contraintes abiotiques sur la résistance des plantes aux stress biotiques. D'autant plus, que d'autres facteurs peuvent encore influencer ces résultats, tels que la durée, l'intensité ou la périodicité d'application du stress abiotique (Goel *et al.*, 2008 ; Amtmann *et al.*, 2008 ; Mittler et Blumwald, 2010).

II Impact de la fertilisation azotée sur le développement des maladies et les mécanismes de résistance associés

L'azote est un macronutriment essentiel pour les plantes, dont la disponibilité dans le sol joue un rôle majeur dans la croissance, le développement et le rendement. L'azote est nécessaire à la formation de certains composés, tels que les acides nucléiques (ADN et ARN), les acides aminés (protéines et peptides), mais aussi les chlorophylles (Tegeeder et Rentsch, 2010). Le nitrate (NO_3^-) et l'ammonium (NH_4^+) sont les deux formes d'azote minéral les plus utilisées par les plantes. Dans le cadre agricole, l'azote est souvent décrit comme étant le nutriment limitant, car contrairement aux autres nutriments, il n'est pas relargué lors de la dégradation des roches (Figure 7). La fertilisation est utilisée pour pallier les carences azotées, qui peuvent entraîner de sévères modifications de la croissance et du métabolisme des plantes (Epstein et Bloom, 2005) et aboutir à la réduction du rendement et de la qualité des produits récoltés. Ces apports ont augmenté dans les années 1980, jusqu'à atteindre aujourd'hui 200-250 kg N/ha en France pour la culture du colza, une plante particulièrement demandeuse en azote (Hebinger, 2013). Une fraction non négligeable des apports azotés effectués n'est pas directement absorbée par les plantes et est perdue par lessivage (Hirel *et al.*, 2011) et ceux malgré les efforts de la communauté scientifique pour augmenter l'efficacité d'utilisation de l'azote ("Nitrogen-use efficiency" ou NUE) des plantes cultivées (Cassman *et al.*, 2002). Du fait des problèmes environnementaux (eutrophisation des systèmes terrestres et aquatiques) et économiques (augmentation du prix des fertilisants) provoqués par la surutilisation de fertilisant azoté, une refonte des stratégies agricoles est en cours afin d'obtenir une agriculture plus durable.

II-1 L'absorption du nitrate chez les plantes

Le transport du nitrate dans la plante a été conceptualisé sur la base d'études physiologiques dans les années 1970 et 1980 (Morgan *et al.*, 1973 ; Hanson, 1978). L'utilisation de marqueurs a permis de mettre en évidence que l'assimilation du nitrate par les plantes était liée à des mécanismes concomitants de flux opposés dans les racines, régulés par des protéines de transport. Deux patterns d'assimilation existent chez les plantes : (1) lorsque la concentration du milieu extérieur est pauvre en nitrate ($< 0,2-0,5$ mM), l'assimilation sature à partir d'une certaine concentration, (2) lorsque la concentration du milieu extérieur est riche en nitrate, l'assimilation est linéaire en fonction de la concentration (Siddiqi *et al.*, 1990). Ces patterns, observés chez de

nombreuses espèces, suggèrent l'existence de deux classes distinctes de protéines impliquées dans l'assimilation de l'azote, correspondant au "High-Affinity Transport System" ou HATS (faible concentration) et au "Low-Affinity Transport System" ou LATS (forte concentration) (Crawford et Glass, 1998). Cependant, la complexité des patterns d'assimilation des nitrates par les racines des plantes ne se limite pas uniquement à la concentration en nitrate du milieu extérieur. En effet, il a été mis en évidence que l'accélération d'assimilation des nitrates, observée suite au premier ajout de nitrate dans le sol, nécessitait la synthèse *de novo* de protéines, dont des protéines de transport des nitrates (Jackson *et al.*, 1973 ; Hole *et al.*, 1990). Ce phénomène étant nettement plus important pour le HATS, une hypothèse divisant ce système d'assimilation en une partie constitutive (cHATS) et une partie inductible (iHATS) a vu le jour (Crawford et Glass, 1998). D'autre part, Lee (1993) a mis évidence une régulation positive de l'assimilation de l'azote par la carence azotée et *a contrario* négativement par la forte concentration en azote dans la plante. Ce résultat a été interprété comme étant une preuve du rétrocontrôle des protéines de transport des nitrates par le statut azoté de la plante (Imsande et Touraine, 1994). Enfin, Delhon *et al.* (1995) ont mis en évidence que l'assimilation des nitrates était dépendante de la photosynthèse et qu'elle affichait un rythme diurne marqué, attribué à la régulation positive par le transport de sucre des racines vers les tiges. Sur la base de toutes ces observations physiologiques, il a été déduit qu'il devait exister plusieurs protéines impliquées dans le transport des nitrates et que chacune devait posséder une fonction et une régulation spécifique.

L'identification moléculaire, ainsi que la caractérisation fonctionnelle des gènes codants des transporteurs de nitrate, débuté dans le milieu des années 1990, a permis de valider cette hypothèse. Cependant, contrairement à de nombreux autres transporteurs de nutriments (Dreyer *et al.*, 1999), les transporteurs de nitrate n'ont pas été validés par complémentation fonctionnelle chez un mutant de *Saccharomyces cerevisiae*, car cet organisme est incapable de métaboliser cette source d'azote. Cependant, suite à l'utilisation de méthodes alternatives, 4 familles de transporteurs/canaux impliqués dans le transport des nitrates ont été identifiées (Krapp *et al.*, 2014) : nitrate transporter 1/peptide transporter family (NPF), nitrate transporter 2 family (NRT2), the chloride channel family (CLC) et slow anion channel-associated homologues (SLAC/SLAH).

Les NPF

Chez *A. thaliana*, 53 gènes sont associés à la famille de protéines NPF. Les analyses phylogénétiques réalisées chez les plantes supérieures ont mis en évidence un grand nombre de gènes associés à cette famille de protéines (de 50 à plus de 139 selon les organismes), pouvant être divisés en 8 à 10 sous-familles (von Wittgenstein *et al.*, 2014 ; Lérant *et al.*, 2014). Le nombre de NPF est nettement supérieur chez les plantes supérieures en comparaison aux autres organismes,

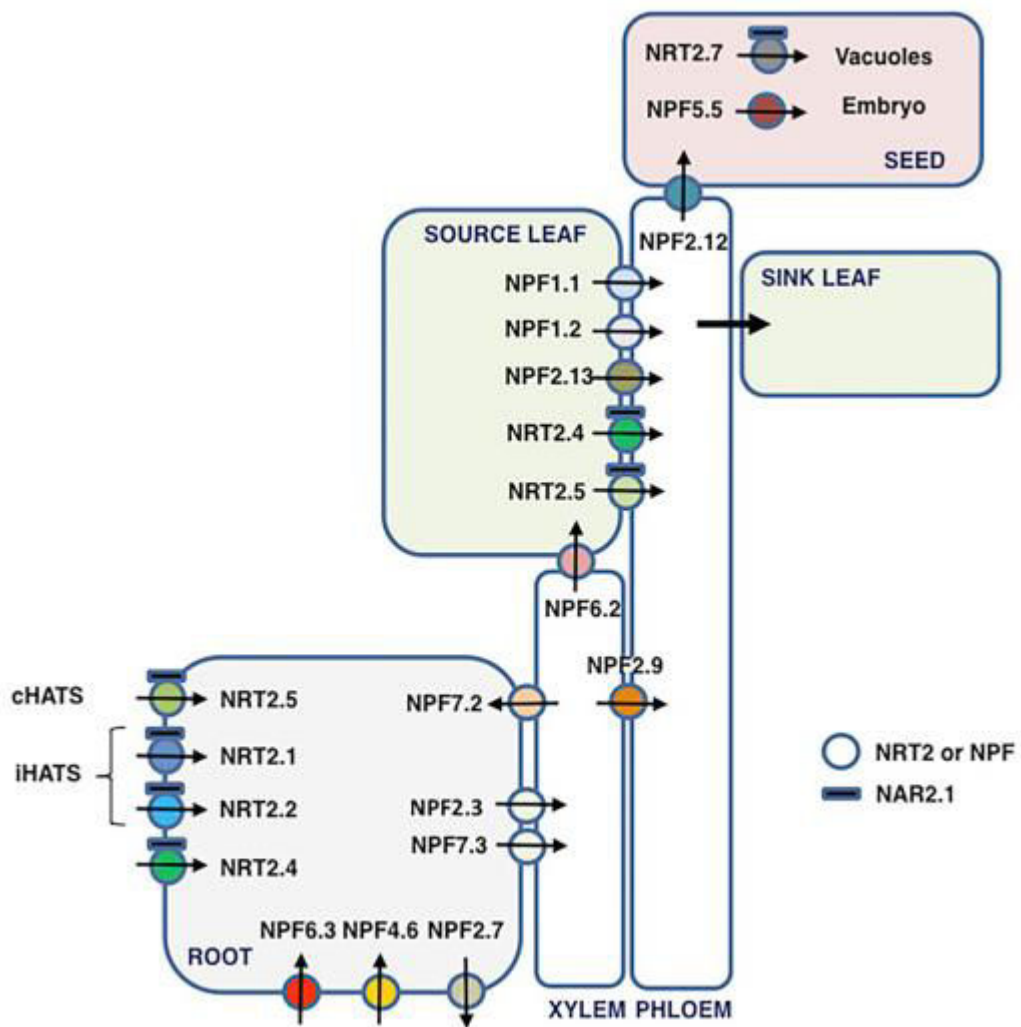


Figure 8: Localisation et fonction des transporteurs de nitrate des familles NPF et NRT2 chez *A. thaliana* (d'après O'Brien *et al.*, 2016).

tels que les bactéries, les levures, les algues et les animaux. Ceci peut être expliqué par l'existence chez les plantes de transporteurs impliqués dans le transport d'autres molécules que les nitrates dans cette famille, tel que des peptides (Komarova *et al.*, 2008), des acides aminés (Zhou *et al.*, 1998), le nitrite (Sugiura *et al.*, 2007), des glucosinolates (Nour-Eldin *et al.*, 2012), l'auxine (Krouk *et al.*, 2010), l'acide abscissique et les gibbérellines (Kanno *et al.*, 2012 ; Chiba *et al.*, 2015 ; Tal *et al.*, 2016). Il est maintenant clair que la famille de protéines NPF a subi des processus d'amplification et de néo-fonctionnalisation, et que les transporteurs de nitrates sont probablement issus de transporteurs de peptides ou d'acides aminés ancestraux (von Wittgenstein *et al.*, 2014).

NPF6.3, aussi appelé *CHL1* ou *NRT1.1*, est le premier transporteur de nitrate à avoir été cloné. Il a été isolé lors d'un screening de mutants T-DNA d'*A. thaliana*, dont l'objectif premier était d'identifier des résistances au chlore (Tsay *et al.*, 1993). *NPF6.3* code une protéine de 590 acides aminés, possédant 12 domaines chevauchant la membrane. La cristallisation récente de *NPF6.3* a mis en évidence le rôle de l'histidine 356 dans la spécificité de substrat au nitrate de cette protéine (Parker et Newstead, 2014 ; Sun *et al.*, 2014). Cependant, les motifs protéiques expliquant la variété de substrats que peuvent transporter les NPF restent mal connus. *NPF6.3* a été dans un premier temps caractérisé comme un LATS impliqué dans le transport des nitrates depuis le milieu extérieur dans les racines de la plante (Tsay *et al.*, 1993) ; des études ultérieures ont montré que ce transporteur possédait une double affinité (LATS et HATS) en fonction de la phosphorylation du résidu T101 (Liu et Tsay, 2003). Les autres NPF impliqués dans le transport des nitrates sont eux caractérisés comme des LATS.

Les NPF impliqués dans le transport des nitrates se différencient également par leur localisation dans la plante (Figure 8). En effet, seuls *NPF6.3*, *NPF4.6* et *NPF2.7* sont impliqués dans le transport de nitrate dans les racines. *NPF4.6* agit comme un constitutif LATS (Huang *et al.*, 1999) et *NPF2.7* régule les efflux de nitrates dans le milieu extérieur (Segonzac *et al.*, 2007). Actuellement, l'ensemble des autres NPF identifiées sont impliquées dans le transport des nitrates à l'intérieur de la plante.

Les NRT2

La famille de gènes *NRT2* a été identifiée dans un premier temps chez le champignon *Aspergillus nidulans* (Unkles *et al.*, 1991), puis chez les plantes (Filleur et Daniel-Vedele, 1999). Par rapport à la famille de gènes *NPF*, la famille *NRT2* est composée d'un nombre beaucoup plus réduit de gènes (1 à 8 gènes selon les espèces) (von Wittgenstein *et al.*, 2014) dont la majorité est spécifique du transport des nitrates. Malgré une structure similaire à celle des gènes de la famille *NPF*, avec 11 à 12 domaines chevauchant la membrane, il n'existe pas d'homologie de séquence entre les gènes des deux familles (von Wittgenstein *et al.*, 2014). L'une des spécificités des

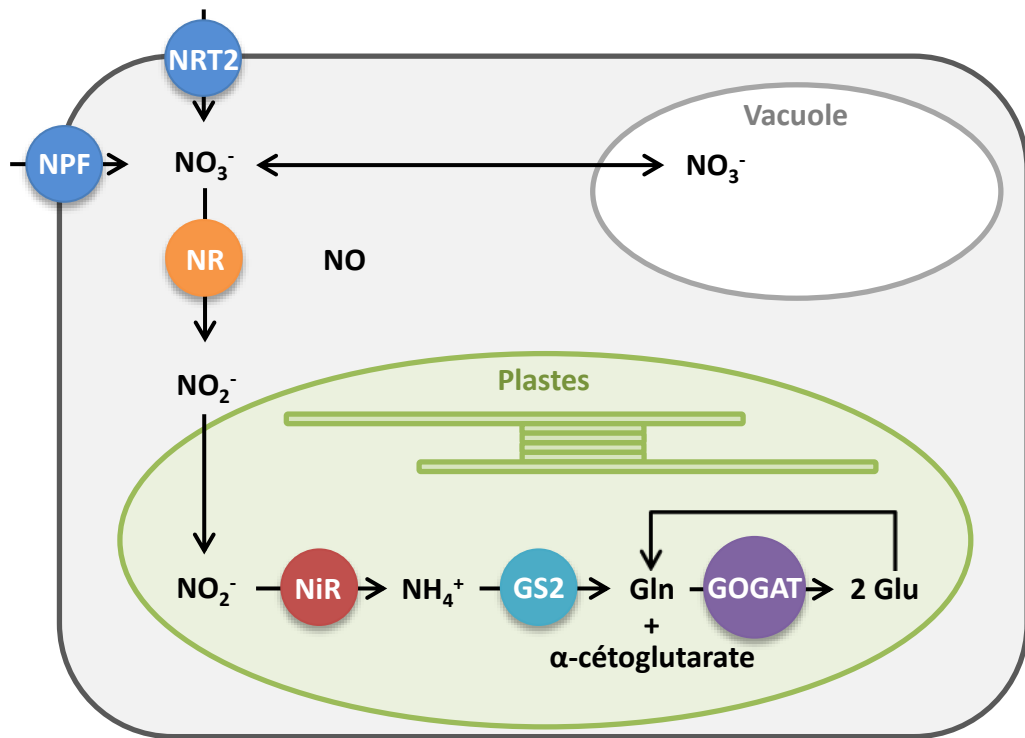


Figure 9: Assimilation des nitrates chez les plantes (d'après Krapp *et al.*, 2015).

Une fois le nitrate absorbé par les transporteurs racinaires de nitrates (NPF et NRT2), il est soit stocké transitoirement dans les vacuoles, soit réduit en nitrite par la nitrate réductase (NR). Le nitrite (NO_2^-) est ensuite transporté dans les chloroplastes, où il est réduit en ammonium par la nitrite réductase (NiR). Par la suite, l'ammonium est incorporé au glutamate par la glutamine synthétase 2 (GS2) pour former de la glutamine. Enfin un groupement amide de la glutamine est transféré sur l' α -cétoglutarate par la GOGAT, formant ainsi deux molécules de glutamate. Les autres acides aminés peuvent être formés à partir de glutamate et de glutamine.

protéines NRT2 provient du fait qu'elles ne sont généralement pas capables de transporter les nitrates seules, mais ont besoin d'interagir avec une protéine partenaire, NAR2.1 (ou NRT3.1), pour être fonctionnelles (Kotur *et al.*, 2012). Il a été proposé que cette unité fonctionnelle était composée d'un dimère de NRT2 et d'un dimère de NAR2.1, formant ainsi un complexe protéique (Kotur et Glass, 2015). Chez *A. thaliana*, il existe 7 protéines NRT2, ayant toutes été caractérisées comme des HATS spécifiques du transport des nitrates (Chopin *et al.*, 2007). Parmi ces protéines, seule NRT2.7 serait active sans l'interaction avec NAR2.1.

NRT2.1, NRT2.2, NRT2.4 et NRT2.5 sont impliqués dans le transport des nitrates depuis le milieu extérieur vers les racines (O'Brien *et al.*, 2016) (Figure 8). Cependant, chacun de ces transporteurs possède des rendements et des conditions dans lesquelles ils sont spécifiquement efficaces. NRT2.1 est le principal transporteur d'azote HATS impliqué dans l'assimilation de l'azote sous différentes conditions, à l'exception de sévères carences en azote. En effet, la mutation KO de *NRT2.1* provoque une réduction supérieure à 75 % de l'assimilation de l'azote dans les racines (Cerezo *et al.*, 2001 ; Filleur *et al.*, 2001 ; Li *et al.*, 2007). NRT2.2 joue un rôle souvent mineur dans l'assimilation de l'azote (Li *et al.*, 2007). NRT2.4 est impliqué dans l'assimilation de l'azote dans les milieux très pauvres en nitrates, de par sa très forte affinité pour les nitrates (Kiba *et al.*, 2012).

II-2 Assimilation du nitrate

Une fois absorbés par la plante, les nitrates (NO_3^-) doivent être réduits en nitrite (NO_2^-), puis en ammonium (NH_4^+) afin d'être incorporés dans les acides aminés (Figure 9). La réduction des nitrates peut s'effectuer au niveau des racines, ou des feuilles, après l'exportation du nitrate dans les feuilles par l'intermédiaire du xylème. Cependant, la proportion de nitrates réduits dans ces deux compartiments est variable selon les conditions environnementales et les espèces de plantes considérées (Smirnoff et Stewart, 1985). Dans un premier temps, la réduction du nitrate en nitrite est catalysée dans le cytosol par la nitrate réductase (NR) (Meyer et Stitt, 2001).

Du fait de leur toxicité pour la plante, les nitrites sont rapidement transférés dans les chloroplastes, où ils sont réduits en ammonium par la nitrite réductase (NiR). Plusieurs gènes codant des NiR ont été clonés et leur nombre varie selon les espèces (1 à 2 copies) (Meyer et Stitt, 2001). L'ammonium, provenant de la réduction des nitrates, mais également de la photorespiration ou du recyclage des acides aminés, est principalement assimilé dans les plastes/chloroplastes par le système GS/GOGAT (Lea et Mifflin, 1974 ; Lea et Forde, 1994). La glutamine synthétase (GS) fixe l'ammonium sur les molécules de glutamate afin de former de la glutamine. Deux classes de gènes codent pour la GS, *GLN1* et *GLN2*. Les gènes de la famille *GLN1* codent des isoformes cytosolique de GS1. Ces isoformes sont présentes dans différents organes, tels que les racines ou

la tige, et sont impliquées dans le recyclage de l'ammonium durant des étapes développementales spécifiques, comme la sénescence des feuilles, ainsi que dans la synthèse de la glutamine pour le transport dans la sève phloémienne (Bernard et Habash, 2009). *GLN2* code la GS2 chloroplastique, impliquée dans l'assimilation primaire de l'ammonium, provenant de la réduction des nitrates chez les plantes C3 et C4, et la réassimilation de l'ammonium produit par la photorespiration des plantes C3. Chez l'ensemble des espèces étudiées, un seul gène *GLN2* a été identifié.

Par la suite, la glutamine réagit avec le 2-oxoglutarate pour former deux molécules de glutamate. Cette étape est catalysée par la glutamate synthase (ou glutamine 2-oxoglutarate aminotransférase, GOGAT). Deux différentes formes de glutamate synthase sont présentes chez les plantes, la Fd-GOGAT et la NADH-GOGAT, utilisant respectivement la ferrédoxine et le NADH comme donneur d'électron (Vanoni *et al.*, 2005). La Fd-GOGAT est majoritairement localisée dans les chloroplastes des feuilles, alors que la NADH-GOGAT est localisée dans les plastides des tissus non chlorophylliens. L'azote est ensuite transféré à d'autres substrats carbonés, tels que les acides α -cétoniques, par transamination, afin de former de nouveaux acides aminés (aspartate, alanine, glycine...), eux-mêmes étant des précurseurs des autres acides aminés (Figure 10). Les acides aminés alors synthétisés peuvent être stockés transitoirement dans les vacuoles, transportés dans d'autres tissus ou utilisés pour la synthèse de protéines.

En plus du cycle GS/GOGAT, trois enzymes semblent également participer à l'assimilation de l'ammonium, l'asparagine synthétase, la carbamoyl phosphate synthase et la NADH-glutamate déshydrogénase mitochondriale. L'asparagine synthétase (AS) catalyse le transfert, ATP dépendant, du groupement amine de la glutamine vers une molécule d'aspartate, formant ainsi du glutamate et de l'asparagine (Lam *et al.*, 2003). Masclaux-Daubresse *et al.* (2006) ont mis en évidence que l'AS pouvait également utiliser l'ammonium comme substrat. *A. thaliana*, possède trois gènes codant l'AS (ASN1, ASN2 et ASN3). L'asparagine possédant un ratio N/C plus important que la glutamine, elle peut donc être utilisée comme composé de transport longue distance ou de stockage, particulièrement chez les légumineuses (Rochat et Boutin, 1991 ; Lam *et al.*, 2003). La carbamoyl phosphate synthase (CPSase) permet la formation de carbomoyl phosphate, un précurseur de la citrulline et de l'arginine, à partir de bicarbonate, d'ATP et d'ammonium ou du groupement amine de la glutamine, dans les plastides. La NADH-glutamate déshydrogénase mitochondriale peut incorporer l'ammonium dans le glutamate, en réponse au stress provoqué par une forte quantité d'ammonium (Skopelitis *et al.*, 2006). Cependant, l'activité catalytique majeure de cette enzyme est la désamination du glutamate (Masclaux-Daubresse *et al.*, 2006 ; Purnell et Botella, 2007).

II-3 Réponse de la plante à la carence en nitrate

Les plantes soumises à une carence azotée sont affectées dans leur architecture, se traduisant par une réduction de la croissance des parties aériennes (Zhao *et al.*, 2005), une augmentation de la production de racines secondaires (Forde, 2002 ; Forde, 2014), une accélération de la sénescence due à une remobilisation de l'azote des feuilles vers les racines (Thomas et de Villiers, 1996 ; Kato *et al.*, 2005) et une floraison précoce (Vidal *et al.*, 2014). Des expériences de split-roots (la carence azotée n'est appliquée que sur une partie des racines de la plante), réalisées chez *A. thaliana*, ont montré que la plante était capable de s'adapter localement à la carence en nitrate en augmentant l'expression de gènes impliqués dans le transport des nitrates dans la partie racinaire exposée au milieu riche en nitrate (Gansel *et al.*, 2001). Cependant, ce phénomène n'a pas été observé pour l'ammonium (Gansel *et al.*, 2001).

La carence azotée a également un impact au niveau du métabolisme primaire de la plante. Différentes études montrent une large diminution de la quantité de glutamine, ainsi que du rapport glutamine/glutamate (Foyer *et al.*, 2003), une diminution des teneurs en acides aminés totaux dans les feuilles (Scheible *et al.*, 2000 ; Scheible *et al.*, 1997). Une réduction de la concentration en protéines (Scheible *et al.*, 2000 ; Scheible *et al.*, 1997), des niveaux de chlorophylle et une augmentation de celle de l'amidon (Zhao *et al.*, 2005) a également été observés. La carence azotée module également le métabolisme secondaire. On observe une synthèse de phénylpropanoïdes (Fritz *et al.*, 2006) ainsi qu'une augmentation de la synthèse d'anthocyanes dans les feuilles (Martin *et al.*, 2002). De plus, le statut antioxydant de la plante est perturbé, et après quelques heures de carence, la production de ROS est activée dans les racines d'*A. thaliana* (Shin *et al.*, 2005). De nombreuses analyses ont été effectués chez *A. thaliana* afin d'identifier les réponses transcriptomiques impliqués dans la réponse de la plante suite à un traitement à base de nitrate (Canales *et al.*, 2014). Ces études ont permis de mettre en évidence la régulation de l'expression de plus de 2 000 gènes dans les racines d'*A. thaliana*.

II-4 Relation entre le statut métabolique azoté de la plante et l'infection par un agent pathogène

De nombreuses études ont mis en évidence une modulation du métabolisme azoté des plantes hôtes lors de l'infection par des agents pathogènes. En effet, Ward *et al.* (2010) ont observé une altération rapide de l'abondance des acides aminés chez *A. thaliana* suite à l'infection par *P. syringae*. Lors de l'infection de l'aubergine par *Candidatus Phytoplasma asteris*, une accumulation de lysine et d'asparagine, ainsi qu'une réduction de la quantité d'histidine et d'arginine est observée dans les feuilles infectées (Das et Mitra, 1993). Chez le colza, Wagner *et al.* (2012) ont mis en évidence une corrélation positive entre le contenu global en acides aminés et la quantité de

symptômes lors de l'infection par *Plasmodiophora brassicae*. Les modifications du métabolisme azoté observées lors des interactions plantes hôtes/agents pathogènes sont similaires à celles observées lors des symbioses mycorhiziennes (Kiers *et al.*, 2011).

Ces résultats suggèrent que les agents pathogènes peuvent avoir recours à la reconfiguration du métabolisme azoté de leur plante hôte afin d'en tirer avantage. Cependant, il existe plusieurs raisons pouvant expliquer cette modulation du métabolisme azoté.

L'implication des acides aminés dans les réponses de défense des plantes aux agents pathogènes

Les acides aminés sont des précurseurs de nombreuses molécules impliquées dans la réponse de défense des plantes. La phénylalanine sert de précurseur aux phytoalexines et aux anthocyanes. L'arginine est impliquée dans la formation de monoxyde d'azote (NO) et des polyamines (Winter *et al.*, 2015). Certains antioxydants, tels que le glutathion, sont produits à partir d'acides aminés comme la cystéine, le glutamate et la glycine. En effet, l'inhibition de la GS par le NO aurait pour conséquence la production de glutathion à partir de glutamate et permettrait ainsi de neutraliser les effets néfastes des espèces réactives de l'azote (Melo *et al.*, 2011). Liu *et al.* (2010) ont mis en évidence que la mutation du transporteur d'acides aminés Lysine Histidine Transporteur 1 (LHT1) était suffisante pour augmenter la résistance de *A. thaliana* à *P. syringae*, *C. higginsianum* et *Erysiphe cichoracearum*. Ce gène est surexprimé de façon précoce lors de l'infection chez le génotype sauvage. La mutation de ce gène entraîne une réduction de la concentration de certains acides aminés, particulièrement la glutamine, dans les feuilles et une réponse SA-dépendante. De plus, une corrélation négative a été mise en évidence entre la concentration de glutamine dans les feuilles et le niveau de résistance. Cette résistance a donc été attribuée, à une réponse SA contrôlée par la déficience de la glutamine dans les feuilles.

Les acides aminés comme source de nutrition de l'agent pathogène

On observe que les acides aminés majoritairement accumulés dans les plantes infectées sont ceux préférentiellement utilisés par les agents pathogènes. En effet, lors de l'infection par *Cladosporium fulvum* de la tomate, de nombreux acides aminés sont accumulés dans les feuilles (Solomon et Oliver, 2001). Le GABA, source majoritaire d'azote organique pour l'agent pathogène, se trouve être l'acide aminé accumulé dans les plus grandes proportions (Solomon et Oliver, 2002). Des résultats semblables ont été observés lors de l'infection de la tomate par *P. syringae* pv. *tomato*. Cette fois-ci ce sont le GABA, l'aspartate, le glutamate et la glutamine, qui sont les formes majeures d'acides aminés présentes chez la plante hôte (Rico et Preston, 2008). Le cas des mutants d'*A. thaliana* *rsp1* et *rsp2*, suraccumulateurs de méthionine, thréonine et

isoleucine, est plus particulier. En effet, si la sensibilité à *Hyaloperonospora arabidopsidis* est réduite chez ces mutants par rapport au génotype sauvage (Stuttman *et al.*, 2011), elle reste identique vis-à-vis de *Golovinomyces orontii*. De plus, il est à noter le cas particulier des agents pathogènes obligatoires. En effet, de nombreuses études mettent en avant le fait que chez certains de ces agents pathogènes, il manquerait des gènes impliqués dans des voies métaboliques pourtant essentielles à leur survie (Baxter *et al.*, 2010 ; Spanu *et al.*, 2010 ; Kemen *et al.*, 2011 ; Schwelm *et al.*, 2015). Cela créerait une dépendance totale, en certains métabolites, vis-à-vis de leurs plantes hôtes.

La remobilisation de l'azote lors de l'infection

Les phénomènes de remobilisation de l'azote peuvent également être responsables de la modulation des teneurs en acides aminés lors de l'infection. En effet, le GABA, la proline, l'arginine, la glutamine et l'asparagine, font partie des acides aminés impliqués dans le recyclage, la remobilisation et la translocation de l'azote dans la plante. La détermination de l'abondance relative de plusieurs acides aminés dans les feuilles de tomate infectées par *P. syringae* a montré une très forte accumulation d'asparagine, comparée aux feuilles non infectées (Pérez-García *et al.*, 1998). L'asparagine est le principal moyen de transport de l'azote dans la plante et est impliquée dans les processus de remobilisation de l'azote (Lea, 1980). Cette accumulation d'asparagine est corrélée à l'augmentation de l'activité de la protéine GS1, impliquée dans la remobilisation de l'azote (Pérez-García *et al.*, 1998), ainsi qu'à une induction de l'asparagine synthétase (Olea *et al.*, 2004). Ces résultats suggèrent l'existence d'une voie impliquant GS1 et AS, dont le rôle serait de transférer l'ammonium obtenu par le catabolisme des protéines dans l'asparagine. Les acides aminés semblent donc jouer un rôle important dans la remobilisation de l'azote depuis les tissus infectés. D'autres études ont mis en évidence une induction conjointe des gènes impliqués dans la remobilisation de l'azote et de ceux impliqués dans les réponses de défense. En effet, l'induction de *GS1*, au cours de l'infection du haricot par *C. lindemuthianum*, est corrélée positivement à celles de *PAL3* et *CHS*, deux gènes de défense (Tavernier *et al.*, 2007).

II-5 Impact de la fertilisation azotée sur la défense des plantes

Fertilisation azotée et maladie

L'impact de la disponibilité en azote sur la résistance des plantes aux maladies a été mis en évidence par de nombreuses études, principalement agronomiques (Huber et Watson, 1974 ; Walters et Bingham, 2007 ; Dordas, 2009 ; Fagard *et al.*, 2014). Cependant, du fait des résultats contradictoires observés dans ces différentes études, il est impossible de généraliser l'effet de la fertilisation sur la résistance des plantes aux maladies. L'étude réalisée par Hoffland *et al.* (2000),

basée sur l'impact de la fertilisation azotée sur la résistance de la tomate à quatre agents pathogènes, *P. syringae* pv *tomato*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *O. lycopersicum* et *B. cinerea*, conclut à un effet agent pathogène dépendant de la fertilisation azotée sur la sensibilité de la plante hôte. Pour autant, lorsque l'on regarde les résultats des différentes études sur le sujet, une tendance semble se dégager en fonction du mode de vie de l'agent pathogène. En effet, la fertilisation azotée tend à augmenter la sensibilité des plantes hôtes dans le cas d'agents pathogènes biotrophes et à la diminuer dans le cas des agents pathogènes nécrotrophes (Snoeijers *et al.*, 2000 ; Mittelstraß *et al.*, 2006 ; Dordas, 2009). Dans le cas de la pomme de terre, la sensibilité à *P. infestans*, un agent pathogène hémibiotrophe, est corrélée positivement à la fertilisation azotée (Mittelstraß *et al.*, 2006), *a contrario*, celle à *Alternaria solani*, un agent pathogène nécrotrophe, est corrélée négativement. Malgré la corrélation observée entre le mode de vie de l'agent pathogène et l'effet de la fertilisation azotée sur la résistance de la plante hôte à ce même agent pathogène, il existe des contres exemples. En effet, si la résistance d'*A. thaliana* à *Erwinia amylovora*, une bactérie nécrotrophe, est réduite en condition de faible apport azoté, celle à *B. cinerea*, un champignon nécrotrophe, est augmentée en condition de faible apport azoté (Fagard *et al.*, 2014). De plus, dans certains cas, les résultats obtenus avec le même pathosystème sont contradictoires. En effet, dans le cas de la résistance du colza à *P. brassicae*, tandis que les résultats de deux études suggèrent que l'augmentation de la fertilisation azotée induirait une réduction des symptômes (Dixon, 2009a ; Gossen *et al.*, 2014), une autre indique quelle augmenterait les symptômes (Pryor, 1940).

Sur la base de ces résultats, il paraît évident que l'impact de la fertilisation azotée sur la résistance des plantes aux maladies résulte d'un processus complexe, dans lequel d'autres facteurs que le mode de vie de l'agent pathogène sont à prendre en compte. L'impact de la fertilisation azotée sur la résistance peut être dépendant de l'isolat testé (cas de la tomate vis-à-vis de *B. cinerea* (Lecompte *et al.*, 2010) ou des génotypes de la plante hôte (cas de la résistance du riz à *M. oryzae*, Ballini *et al.*, 2013). La variabilité de l'impact de la fertilisation azotée en fonction de la combinaison génotype de la plante hôte et isolat de l'agent pathogène suppose un effet isolat-spécifique des facteurs de résistance mis en jeu dans l'interaction.

Modulation des facteurs génétiques de résistance par la fertilisation azotée

Malgré l'évidence de l'impact de la fertilisation azotée sur la résistance aux maladies dans de nombreux pathosystèmes, seulement deux études, réalisées sur le riz, se sont intéressées à l'impact de la fertilisation sur l'effet des gènes/QTL de résistance (Talukder *et al.*, 2005 ; Ballini *et al.*, 2013). Talukder *et al.* (2005) ont réalisé une analyse génétique de la résistance à *M. grisea* chez une population de 250 lignées recombinantes (RIL) issue du croisement des cultivars Bala et

Tableau 1: Liste des QTL de résistance à *M. grisea* détectés dans la population issue du croisement entre Bala et Azucena (*O. sativa*) (d'après Talukder *et al.*, 2005).

DS: disease severity; **L/L:** number of lesions per leaf; **LA:** lesion area; **QTL x E:** LOD de l'interaction QTL x environnement; **a:** effet aditif

QTL	Nearest Marker	Trait	Low nitrogen			High nitrogen			QTL x E
			LOD	a	R ²	LOD	a	R ²	
1.2	C1370	LA	5.9	-0.20	13.2				3.3
4.1	e18m43.17	DS	3.6	-0.45	12.2				2.1
6.1	e12m36.1	LA	4.0	0.20	13.0	4.6	0.13	12.3	2.4
6.3	RZ682	L/L	3.8	-0.63	13.8				0.0
		DS	3.5	-0.51	14.3	5.8	-0.47	17.0	0.0
7.1	G338	LA	5.1	-0.18	11.1	5.9	-0.15	16.5	1.2
7.2	e12m37.14	LA	3.6	-0.24	9.3				4.0
9.1	RM242	LA				4.2	0.12	12.2	1.8
11.2	G320	DS	3.5	-0.43	10.6				1.3
12.1	R1933	LA	12.0	-0.32	32.7	5.4	-0.15	16.7	7.4*
		DS	8.8	-0.69	27.3	4.7	-0.45	16.5	1.8
		L/L	8.3	-0.81	23.6	4.8	-0.76	16.1	0.1

Azucena. La surfertilisation azotée entraînait une augmentation globale des symptômes chez les génotypes de la population RIL, ainsi que chez le cultivar Azucena. Un total de 12 QTL ont été détectés sur la base des trois traits liés à l'infection par *M. grisea* (Tableau I), dont 6 sont détectés dans les deux conditions d'azote, un est détecté uniquement en forte fertilisation azotée et 5 sont détectés en faible condition azotée. De plus, les effets des QTL détectés dans les deux conditions azotées sont légèrement variables en fonction des conditions de fertilisation azotée. Par ailleurs, lors d'un criblage réalisé chez une collection de 14 cultivars de riz sélectionnés pour leur différent niveau de résistance à *M. oryzae*, (Ballini *et al.*, 2013) ont montré que pour 7 cultivars la sensibilité à la pyriculariose est augmentée par la fertilisation azotée alors que pour les 7 autres la réponse à l'infection n'est pas modulée. Des tests réalisés avec 3 cultivars dont la résistance est contrôlée par un gène majeur (CO39 duplex de gènes majeurs *Co39/Pia*, C101A51 gène majeur *Pi2* et C104Lac gène majeur *Pi1*) ont permis de mettre en évidence que seule la résistance du cultivar C104Lac, conférée par le gène majeur *Pi1*, était impactée négativement par l'augmentation de la fertilisation azotée. Enfin, un QTL impliqué dans l'augmentation de sensibilité par la surfertilisation, *NIS1*, a été identifié lors d'une analyse génétique réalisée sur une population CSSL (chromosomal segment substitution lines) dans cette même étude.

II-6 Implication des transporteurs d'azote dans l'interaction plante hôte-agent pathogène

En plus de leur rôle dans le transport des nitrates, certains transporteurs ont été identifiés comme jouant un rôle dans la perception des nitrates, ils sont alors caractérisés comme étant des transporteurs et des récepteurs (Ho *et al.*, 2009 ; Gojon *et al.*, 2011). Par exemple, NRT2.1 est impliqué dans la modification du développement des racines latérales, indépendamment de son rôle dans le transport des nitrates (Little *et al.*, 2005). Par la suite, deux études ont révélé que deux gènes de la famille *NRT2*, *NRT2.1* et *NRT2.6*, jouaient un rôle dans les réponses de défense d'*A. thaliana*, respectivement vis-à-vis des agents pathogènes *P. syringae* et *E. amylovora* (Camanes *et al.*, 2012 ; Dechorgnat *et al.*, 2012). En effet, le mutant *nrt2.1* d'*A. thaliana* est plus résistant que le sauvage Col-0. Cette augmentation de résistance est attribuée à une réponse SA dépendante plus rapide, ainsi qu'à une sensibilité à la coronatine, une toxine bactérienne, réduite chez la plante hôte (Camanes *et al.*, 2012 ; Camañes *et al.*, 2012). Les voies hormonales de l'ABA et du JA sont également impactées chez ce mutant, mais cette modification résulte probablement de l'activation de la voie du SA. De plus, la mutation du gène *NRT2.1* dans un fonds génétique déficient en SA, n'entraîne pas de variation de la sensibilité par rapport à Col-0. En plus de la réponse SA, le mutant *nrt2.1* accumule des acides aminés aromatiques et des phénylpropanoïdes en plus grande quantité, ce qui peut également contribuer à la réduction de la sensibilité (Camañes *et al.*, 2012). L'analyse transcriptomique réalisée entre le mutant *nrt2.1* et Col-0 a confirmé l'expression différentielle des

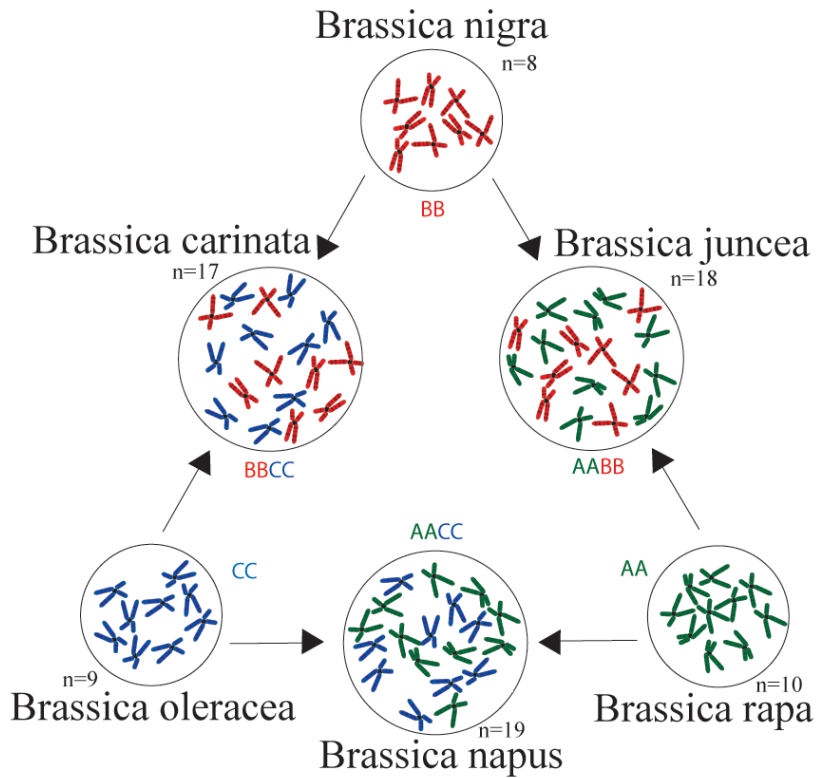


Figure 11 : Triangle de U (1935).

Récapitulatif des évènements d'hybridation interspécifique impliqués dans l'apparition de nouvelles espèces chez les *Brassica*.

gènes impliqués dans la synthèse du SA et des acides aminés aromatiques. Une augmentation de résistance a également été observée chez ce mutant vis-à-vis de l'infection par le champignon nécrotrophe *Plectosphaerella cucumerina* (Gamir *et al.*, 2014).

NRT2.6 est impliqué dans la résistance d'*A. thaliana* à la bactérie nécrotrophe *E. amylovora* (Dechorgnat *et al.*, 2012). Le mutant *A. thaliana nrt2.6* est en effet plus sensible à cet agent pathogène que Col-0. L'augmentation de la sensibilité du mutant est corrélée avec une réduction de l'accumulation des ROS. Le lien entre *nrt2.6* et les ROS ne se limite pas à l'interaction hôte/agent pathogène, en effet, il est aussi observé suite au traitement du mutant *nrt2.6* avec un herbicide. Cependant, aucun lien moléculaire n'a pu être établi entre la fonction de la protéine NRT2.6 et la synthèse de ROS.

Ces résultats suggèrent que les transporteurs/récepteurs de nitrate jouent un rôle important dans les réponses de défense des plantes, et que cela serait même indépendant de leur fonction de transporteur de nitrate.

III Le pathosystème *Brassica napus* - *Plasmodiophora brassicae*

III-1 *Brassica napus*, une espèce d'intérêt agronomique

Origine de l'espèce et structuration de son génome

Le colza (*Brassica napus*, génome AACC, $2n = 38$), est une espèce allotétraploïde issue de l'hybridation interspécifique naturelle de deux parents diploïdes, la navette (*Brassica rapa*, génome AA, $2n = 20$) et le chou (*Brassica oleracea*, génome CC, $2n = 18$) (Figure 11). Selon les datations moléculaires (Chalhoub *et al.*, 2014), la formation du colza remonterait à environ 7 500 ans, et pourrait avoir eu plusieurs points d'origine en Europe (Snowdon *et al.*, 2007). Le colza est une espèce annuelle principalement autogame appartenant à la famille des *Brassicaceae*. Cette famille comporte plus de 3 000 espèces, parmi lesquelles on retrouve notamment la plante modèle *A. thaliana*.

Les Brassicacées seraient issues d'un ancêtre commun, à $n=8$ chromosomes, ayant connu plusieurs cycles de duplications (Lagercrantz et Lydiate, 1996 ; Parkin *et al.*, 2003, 2005 ; Schranz *et al.*, 2006). Sur la base de cet ancêtre commun, 24 blocs chromosomiques, représentant l'intégralité du génome d'*A. thaliana*, ont été mis en évidence par Schranz *et al.* (2006). Ces 24 blocs chromosomiques permettent de décrire l'ensemble des génomes des différentes Brassicacées.

Les chromosomes du génome A de *B. rapa* et du génome C de *B. oleracea* présentent des relations d'homologie partielle à totale (Parkin *et al.*, 2014). Il existe une forte colinéarité entre les deux sous-génomes de *B. napus* et les génomes de ses progéniteurs, cependant, le séquençage de

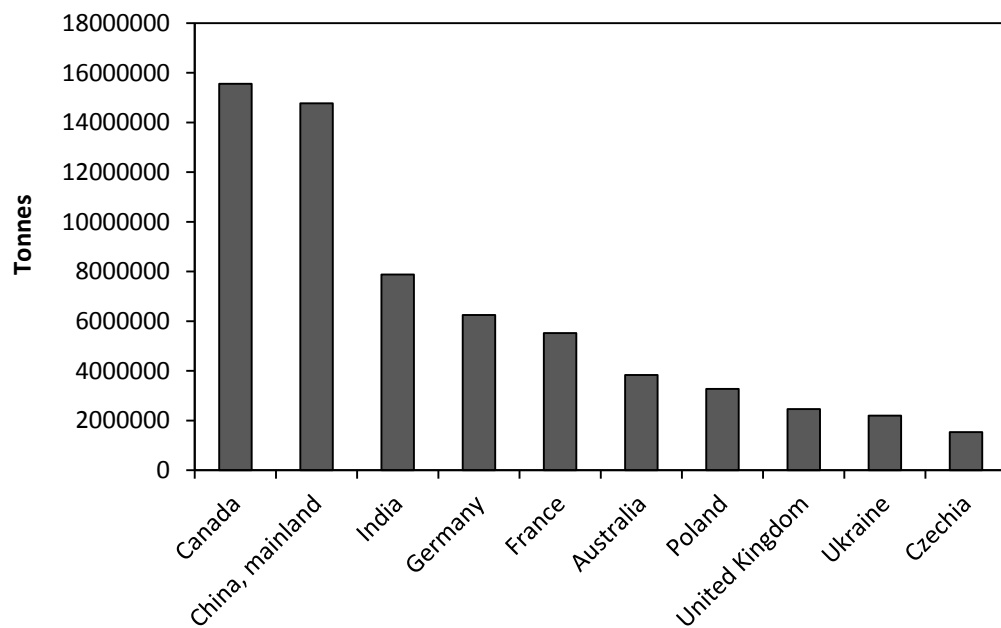


Figure 12 : Production de colza dans les principaux pays producteurs en 2014 (FAOSTAT).

B. napus a également mis en évidence la présence de modifications structurales et fonctionnelles depuis sa formation (Chalhoub *et al.*, 2014). Le séquençage du génome de *B. napus* a permis de déterminer la taille de ses deux sous-génomes, A et C, respectivement de 314,2 Mb et 528,8 Mb. Le génome de *B. napus* contient 101 040 gènes, dont 91 167 ont été confirmés par comparaison au protéome prédit de *B. rapa* et *B. oleracea*. En comparaison, le génome d'*A. thaliana* est d'une taille de 135 Mb et ne comporte que 25 498 gènes (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). En se basant sur les différents éléments de duplication observés chez les Brassicacées, on peut donc s'attendre *a priori* à retrouver 6 copies de chaque gène d'*A. thaliana* dans le génome du colza (3 copies dans le génome A et 3 copies dans le génome C), cependant, ce nombre peut grandement varier selon les gènes (0 à 72 copies) (Chalhoub *et al.*, 2014).

Importance économique

Le colza est l'une des quatre principales espèces oléagineuses cultivées, avec le soja, le palmier à huile et le tournesol (FAOSTAT, 2014). La culture du colza s'est intensifiée au cours des 30 dernières années, notamment avec le développement de la part des biocarburants dans le transport terrestre. Les deux principaux pays producteurs de colza sont le Canada et la Chine, suivent l'Inde, l'Allemagne et la France (Figure 12). En France, où les zones de production sont essentiellement concentrées dans le nord du pays, un total de 4.8 millions de tonnes de colza a été produit en 2014. Le rendement moyen du colza en France était de 33 q/ha (Agreste, 2012). Le rendement d'une culture de colza est dépendant des conditions pédoclimatiques, des pratiques culturales, ainsi que du type de variété utilisée. Il existe deux types de colza, le colza d'hiver et le colza de printemps, qui se distinguent par leur cycle de vie et par conséquent par les zones géographiques dans lesquelles ils sont cultivés. Dans les zones au climat tempéré, telles que l'Europe de l'Ouest, on cultive majoritairement du colza d'hiver. Semé à la fin de l'été, il passe l'hiver sous forme de rosette et reprend son cycle végétatif au printemps suivant. A l'inverse, dans les zones aux hivers rigoureux, tel que l'Asie, l'Australie, le Canada ou l'Europe de l'Est, on cultive du colza de printemps. Semé à la fin de l'hiver, il accomplit son cycle de développement plus rapidement (Figure 13).

La valorisation du colza se fait sous deux formes : l'huile, utilisée majoritairement dans l'alimentation humaine, mais dont la part allouée aux biocarburants est en augmentation et le tourteau, résidu riche en protéines obtenu après le processus d'extraction de l'huile et utilisé pour l'alimentation animale.

Les agents pathogènes du colza et la sélection variétale

Le colza est soumis à l'agression par quatre principaux agents pathogènes en France, *Leptosphaeria maculans* (Phoma), *Sclerotinia sclerotium* (Sclérotinia), *Erysiphe cruciferarum* (Oïdium) et *Plasmodiophora brassicae* (Hernie). L'impact de ces maladies entraîne des pertes de rendement importantes, allant jusqu'à 50 % pour le phoma, 19 q/ha pour sclérotinia et 10 q/ha pour l'oïdium. Les pertes de rendement les plus importantes sont obtenues lorsque les conditions climatiques sont favorables au développement de la maladie, mais également lors de l'utilisation de variétés de colza sensibles.

La résistance aux agents pathogènes est un critère majeur pour l'amélioration des variétés de colza. Lors de l'inscription d'une nouvelle variété de colza au catalogue (CTPS), outre les valeurs agronomiques telles que le rendement, le nombre de grains, la teneur en huile, en protéines, en acide érucique et en glucosinolates, une évaluation du comportement de la variété vis-à-vis de la résistance aux maladies est également effectuée. Actuellement en France, les deux maladies évaluées pour le colza d'hiver sont le phoma et la cylindrosporiose. En ce qui concerne la cylindrosporiose, il n'y a pas de seuil de refus de la variété, du fait de la possibilité de lutte chimique contre cette maladie. Il n'en est pas de même pour le phoma, maladie pour laquelle, en l'absence de moyen de lutte chimique efficace, seules les résistances génétiques permettent de limiter l'impact sur le rendement. Récemment, des tests ont été mis au point pour permettre l'évaluation de la sensibilité/résistance à certains isolats de *P. brassicae* des nouvelles variétés de colza, lors des essais pour l'inscription variétale (Orgeur *et al.*, 2015).

III-2 *Plasmodiophora brassicae*, l'agent causal de la hernie des crucifères

Distribution géographique

En Europe, les premières descriptions de la présence de la hernie des crucifères sur des *Brassica* cultivées remonteraient au XIII^{ème} siècle, cependant, la présence de hernie aurait pu être observée dès la Rome antique (Dixon, 2009b). Au cours du XVIII^{ème} siècle, la hernie s'est propagée en Europe, elle a été observée en Angleterre au XVIII^{ème} siècle et en Ecosse au XIX^{ème} siècle (Hirai, 2006). La propagation de la hernie correspond à la révolution agricole, observée en Europe au XVIII^{ème} siècle et au XIX^{ème} siècle, période durant laquelle les surfaces cultivées de Brassicacées ont augmenté. En 1852, la présence de hernie a été rapportée en Amérique, plus précisément aux Etats Unis (Karling, 1968), probablement dû au transport de fourrages contaminés provenant d'Europe et transportés par les colons.

Ce n'est qu'en 1875, que le chercheur russe M. S. Woronin identifia l'agent pathogène responsable de la hernie des crucifères, *Plasmodiophora brassicae* (Woronin, 1878). La présence

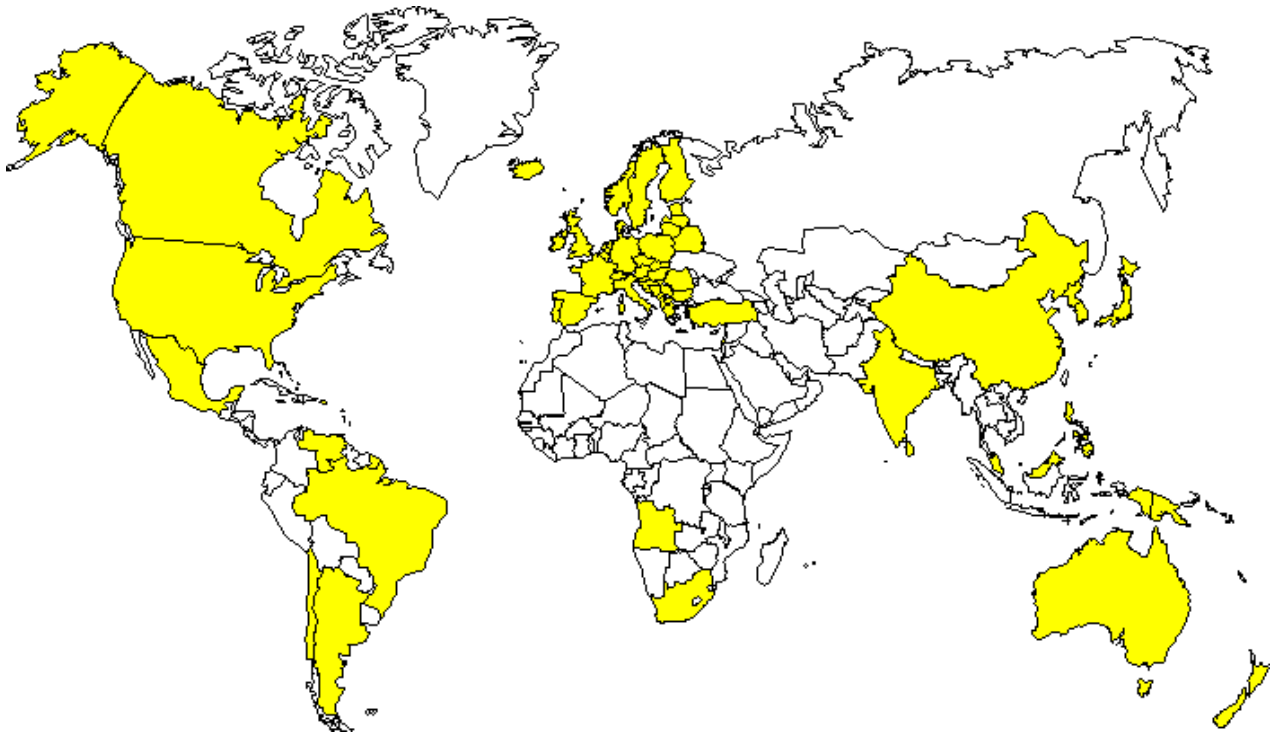


Figure 14 : Distribution géographique de la hernie des crucifères dans le monde (d'après Dixon, 2009).
 Sont représentés en jaune les pays où des cas de hernie ont été identifiés.

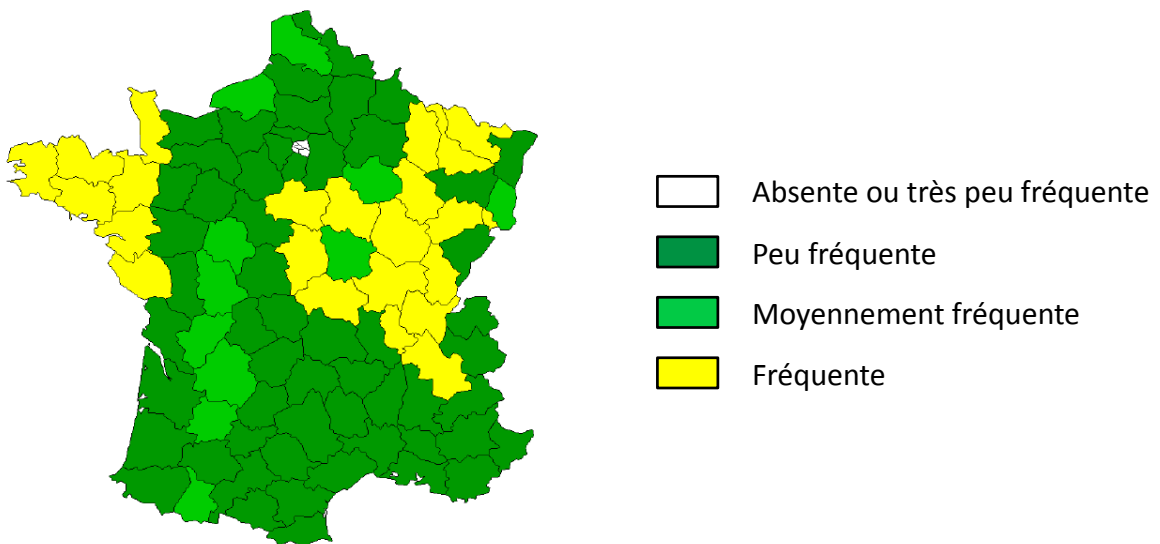


Figure 15 : Distribution de la hernie des crucifères en France en 2008 (d'après le Terre Inovia).

de l'agent pathogène fut ensuite observée en Asie dans les années 1890, plus particulièrement au Japon (Ikegami *et al.*, 1981). Cependant, ce n'est qu'à partir de la première moitié du XXème siècle que la hernie a été décrétée comme l'une des principales maladies des *Brassica* légumières (Dixon, 2009b). De nos jours, la hernie est présente dans plus de 60 pays dans le monde, particulièrement dans les zones au climat doux et tempéré, où la culture de *Brassica* est présente (Dixon, 2009b) (Figure 14).

En France, la hernie des crucifères n'est pas la principale maladie des Brassicacées. Toutefois, elle est la maladie racinaire majeure et semble progresser régulièrement, étant considérée comme une maladie émergente ou ré émergente (Terres Inovia, 2008) (Figure 15). Cependant, en Chine et au Canada, les deux principaux producteurs de Brassicacées, le développement de la hernie est beaucoup plus préoccupant (Chai *et al.*, 2014 ; Strelkov et Hwang, 2014) (Figure 16).

Symptômes et impact économique

La hernie des Crucifères est caractérisée par le développement de galles au niveau du système racinaire, qui perturbe grandement l'alimentation hydrique, et par conséquent minérale, de la plante. Au niveau des parties aériennes, le déficit d'alimentation hydrique et minérale entraîne un flétrissement, un retard de croissance ainsi qu'une sénescence prématurée de la plante (Figure 17). Du fait de sa capacité à potentiellement infecter la totalité des 3 700 espèces de la famille des Brassicacées, parmi lesquelles des espèces cultivées telles que *B. napus* (colza), *B. oleracea* (choux) et *B. rapa* (navette), l'impact économique de la hernie des crucifères est très important. A l'échelle mondiale, cette maladie entraînerait une perte de l'ordre de 10 à 15 % de rendement (Dixon, 2009b). Cependant dans certains cas, elle peut entraîner la destruction complète de la culture. Au Canada, et plus particulièrement en Alberta, dans les sols fortement infectés, la hernie provoque des pertes de rendement pouvant aller de 30 à 100 % (Howard *et al.*, 2010).

Biologie de *P. brassicae*

P. brassicae est un eucaryote unicellulaire, parasite biotrophe obligatoire de la division des *Rhizaria*, et de l'ordre des *Plasmodiophorida* (Burki *et al.*, 2010 ; He *et al.*, 2014).

La faible taille des chromosomes de *P. brassicae* rend leur étude impossible par les méthodes conventionnelles de cytogénétique. La première étude effectuée par microscopie électronique (Braselton, 1982), a permis d'estimer le nombre de complexes synaptonémaux à 20. Les études suivantes, réalisées par électrophorèse en champ pulsé, ont permis d'estimer le caryotype, la taille et le nombre de chromosomes de *P. brassicae* (Ito *et al.*, 1994 ; Bryan *et al.*, 1996 ; Graf *et al.*, 2001 ; Fählng *et al.*, 2004 ; Siemens *et al.*, 2009) avec des résultats différents

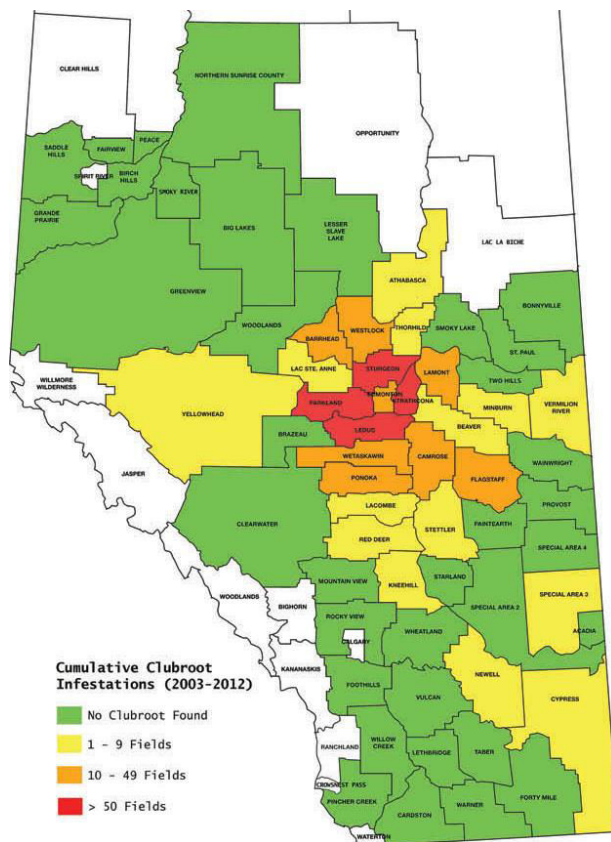


Figure 16: Distribution de la hernie des crucifères en Alberta, Canada (d'après Strelkov et al., 2014).



Figure 17 : Symptômes de la hernie des crucifères, provoqués par *P. brassicae*, au niveau racinaire et aérien (d'après Hwang et al., 2002).
 (A) développement de la galle et (B) flétrissement des feuilles.

selon les études : 13 bandes chromosomiques de 1.9 Mb à 750 Kb (Ito *et al.*, 1994), 6 bandes de 1.7 Mb à 680 Kb (Bryan *et al.*, 1996) et 16 bandes de 2.2 Mb à 680 Kb (Graf *et al.*, 2001). L'étude de plusieurs isolats a permis aussi de mettre en évidence un polymorphisme de taille ainsi que de nombre de chromosomes (Graf *et al.*, 2004). Les différents résultats obtenus selon les études peuvent donc être expliqués par les différents isolats utilisés ainsi que par la méthode d'analyse, et plus particulièrement le biais de séparation des bandes chromosomiques de tailles similaires en électrophorèse en champ pulsé.

L'étude des complexes synaptonémaux (Braselton, 1982) et de la réinfection par des complexes dicaryotes (Kobelt, 2000) ont permis de mettre en évidence la présence d'une reproduction sexuée chez *P. brassicae*, développant par la même occasion l'intérêt de l'étude de la recombinaison chez cet agent pathogène. De plus, le grand nombre d'isolats de *P. brassicae* coexistant dans le sol et même au sein d'une même galle (Jones *et al.*, 1982a, b; Fähling *et al.*, 2003), favorise la probabilité de brassage génétique. Toutefois aucun gène impliqué dans la reproduction sexuée n'a pu être déterminé à partir de la séquence de *P. brassicae* (Schwelm *et al.*, 2016).

Le génome de *P. brassicae* a été séquencé à partir d'ADN génomique de spores de repos provenant de l'isolat monospores e3 (Schwelm *et al.*, 2015). Les 24 megabases du génome ont été assemblés, par assemblage de novo, en 165 scaffolds. Ce génome est petit en comparaison de celui des deux autres espèces appartenant au taxon des *Rhizaria*, *Bigelowiella natans* (~100 Mb) et *Reticulomyxa filosa* (~320 Mb), mais plus grand que suggéré précédemment (20.3 Mb). La haute densité en gènes et le faible pourcentage de séquences répétées contribuent à la petite taille du génome de *P. brassicae* (Schwelm *et al.*, 2015). Un total de 9 730 gènes a été prédit, grâce à l'utilisation conjointe d'outils bio-informatique de prédiction et de données de RNA-seq. Parmi ces gènes, on notera l'absence de certains gènes codant des protéines impliquées dans l'assimilation de l'azote, dans l'assimilation du soufre mais aussi dans la synthèse de la thiamine et de plusieurs acides aminés tels que le tryptophane et l'arginine. Cela suggère que *P. brassicae* est dépendant de sa plante hôte pour la nutrition azotée. L'absence d'acide gras synthases suggère aussi que *P. brassicae*, contrairement à *Spongospora subterranea*, autre espèce des *Plasmodiophorida* provoquant la galle poudreuse de la pomme de terre, ne peut synthétiser *de novo* les lipides (Schwelm *et al.*, 2015). Par ailleurs, aucune fonction putative n'a pu être assignée à la plupart des 553 protéines prédites sécrétées. Les protéines du sécrétome de *P. brassicae* possédant des domaines protéiques prédits présentent des enrichissements en petites protéines riches en cystine, chitine, ankyrines, protéases et inhibiteurs de protéases lesquels sont des effecteurs connus chez d'autres agents pathogènes (Schwelm *et al.*, 2015). Le séquençage ou ré-séquençage de cinq autres

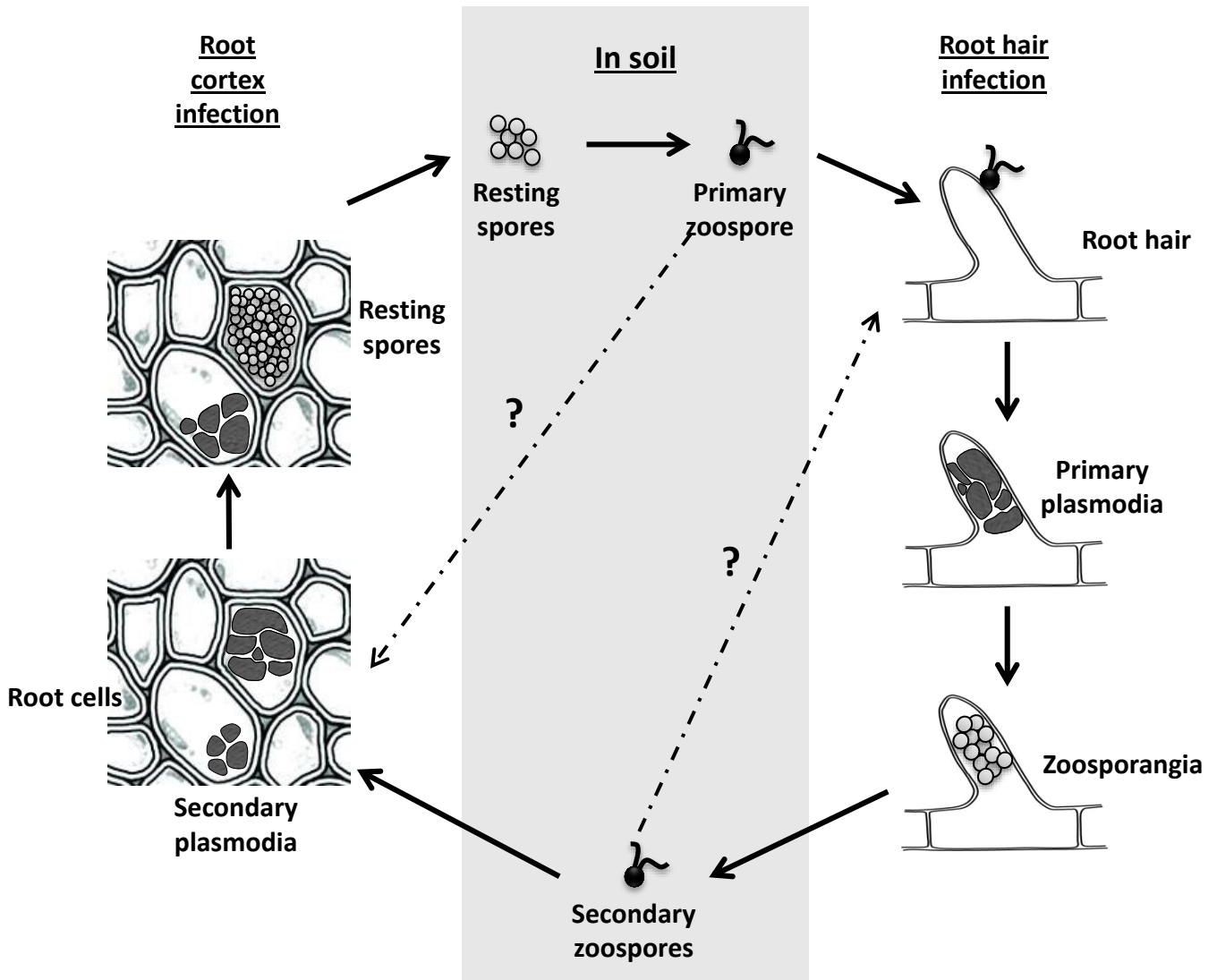


Figure 18: Cycle de vie de *P. brassicae* (d'après Kageyama et Asano, 2009).

Le cycle de vie de *P. brassicae* se décompose en trois parties: la survie des spores de repos dans le sol, l'infection primaire des poils absorbants et l'infection secondaire des cellules corticales.

isolats d'origine canadienne révèlent une organisation génomique globale similaire entre les isolats avec quelques différences notamment dans le nombre de gènes (Rolfe *et al.*, 2016).

Cycle de vie

Le cycle de vie de *P. brassicae* est constitué de trois stades distincts : la survie dans le sol, l'infection des poils absorbants et l'infection des cellules corticales (Ayers, 1944 ; Ingram et Tommerup, 1972 ; Naiki, 1987) (Figure 18). L'inoculum primaire est composé de spores de repos, dispersées par les tissus infectés lors du cycle d'infection précédent dans le sol alentour. Les spores de repos ont la forme d'une sphère, couverte d'épines, d'environ 3 µm (Williams et McNabola, 1967 ; Buczacki et Cadd, 1976 ; Ikegami *et al.*, 1978). Ces spores de repos ont une capacité de survie très importante dans le sol, hors de leur plante hôte, permettant à l'agent pathogène d'attendre une nouvelle plante hôte. En effet, la période de demi-vie d'un inoculum est estimée entre 3 et 6 ans (Wallenhammar, 1996). De plus, il est nécessaire d'attendre plus de 17 ans pour que le niveau d'infestation des champs les plus infectés passe sous le seuil de détection (Wallenhammar, 1996). Lors de leur germination, chaque spore de repos haploïde relargue une zoospore primaire biflagellée, de 2.8 à 5.9 µm, en forme de bâton ou de poire (Ayers, 1944). Les deux flagelles diffèrent par leur taille ainsi que par la forme de leur terminaison.

Lorsqu'une zoospore primaire atteint la surface du chevelu racinaire, elle pénètre la paroi cellulaire. Cette étape est appelée infection du chevelu racinaire ou infection primaire. La formation de plasmode primaire s'effectue ensuite dans les cellules du chevelu racinaire. Au sein des plasmodies, de nombreuses divisions nucléaires se produisent de façon synchronisée, jusqu'à ce que le plasmode se clive en zoosporanges. Ces zoosporanges s'agrègent entre eux dans les cellules du chevelu racinaire, puis relarguent 4 à 16 zoospores secondaires. Suite à cette étape, les zoosporanges vides restent dans le chevelu racinaire. Les zoospores secondaires ne peuvent être différenciées visuellement des zoospores primaires. Des zoospores secondaires binucléées ont été observées et interprétées comme résultant de la fusion de deux zoospores secondaires, et non d'une division du noyau (Tommerup et Ingram, 1971 ; Ingram et Tommerup, 1972).

Les zoospores secondaires pénètrent dans les cellules du tissu cortical, une étape appelée infection corticale ou infection secondaire. Une fois à l'intérieur de ces cellules, il y a de nouveau production de plasmodies, cette fois-ci secondaires. Ces plasmodies secondaires permettent la prolifération de l'agent pathogène et sont responsables de l'hypertrophie et l'hyperplasie des cellules de la plante hôte ce qui entraîne l'apparition d'une galle. Les plasmodies secondaires transitent de l'état mononucléé à l'état plurinucléé grâce à des divisions successives de leur noyau au cours de l'infection secondaire (Garber et Aist, 1979). Pour finir, un clivage complexe des

Tableau 2: Gammes d'hôtes différentiels utilisées pour la différenciation des pathotypes de *P. brassicae* (d'après (A) Williams *et al.*, 1966, (B) Buczacki *et al.*, 1975 et (C) Somé *et al.*, 1996).

A	Espèce	Sous-espèce	Cultivar
	<i>Brassica napus</i>	<i>napobrassica</i>	Laurentian
	<i>Brassica napus</i>	<i>napobrassica</i>	Wilhelmsburger
	<i>Brassica oleracea</i>	<i>capitata</i>	Jersey Queen
	<i>Brassica oleracea</i>	<i>capitata</i>	Badger Shipper

B	Nom	Espèce	Sous-espèce	Cultivar
	ECD1	<i>Brassica rapa</i>	<i>rapifera</i>	
	ECD2	<i>Brassica rapa</i>	<i>rapifera</i>	
	ECD3	<i>Brassica rapa</i>	<i>rapifera</i>	
	ECD4	<i>Brassica rapa</i>	<i>rapifera</i>	
	ECD5	<i>Brassica rapa</i>	<i>pekinensis</i>	Granaat
	ECD6	<i>Brassica napus</i>	<i>oleifera</i>	Nevin
	ECD7	<i>Brassica napus</i>	<i>napus</i>	
	ECD8	<i>Brassica napus</i>	<i>napus</i>	
	ECD9	<i>Brassica napus</i>	<i>napus</i>	
	ECD10	<i>Brassica napus</i>	<i>napus</i>	Wilhelmburger
	ECD11	<i>Brassica oleracea</i>	<i>capitata</i>	Badger Shipper
	ECD12	<i>Brassica oleracea</i>	<i>capitata</i>	Bindsachsener
	ECD13	<i>Brassica oleracea</i>	<i>capitata</i>	Jersey Queen
	ECD14	<i>Brassica oleracea</i>	<i>capitata</i>	Septa
	ECD15	<i>Brassica oleracea</i>	<i>acephala</i>	Verheul

C	Nom	Espèce	Sous-espèce	Cultivar
	ECD6	<i>Brassica napus</i>	<i>oleifera</i>	Nevin
	ECD10	<i>Brassica napus</i>	<i>napus</i>	Wilhelmsburger
	Brutor	<i>Brassica napus</i>	<i>oleifera</i>	

plasmodes plurinucléés s'effectue et aboutit au relargage dans le sol de spores de repos lors de la décomposition des tissus racinaires de la plante hôte (Ikegami *et al.*, 1982).

Pathogénicité de *P. brassicae*

La présence de variations génétiques chez *P. brassicae*, en fonction de l'origine de l'isolat utilisé, a été mise en évidence pour la première fois par Honig (1931), grâce à la comparaison du niveau de résistance de trois espèces de crucifères vis-à-vis de populations de *P. brassicae* issues de différentes origines. Des gammes d'hôtes différentiels ont ainsi été développées afin de déterminer le pouvoir pathogène des différents isolats de *P. brassicae*. Les principales gammes d'hôtes utilisées aujourd'hui ont été développées par Williams (1966), Buczacki *et al.* (1975) et Somé *et al.* (1996). Ces gammes d'hôtes se différencient par la nature et le nombre de génotypes qui les composent (Tableau II). Elles permettent théoriquement de distinguer respectivement 48, 16, et 8 pathotypes de *P. brassicae*.

Lors de la création d'une gamme d'hôtes différentiels, la réponse d'un large nombre de Brassicacées vis-à-vis de différents isolats de *P. brassicae* est étudiée dans le but de les différencier le plus finement possible, tout en limitant le nombre de génotypes présents dans la gamme. Cependant, l'utilisation d'isolats spécifiques d'une région géographique a aussi comme conséquence de rendre les gammes d'hôtes peu efficaces pour différencier les isolats d'autres régions géographiques. De ce fait, les classifications des isolats de *P. brassicae* divergent en fonction des gammes d'hôtes différentiels utilisées. Par exemple, le pathotype 1 de la gamme d'hôtes de Williams (1966) ne correspond pas au pathotype 1 de la gamme de Somé *et al.* (1996). Afin d'harmoniser les différentes classifications, le développement d'une gamme d'hôtes unique, permettant la caractérisation de l'ensemble des pathotypes décrits à ce jour, est actuellement en cours dans plusieurs équipes de recherche. La principale difficulté étant de limiter au maximum le nombre de plantes hôtes, afin de pouvoir facilement intégrer la gamme à un test hernie.

Sur la base des gammes d'hôtes différentiels actuelles, plusieurs études de caractérisation des pathotypes ont été entreprises, notamment en France (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2001), en Australie (Donald *et al.*, 2006) et au Canada (Howard *et al.*, 2010 ; Hwang *et al.*, 2012). Ces études ont mis en évidence une grande diversité de populations que ce soit à l'échelle du territoire, du champ et même de la galle. Les deux pathotypes majoritaires en France sont le pathotype 1 et 2 selon la gamme d'hôtes différentiels de Somé *et al.* (1996). Cependant, l'analyse approfondie réalisée sur le territoire breton par Manzanares-Dauleux *et al.* (2001) a permis de détecter les huit pathotypes de la gamme d'hôtes différentiels de Somé *et al.* (1996). Une grande diversité de pathotypes est également décrite à l'échelle européenne dans les principaux pays producteurs de *Brassica* (Allemagne, Pologne, République Tchèque) (Zamani-Noor, 2017 ; Řičářová *et al.*, 2016).

Au Canada, le pathotype 3 (selon la gamme d'hôtes différentiels de Williams (1966) est largement majoritaire et représente 87 % des populations étudiées, mais les pathotypes 2, 5, 6 et 8 ont également été détectés (Howard *et al.*, 2010 ; Hwang *et al.*, 2012). En Australie, trois pathotypes, 3, 6 et 7 selon Williams (1966) ont été décrits (Donald *et al.*, 2006). La distribution des types et des fréquences des populations détectées en Australie montre de fortes similitudes avec les populations américaines. La plus faible diversification des populations de *P. brassicae* présentes en Australie et en Amérique, en comparaison de celles présentes en Europe, peut s'expliquer par l'apparition tardive de la maladie sur ces continents (Diederichsen *et al.*, 2009).

Les moyens de lutte contre la hernie

Différents moyens de lutte contre la hernie ont été utilisés ou envisagés (Dixon, 2009a ; Howard *et al.*, 2010 ; Hwang *et al.*, 2014) et sont spécifiés dans les paragraphes suivants.

Les pratiques culturelles

Les rotations culturales classiques ne sont pas suffisamment efficaces pour stopper le développement de la hernie. En effet, la demi-vie des spores de repos de *P. brassicae* est de 3,6 ans et il faut plus de 17 ans avant de réduire suffisamment la quantité d'inoculum pour empêcher l'initiation d'une nouvelle infection (Wallenhammar, 1996). L'utilisation de cultures intermédiaires, telles que la pomme de terre, l'oignon, l'épinard et la fraise ont un effet très limité sur la réduction de la population de spores de repos dans le sol (Ikegami, 1985). Une autre stratégie est l'utilisation dans l'interculture de plantes non hôtes mais stimulant la germination des spores de repos telles que le poireau, le seigle et le ray-grass. Toutefois dans les sols fortement infestés, cette solution ne permet de réduire significativement les symptômes sur un hôte sensible comme le chou chinois (Murakami *et al.*, 2000 ; Friberg *et al.*, 2006 ; Ahmed *et al.*, 2011).

Les sols acides étant plus favorables au développement de la hernie (Gossen *et al.*, 2014), des méthodes telles que le chaulage sont utilisées notamment en traitement des pépinières. En effet, en conditions contrôlées le développement des symptômes de la hernie est réduit dans un sol dont le pH est maintenu au-dessus de 7,2 (Murakami *et al.*, 2002). Des résultats similaires ont été obtenus au champ, cependant le surcoût entraîné par le chaulage est trop important pour rendre viable cette méthode (Hwang *et al.*, 2011). De plus, les résultats sont fluctuants en fonction des années et des types de sols et très dépendants des conditions de température et d'humidité favorables au développement de l'agent pathogène (Gossen *et al.*, 2013).

La mise en place d'un apport nutritionnel combiné de potassium, de calcium, de magnésium et de bore, aurait pour effet de limiter le développement de la maladie (Dixon et Page, 1997). L'utilisation individuelle de calcium, dans un sol à pH élevé, a pour effet de diminuer la viabilité

des spores de repos (Myers *et al.*, 1985 ; Webster et Dixon, 1991 ; Lee et Hsieh, 1992) et de réduire le nombre d'infections primaires (Webster, 1986). Les effets du calcium sur la hernie seraient dus à un renforcement de la paroi cellulaire de la plante hôte (Palm, 1963), limitant ainsi la pénétration de *P. brassicae* (Webster et Dixon, 1991 ; Donald et Porter, 2009). Walker et Hooker (1945) ont mis en évidence que de faibles concentrations en potassium contribueraient à réduire le développement de la maladie. En effet, il semblerait que le potassium joue un rôle important dans le développement de *P. brassicae* (Donald et Porter, 2009). Suite à l'utilisation d'apport en bore, une limitation du développement de la hernie a été observée au cours de la phase primaire et secondaire d'infection (Webster, 1986 ; Webster et Dixon, 1991). Cet élément aurait un rôle dans la régulation de la teneur en auxine endogène (Bohnsack et Albert, 1977), ainsi que dans le maintien de l'intégrité des parois et membranes cellulaires (Marschner, 1995).

L'option de la lutte chimique a elle aussi été envisagée, cependant la plupart des molécules efficaces sont aujourd'hui interdites en raison de leur toxicité et des problèmes environnementaux qu'elles engendraient (Donald et Porter, 2009). Le pentachloronitrobenzène (PCNB), un fongicide efficace contre la hernie est toujours utilisé en Australie (Donald et Porter, 2009). Le flusulfamide, inhibant la germination des spores de repos (Tanaka *et al.*, 1999), le fluazinam, interrompant la production d'énergie chez les champignons pathogènes, et le cyazofamide, inhibant le transport des électrons dans la membrane mitochondriale (Mitani *et al.*, 2001) et permettant de réduire de 80% la germination des spores de repos (Mitani *et al.*, 2003), sont toujours autorisés au Japon (Donald et Porter, 2009). Cependant, aujourd'hui, on ne dispose d'aucun produit phytosanitaire homologué pour lutter contre la hernie en Europe.

La lutte biologique constitue un moyen de lutte potentiel pour limiter les symptômes de la hernie. En effet, Peng *et al.* (2011) ont mis en évidence l'effet du biofongicide SerenadeTM, contenant des spores de *Bacillus subtilis* QST713 ainsi que de son filtrat de culture, sur la hernie du colza en conditions contrôlées. Ce biofongicide jouerait un rôle dans la stimulation des défenses de la plante (Lahlali *et al.*, 2011 ; 2013). Les effets bénéfiques de champignons endophytes racinaires, tel qu'*Acremonium alternatum* et *Heteroconium chaetospora*, ont également été mis en évidence sur le développement de la maladie chez le chou chinois (Narisawa *et al.*, 1998, 2005 ; Doan *et al.*, 2008), *Arabidopsis* (Jäschke *et al.*, 2010) et le colza (Auer et Ludwig-Müller, 2014). Cependant, ces moyens de lutte restent peu efficaces en comparaison de l'utilisation de résistances génétiques (Dixon, 2009b).

Les résistances génétiques

La totalité des Brassicacées, soit plus de 3 700 espèces, sont potentiellement des plantes hôtes pour *P. brassicae*. Cependant, les analyses génétiques de la résistance à cet agent pathogène

se sont majoritairement focalisées sur *A. thaliana*, *B. rapa*, *B. oleracea* et *B. napus*. Une synthèse très complète des principaux gènes de résistance/QTL détectés a été réalisée par Piao *et al.* (2009).

Résistance à la hernie chez *Arabidopsis thaliana*

La première analyse génétique réalisée chez *A. thaliana* avait permis de mettre en évidence que la résistance de type HR des écotypes Tsu-0 et Ze-0 à l'isolat e, était conférée par le gène majeur *RPBI* (Fuchs *et al.*, 1996), localisé à l'extrémité du chromosome 1. Par la suite, (Jubault *et al.*, 2008b) ont détecté dans deux populations en ségrégation issues du croisement Bur-0 x Col-0 (Bur-0 partiellement résistant et Col-0 sensible), 4 QTL de résistance à effet additif, *Pb-At1*, *Pb-At4*, *Pb-At5.1* et *Pb-At5.2*, ainsi que quatre QTL à effet épistatique. Parmi ces QTL, *Pb-At5.2* est celui ayant l'effet le plus important sur la résistance, expliquant entre 12,9% et 22,9% de la variance observée en fonction de la population étudiée.

Résistance à la hernie chez *Brassica rapa*

Le chou chinois est une culture particulièrement importante en Asie de l'Est. Cependant, les cultivars asiatiques de chou chinois sont également particulièrement sensibles à la hernie. De ce fait, l'un des objectifs majeurs des années 1990 a été d'identifier, puis d'introgresser des sources de résistance dans ces cultivars (Diederichsen *et al.*, 2009). La majorité des sources de résistance identifiées chez *B. rapa* proviennent de navettes européennes (Crute *et al.*, 1980 ; Yoshikawa, 1993).

Chez *B. rapa*, de nombreux facteurs de résistance à la hernie ont été identifiés sur le chromosome A03, *CRA*, *CRb*, *Crr3* et *CRk* (Matsumoto *et al.*, 1998 ; Piao *et al.*, 2002, 2004 ; Hirai *et al.*, 2004 ; Saito *et al.*, 2006 ; Hayashida *et al.*, 2008 ; Sakamoto *et al.*, 2008 ; Kato *et al.*, 2012, 2013 ; Ueno *et al.*, 2012). *CRA* et *CRb* sont deux gènes de résistance majeurs à la hernie. Il n'est pas exclu que *CRA* et *CRb* soient des copies du même gène, de même pour *Crr3* et *CRk* (Diederichsen *et al.*, 2009). Par la suite, un autre locus nommé *CRAki*, issu de la variété Akiriso et lié au locus *CRb*, a été identifié sur la base de la résistance qu'il confère à l'isolat N014 de *P. brassicae* (Kato *et al.*, 2012, 2013). *Crr1* et *Crr2*, deux facteurs de résistance identifiés chez la variété Siloga vis-à-vis respectivement des isolats Ano-01 et Wakayama-01 de *P. brassicae*, sont respectivement présents sur le chromosome A08 et A01 (Suwabe *et al.*, 2003, 2006). Cependant, si *Crr1* est impliqué dans la résistance aux deux isolats, il doit être en combinaison avec *Crr2* pour être efficace vis-à-vis de Wakayama-01. Le clonage du QTL *Crr1*, réalisé par Hatakeyama *et al.* (2013), a montré qu'il contenait deux gènes, *Crr1a* et *Crr1b*. *Crr1a*, de même que *CRA*, cloné par Ueno *et al.* (2012), codent des TIR-NB-LRR. L'analyse récente réalisée par Yu *et al.* (2017), a permis de détecter 3 nouveaux facteurs de résistance à la hernie, *Rcr4*, *Rcr8* et *Rcr9*. Parmi ces 3 facteurs de résistance, *Rcr4* confère une résistance aux pathotypes 2, 3, 5, 6 et 8 canadiens

(Williams, 1966), alors que les deux autres facteurs génétiques confèrent une résistance au nouveau pathotype 5x, qui a actuellement contourné les résistances des variétés de colza utilisées au Canada (Strelkov *et al.*, 2016).

Résistance à la hernie chez *Brassica oleracea*

Il existe peu de variétés de *B. oleracea* résistantes à la hernie. De plus, les facteurs de résistance à la hernie présents chez cette espèce étant souvent complexes et associés à d'autres caractères indésirables, ils ont été assez peu utilisés (Diederichsen *et al.*, 2009). Badger Shipper est l'un des premiers cultivars résistants à avoir été utilisé au Etats-Unis (Crute *et al.*, 1980). Au Canada, la variété Wilhelmsburger, résistante à de nombreux pathotypes d'Amérique du Nord, a été utilisée pour créer deux autres cultivars, Acadie et Richelain (Chiang et Crête, 1985 ; Chiang et Crête, 1989).

Plusieurs analyses génétiques réalisées sur différentes populations de *B. oleracea* ont mis en évidence des résistances quantitatives sous contrôle polygénique (Landry *et al.*, 1992 ; Figdore *et al.*, 1993 ; Grandclément et Thomas, 1996 ; Voorrips *et al.*, 1997 ; Moriguchi *et al.*, 1999 ; Rocherieux *et al.*, 2004 ; Nomura *et al.*, 2005) mais également de résistance de type qualitative sous contrôle mono ou oligogénique (Chiang et Crête, 1983 ; Yoshikawa, 1993).

Rocherieux *et al.* (2004) ont détecté 12 QTL de résistance à la hernie, sur la base d'une population issue du croisement entre un chou fourrager C10 et un brocoli haploïde doublé HDEM, vis-à-vis de 5 isolats de *P. brassicae*. Parmi ces 12 QTL, plusieurs confèrent une résistance à plusieurs isolats, mais un seul confère une résistance vis-à-vis des 5 isolats, le QTL *Pb-Bo1*, positionné sur le groupe de liaison LG01. Selon les isolats, ce QTL peut se comporter comme un gène majeur (expliquant jusqu'à 81 % de la variabilité observée) ou comme un QTL à effet plus faible (expliquant 21 % de la variabilité observée pour l'isolat eH). Plus récemment, une autre analyse génétique a permis de détecter 4 QTL de résistance issus du cultivar Anju et un QTL de résistance issu du cultivar Green Comet, vis-à-vis d'un isolat du pathotype 4 (Nagaoka *et al.*, 2010). Au jour d'aujourd'hui la comparaison des QTL détectés lors de ces études est impossible du fait de l'absence de marqueurs génétiques communs entre les différentes cartes génétiques utilisées.

Résistance à la hernie chez *Brassica napus*

B. napus étant un allotétraploïde récent, il a faiblement divergé de ces deux espèces progénitrices *B. rapa* et *B. oleracea*. De ce fait, les deux espèces parentales sont des sources intéressantes pour l'introgession de résistances génétiques, notamment à la hernie. La variété "Mendel", anciennement commercialisée pour sa résistance à certains isolats de *P. brassicae*, a notamment été obtenue à partir d'un colza synthétique issu du croisement entre *B. rapa* ECD04 et *B. oleracea* ECD15 (Diederichsen et Sacristan, 1996).

D'autre part, de nombreuses études génétiques de la résistance à *P. brassicae* ont été effectuées chez *B. napus*. Manzanares-Dauleux *et al.* (2000) ont montré qu'un même génotype pouvait montrer des niveaux de résistance variables en fonction de l'isolat testé. C'est en effet le cas du génotype Darmor-*bzh*, qui est résistant vis-à-vis des isolats eH et Pb137-522, partiellement résistant vis-à-vis de K92-16 et sensible vis-à-vis de Ms6. Le QTL *Pb-Bn1* participe à la résistance de Darmor-*bzh* aux isolats Pb137-522 et K92-16 (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000). De plus, lors de cette étude, deux autres QTL à effet mineur ont été détectés. L'analyse des populations d'haploïdes doublés issus du croisement Darmor-*bzh* x Yudal et Stellar x Drakkar a permis la détection de 8 régions génomiques impliquées dans la résistance à la hernie (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2003). Parmi ces 8 QTL, 3 ont un effet majeur (*Pb-Bn1*, *Pb-Bn2* et *Pb-Bn3*) face aux isolats Pb137-522, eH et Ms6, et un effet résiduel vis-à-vis des autres isolats testés. L'analyse réalisée par Werner *et al.* (2008) vis-à-vis de 7 isolats de *P. brassicae*, a permis de détecter un grand nombre de QTL. Parmi ces QTL certains sont communs à plusieurs isolats, mais aucun n'est commun à tous. Une analyse de génétique d'association réalisée par (Li *et al.*, 2016) sur 472 accession de *B.napus*, provenant de 23 pays différents, a permis de mettre en évidence 10 QTL de résistance vis-à-vis d'un isolats chinois de *P. brassicae* appartenant au pathotype 4 selon la gamme d'hôte différentiels de (Williams, 1966).

III-3 Analyse moléculaire de l'interaction *P. brassicae* - *Brassicaceae*

Le métabolisme (sucres, acides aminés et lipides) de la plante hôte est largement impacté lors de l'infection par *P. brassicae*, particulièrement lors de la phase secondaire d'infection (Ludwig-Müller *et al.*, 2009). Lors de l'infection primaire chez l'écotype sensible d'*A. thaliana* Col-0, on observe d'importantes différences quantitatives entre les plantes infectées et non infectées pour environ 12% des protéines étudiées (Devos *et al.*, 2006). Ces protéines sont notamment impliquées dans la défense, la détoxification des ROS, la différenciation cellulaire et la formation du cytosquelette. Des changements protéiques similaires ont été observés chez *B. napus*, avec des protéines impliquées dans la défense, la détoxification des ROS, l'homéostasie du calcium intracellulaire et la glycolyse (Cao *et al.*, 2008). Le transcriptome de la plante hôte est également affecté par la hernie. Chez l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*, l'infection par *P. brassicae* entraîne une expression différentielle au niveau racinaire de plus de 1 000 gènes à 10 jours après infection et de plus de 2 000 gènes à 23 jours après infection (Siemens *et al.*, 2006). Au premier point cinétique, les gènes différentiellement exprimés sont notamment reliés à la croissance, au cycle cellulaire, au métabolisme des sucres et à la défense, alors qu'au deuxième point cinétique, ils sont reliés au transport et à la synthèse de sucres, des lipides, des composés azotés, de l'amidon, ainsi qu'aux réponses de défense de la plante.

Modulation du métabolisme primaire

Les sucres

Chez *A. thaliana*, lorsque la plante est infectée par *P. brassicae*, la quantité de saccharose ainsi que d'amidon est fortement réduite dans les feuilles (Evans *et al.*, 1995). Ce résultat suppose que le saccharose est soit rapidement métabolisé dans les feuilles, soit exporté vers les racines infectées de la plante. La seconde hypothèse est cohérente avec le fait que chez *B. rapa*, la quantité d'assimilats, marqués au ^{14}C , exportée des feuilles vers les racines soit plus importante chez les plantes inoculées particulièrement en fin de cycle d'infection (Mitchell et Rice, 1979). De plus, de nombreuses études ont mis en évidence une accumulation de glucose, de fructose, de saccharose et d'amidon au niveau des galles d'*A. thaliana* (Mithen et Magrath, 1992 ; Evans *et al.*, 1995 ; Brodmann *et al.*, 2002) et de *B. rapa* (Keen et Williams, 1969) lors de l'infection. Ces résultats démontrent donc que les racines constituent un puits métabolique chez les plantes inoculées par *P. brassicae* et que la force du puits augmente au cours de l'infection. Des analyses transcriptomiques chez *A. thaliana* ont mis en évidence une surexpression des gènes codant la saccharose synthase et l'amidon synthase, 23 jours après l'infection (Siemens *et al.*, 2006). On note également une orientation du métabolisme énergétique vers la synthèse de glucose dans les galles, de par la répression de la fructose bisphosphate aldolase chez *A. thaliana*, lors de l'infection primaire (Devos *et al.*, 2006). De plus, Siemens *et al.* (2011) ont mis en évidence que l'inhibition des invertases pariétales (impliquées dans l'hydrolyse du saccharose en glucose et fructose), entraîne une réduction du développement des galles. Ce résultat confirme l'importance du flux de métabolites carbonés, provenant des parties aériennes, dans le développement des galles et suppose que *P. brassicae* utilise directement les monomères d'hexose pour son développement.

Parmi les sucres, le cas du tréhalose, un disaccharide non réducteur, est particulièrement atypique. En effet, des études ont montré sa forte accumulation dans les racines infectées par *P. brassicae* lors du développement des galles (Keen et Williams, 1969 ; Brodmann *et al.*, 2002 ; Gravot *et al.*, 2011). Cette accumulation de tréhalose, positivement corrélée avec la quantité de symptômes (Wagner *et al.*, 2012), est d'autant plus remarquable qu'en condition normale de culture ce sucre est présent en très faible teneur chez les plantules d'*A. thaliana* (Blazquez *et al.*, 1998 ; Müller *et al.*, 2001 ; Vogel *et al.*, 2001). Cependant, le tréhalose est connu pour servir de stockage carboné chez les bactéries photosynthétiques (Lippert *et al.*, 1993), les levures et les organismes fongiques (Thevelein, 1984). Cette accumulation de tréhalose a été reliée à l'expression du gène *PbTPS1* (tréhalose 6-phosphate synthase) de *P. brassicae* (Brodmann *et al.*, 2002). Une réaction de la plante, afin de limiter les effets néfastes de l'accumulation du tréhalose, a également été mise en évidence, avec une induction de l'activité de la tréhalase dans les racines infectées (Brodmann *et al.*, 2002).

Le métabolisme azoté

Tout comme pour certains sucres, on observe une accumulation de certains acides aminés lors de l'infection par *P. brassicae* dans les racines des plantes hôtes (Williams *et al.*, 1968 ; Jubault *et al.*, 2008a ; Wagner *et al.*, 2012). Les travaux de Wagner *et al.* (2012) ont montré une corrélation positive entre l'accumulation de 17 acides aminés et la quantité de symptômes. Parmi ces 17 acides aminés, la corrélation est particulièrement importante pour la glutamine et l'asparagine, deux acides aminés riches en azote. Ces résultats laissent supposer que ces deux acides aminés sont impliqués dans le transport de l'azote depuis les feuilles vers les racines infectées comme cela a été observé avec *Orobanche foetida* ou *Xanthomonas campestris* (Zurbriggen *et al.*, 2009 ; Abbes *et al.*, 2009). L'accumulation de glutathion, également corrélée positivement avec la quantité de symptômes, résulterait d'un mécanisme de défense mis en place par la plante. En effet, il est connu pour son rôle de défense vis-à-vis des stress biotiques (Vanacker *et al.*, 1999), de par son rôle dans la détoxification des ROS.

Le métabolisme des polyamines et de l'arginine est également activé lors de la phase tardive de l'infection par *P. brassicae* (Jubault *et al.*, 2008a). Chez l'écotype Col-0 d'*A. thaliana*, l'arginase (ARGAH2), catabolisant l'arginine en L-ornithine, est environ 12 à 15 fois plus induite à 14 et 21 jours après inoculation. Cependant, cette surexpression n'a pas pour conséquence d'entraîner une accumulation de la L-ornithine, mais de la proline, un acide aminé au rôle osmoprotectant notamment accumulé lors de stress hydrique, salin et osmotique. Gravot *et al.* (2012) ont mis en évidence une augmentation des symptômes de la hernie chez le mutant *argah2* d'*A. thaliana*, présentant une activité arginase réduite. De ce fait, il a été proposé que l'arginase puisse jouer un rôle de défense afin de limiter le développement des symptômes. La voie des polyamines est également induite chez d'autres Brassicacées lors de l'infection par *P. brassicae*. Une induction de la spermidine synthase est observée chez *B. napus* 72h après l'inoculation (Cao *et al.*, 2008) et une accumulation de putrescine, spermidine et spermine plus importante dans les galles que dans les racines non infectées de *B. rapa* (Walters et Shuttleton, 1985).

Modulation des hormones

Le SA

Le salicylate a été largement décrit pour son implication dans la défense des plantes aux stress biotiques (Shah, 2003 ; Vlot *et al.*, 2009). Dans le cas de la hernie, on observe une réduction de 25 à 65% du développement des galles chez le brocoli lors de l'application d'un traitement SA (5 mM) (Lovelock *et al.*, 2013). Chez l'écotype partiellement résistant à la hernie Bur-0, un pic d'accumulation de SA est observé dans les racines infectées 14 jours après infection (Lemarié *et al.*, 2015). Cette accumulation de SA entraîne une surexpression des gènes impliqués dans la

réponse SA de type SAR (Systemic Acquired Resistance), tels que *PR2* et *PR5*. L'accumulation de SA observée dans les racines de Bur-0 est cohérente avec la surexpression de gènes impliqués dans la biosynthèse du SA, tel que *ICS1*, dès 7 jours après inoculation (Jubault *et al.*, 2013). De plus, le traitement de Col-0 (réponse JA dépendante) et Bur-0 (réponse SA dépendante), avec 1 ml de SA à 500 μ M, a mis en évidence une réduction des symptômes chez ces deux écotypes (Lemarié *et al.*, 2015).

Afin de contourner la résistance SA dépendante mise en place par certains génotypes, *P. brassicae* est capable de méthyler le SA produit par la plante. Cette méthylation a notamment été observée avec l'isolat e3 de *P. brassicae* lors de la phase secondaire d'infection (Ludwig-Müller *et al.*, 2015). La méthylation du SA pourrait jouer un rôle dans l'inhibition des réponses SA dépendantes mises en place par la plante hôte.

Le JA

De nombreux gènes, en lien avec la réponse JA, sont induits lors de l'infection primaire et secondaire de *P. brassicae* chez l'écotype Col-0 d'*A. thaliana* (Siemens *et al.*, 2006 ; Agarwal *et al.*, 2011 ; Gravot *et al.*, 2012 ; Jubault *et al.*, 2013). Par exemple, le gène *LOX4*, codant une lipoxigénase impliquée dans la biosynthèse du JA, est environ 4 fois plus exprimé dans les racines inoculées 4 jours après inoculation. Lors de la phase secondaire, 23 jours après inoculation, ce sont les gènes de biosynthèse, tels que *LOX2*, ainsi que les gènes impliqués dans la réponse au JA, tels que *THI2.1*, *ARGAH2* et *NATA1* qui sont particulièrement surexprimés dans les racines. Ces données transcriptomiques sont cohérentes avec l'accumulation de JA observé dans les racines de Col-0 lors de l'infection secondaire (Gravot *et al.*, 2012 ; Lemarié *et al.*, 2015). Une induction de la voie du JA a également été mise en évidence dans les racines de *B. rapa* lors de l'infection secondaire (Grsic *et al.*, 1999).

Le traitement de Col-0 avec 1 ml de MeJA (50 μ M) a mis en évidence une réduction de la quantité de symptômes (Lemarié *et al.*, 2015). Ce résultat indique que la réponse JA a un effet positif sur la résistance à la hernie, même si cette réponse semble être moins efficace que la réponse SA. D'autres études ont mis en évidence un impact positif du JA sur la résistance à la hernie. En effet, le mutant *jar1* d'*A. thaliana*, incapable d'accumuler le JA-Ile, présente un développement des galls supérieur à celui du génotype sauvage (Agarwal *et al.*, 2011 ; Gravot *et al.*, 2012). De même, chez *B. oleracea* var. *italica*, l'application d'un traitement JA a pour conséquence de réduire de 25 % la quantité de symptômes (Lovelock *et al.*, 2013).

L'auxine

L'auxine est connue pour jouer un rôle majeur dans le développement de la plante, et notamment de ses racines (Saini *et al.*, 2013). Du fait de la relation entre la hernie et le

développement anormal des racines, de nombreuses hypothèses visant à expliquer le rôle de l'auxine dans cette maladie ont été émises. Cependant, les résultats des études réalisées sur l'auxine lors de l'infection par *P. brassicae* sont souvent contradictoires. Certaines études montrent une augmentation des teneurs en auxine chez les Brassicacées infectées à 10 et 12 jours après inoculation (Ludwig-Müller *et al.*, 1993), à 36 jours après inoculation (Butcher *et al.*, 1974), ou encore à 20, 25, 30, 40 et 60 jours après inoculation (Raa, 1971). De même, il a été mis en évidence une augmentation des teneurs en auxine conjuguée, à 6 jours après inoculation (Devos *et al.*, 2006) et à 24 et 30 jours après inoculation (Ludwig-Müller *et al.*, 1996). Cependant, d'autres études indiquent une réduction de la teneur en auxine dans les plantes infectées (Butcher *et al.*, 1974 ; Kavanagh et Williams, 1981 ; Mousdale, 1981 ; Ludwig-Müller *et al.*, 1993 ; Devos *et al.*, 2006). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ces différences, comme la difficulté de quantifier précisément l'auxine dans les tissus infectés (Ludwig-Müller *et al.*, 2009), les différents temps cinétiques étudiés ou les différents couples plantes hôtes/isolats utilisés.

Les cytokinines

La première étude réalisée sur les cytokinines dans les tissus infectés par la hernie, a mis en évidence une augmentation de leur teneur dans les galls de la plante hôte (Dekhuijzen et Overeem, 1971). Dekhuijzen (1981) a retrouvé des cytokines dans les plasmodes de *P. brassicae* ainsi que dans le cytoplasme des cellules infectées de la plante hôte laissant suggérer que les plasmodes de *P. brassicae* synthétiseraient des cytokinines, qui seraient ensuite libérées dans le cytoplasme des cellules de la plante hôte afin d'induire la division cellulaire. Cette synthèse de cytokinines par *P. brassicae* a été validée par Müller et Hilgenberg (1986).

De plus chez *A. thaliana*, les gènes de biosynthèse des cytokinines, ainsi que ceux impliqués dans leur catabolisme, sont réprimés durant la phase secondaire de l'infection (Siemens *et al.*, 2006). Cependant, les gènes de réponse aux cytokinines, tels que *ARR5* et *ARR10* sont surexprimés en début de phase secondaire d'infection. De plus, le mutant d'*A. thaliana* surexprimant les gènes impliqués dans le catabolisme des cytokinines (*CKX1* et *CKX3*, deux cytokinines oxidases) montre une sensibilité réduite vis-à-vis de la hernie (Siemens *et al.*, 2006). L'accumulation de cytokinines, ainsi que la surexpression de gènes rapporteurs de réponse aux cytokinines, ayant lieu avant l'apparition des symptômes, cela corrobore leur importance et implication dans l'hyperplasie cellulaire (Devos *et al.*, 2006).

Cependant, l'impact des cytokinines synthétisées par l'agent pathogène sur le développement des cellules de la plante hôtes est quelque peu nuancé par une étude récente (Malinowski *et al.*, 2016). En effet, cette étude suggère que l'impact des cytokines produites par

l'agent pathogène est minime sur le contenu total en cytokinines des tissus infectés, ainsi que sur l'expression des gènes de la plante.

Modulation du métabolisme secondaire

Les glucosinolates

Les glucosinolates sont un groupe de métabolites secondaires particulièrement représenté au sein des espèces de la famille des *Brassicaceae*. Généralement, les glucosinolates sont considérés comme des composés de défense vis-à-vis des agents pathogènes généralistes, et comme des composés attractifs vis-à-vis des agents pathogènes spécialistes, particulièrement pour les insectes (Halkier et Gershenzon, 2006). Les glucosinolates sont des hétérosides soufrés classiquement regroupés en sous-catégories en fonction des acides aminés dont ils dérivent. Les sous-catégories les mieux décrites à ce jour correspondent aux glucosinolates aliphatiques (dérivés de la méthionine), les aromatiques (dérivés de la tyrosine et de la phénylalanine) et les indoliques (dérivés du tryptophane) (Halkier et Gershenzon, 2006 ; Grubb et Abel, 2006). A noter que les glucosinolates indoliques peuvent servir de précurseurs à l'auxine.

Les glucosinolates ont été longtemps associés au développement de la hernie, cependant leurs rôles lors de l'infection par *P. brassicae* ne sont pas clairement établis (Ludwig-Müller *et al.*, 2009). Une étude réalisée sur le chou chinois a mis en évidence une teneur globale en glucosinolates moins élevée chez les cultivars résistants que chez les sensibles (Ludwig-Müller *et al.*, 1996). Quelques travaux ont suggéré que l'induction de l'activité nitrilase pendant l'infection pourrait contribuer à la synthèse d'auxine à partir des glucosinolates indoliques (Grsic-Rausch *et al.*, 2000, Ando *et al.*, 2008). Mais une analyse détaillée montre que les glucosinolates aliphatiques sont particulièrement accumulés chez les variétés sensibles, alors que les glucosinolates aromatiques sont accumulés chez les cultivars résistants. Dans le cas d'*A. thaliana*, on observe une accumulation de glucosinolates indoliques et aliphatiques dans les tissus racinaires infectés par *P. brassicae* (Ludwig-Müller *et al.*, 1999). Les études réalisées sur le rôle des glucosinolates indoliques mettent en évidence des résultats contradictoires. En effet, parfois la teneur en glucosinolates indoliques est corrélée négativement avec la résistance (Chong *et al.*, 1985 ; Butcher *et al.*, 1974 ; Buczacki et Ockendon, 1979), parfois positivement (Lee *et al.*, 2010) et d'autres fois non corrélée (Mullin *et al.*, 1980). Les mutants *A. thaliana*, *tu3* et *tu8*, sélectionnés pour l'altération de leur pattern de glucosinolates dans les feuilles (Haughn *et al.*, 1991), présentent une diminution de la quantité de symptômes (Ludwig-Müller *et al.*, 1999). Cependant, la mise en évidence d'une teneur en glucosinolates indoliques différente dans les galls du mutant *tu8*, par rapport au génotype sauvage, alors que ce n'est pas le cas chez *tu3*, rend l'interprétation complexe. De plus, l'étude du double

mutant *cyp79b2/b3*, incapable d'accumuler des glucosinolates indoliques (Zhao *et al.*, 2002), n'a pas permis de mettre en évidence d'effet sur la résistance à la hernie (Siemens *et al.*, 2008).

Les flavonoïdes

Les flavonoïdes sont un groupe de métabolites secondaires avec de nombreuses fonctions biologiques, incluant un rôle dans la réponse à des stress abiotiques, tel que les UV (Winkel-Shirley, 2002). Dans les galles d'*A. thaliana*, une induction de gènes liés à la biosynthèse de certains flavonoïdes a été observée (Siemens *et al.*, 2006). De même, on observe également une accumulation de certains flavonoïdes, tels que la naringénine, la quercétine et le kaempferol, ainsi que de leurs conjugués glycosylés dans les tissus infectés par *P. brassicae* (Paesold *et al.*, 2010). Pour autant, aucun lien n'a été mis en évidence entre les flavonoïdes et la résistance à la hernie. En effet, aucune modification de la résistance à la hernie n'est observée chez les mutants de la voie des flavonoïdes, transparent testa *tt3*, *tt4*, *tt5* et *tt7* (Siemens *et al.*, 2002 ; Alix *et al.*, 2007). En outre, la possibilité que les flavonoïdes puissent influencer la teneur en auxine, de par leur action sur les transports d'azotes a été examinée, cependant les résultats obtenus semblent encore contradictoires (Paesold *et al.*, 2010).

CHAPITRE II

ANALYSE GENETIQUE DE L'IMPACT DE LA FERTILISATION AZOTEE SUR LA RESISTANCE DU COLZA A LA HERNIE

CHAPITRE II : ANALYSE GENETIQUE DE L'IMPACT DE LA FERTILISATION AZOTEE SUR LA RESISTANCE DU COLZA A LA HERNIE

PRÉAMBULE

L'impact de la fertilisation azotée sur le développement des symptômes lors de l'infection des Brassicacées par *P. brassicae* a été étudié dans quelques travaux antérieurs en se basant sur un nombre restreint de génotypes (Pryor *et al.*, 1940 ; Dixon, 2009 ; Gossen *et al.*, 2014). Les résultats de ces études montrent des différences du développement des symptômes en fonction du niveau de fertilisation azotée : en général l'augmentation de l'apport azoté entraîne une augmentation des symptômes observés mais, en fonction des études, les résultats peuvent aller dans le sens contraire. Des résultats obtenus au laboratoire ont montré que la diminution de la fertilisation azotée ne s'accompagnait toujours pas d'une diminution des symptômes (mesurés par le nombre et la localisation des galles sur le système racinaire) et que l'issue de l'interaction azote x inoculation était génotype dépendante. L'équipe a ainsi mis en évidence que chez certains génotypes infectés par l'isolat eH, le niveau de symptômes est significativement diminué lorsque l'on diminue la fertilisation azotée alors que chez d'autres génotypes le niveau d'apport azoté ne modifie pas la quantité de symptômes observés.

Par ailleurs, la réponse de la plante hôte à l'infection par la hernie est évaluée couramment par la mesure de la quantité de symptômes (nombre, taille et localisation des galles sur le système racinaire principal et secondaire) traduite par le calcul d'un Indice pathologique (IP). La production de spores de repos par galle/plante est une autre composante essentielle à prendre en compte lors de la décomposition de la réponse de résistance à *P. brassicae*. En effet, sachant qu'une galle peut contenir des millions de spores de repos (Wallenhammar, 1996) et que celles-ci peuvent rester viables jusqu'à 20 ans dans le sol, la réduction de leur production dans les cultivars est un enjeu majeur afin de limiter l'expansion de la maladie ainsi que le contournement des résistances (par diminution de la pression d'inoculum exercée sur les plantes résistantes). Or des résultats obtenus par plusieurs auteurs montrent que les caractères développement de galles sur une plante et nombre de spores de repos produits chez la même plante ne sont pas reliés. Ainsi Siemens *et al.* (2002) ont mis en évidence que chez l'écotype Tsu-0 d'*A. thaliana*, décrit comme étant résistant à la hernie sur la base des symptômes visuels observés (très peu de galles, indice pathologique inférieur à 20), la quantité de spores de repos produite était très élevée (supérieur à 1.10^6 spores de repos par gramme de galle). Un résultat similaire a été obtenu chez un cultivar résistant de colza (Hwang *et al.*, 2013). Cependant, jusqu'à maintenant, ce caractère n'a été que très peu étudié lors de

l'évaluation variétale ou des analyses génétiques de la résistance. Cela peut s'expliquer par la méthode utilisée pour la quantification des spores de repos, la quantification par cellule de Malassez, très lourde et chronophage ne permettant pas l'analyse d'un nombre important de plantes. Afin de contourner ce problème, une nouvelle méthode de quantification des spores de repos produites par *P. brassicae* dans les racines de la plante hôte lors de l'infection a été développée au laboratoire d'accueil (Gravot *et al.*, 2016). Cette méthode est basée sur la quantification de particules par cytométrie en flux et pourrait permettre l'analyse d'un grand nombre d'échantillons. Cette méthode est donc un outil essentiel afin de permettre l'identification de facteurs génétiques contrôlant la capacité de *P. brassicae* à produire un inoculum pour réaliser le cycle d'infection suivant. Il est essentiel de prendre en compte aussi ce trait d'histoire de vie de l'agent pathogène, très peu étudié jusqu'à présent, afin de limiter la vitesse de contournement des résistances génétiques.

Sur la base de ces résultats, nous avons réalisé une analyse génétique de la résistance à la hernie chez le colza afin de caractériser l'impact du niveau de fertilisation azotée sur la détection et l'effet des facteurs génétiques de la plante hôte contrôlant les processus de développement des symptômes et de production de spores de repos lors de l'infection par *P. brassicae*.

Pour ce faire, nous avons tout d'abord réalisé trois analyses génétiques basées sur le développement des symptômes sous deux conditions de fertilisation azotée (8 mM de nitrate, correspondant à la condition standard des tests hernie et 1 mM correspondant à la condition limitante en azote). Les deux premières analyses de liaison ont été effectuées en utilisant une population de 108 haploïdes doublés, issue du croisement entre les génotypes Darmor-*bzh* et 'Yudal', inoculée avec les isolats eH et K92-16 de *P. brassicae*, appartenant respectivement au pathotype 1 et 4 selon la gamme d'hôtes différentiels de Somé *et al.* (1996). Dans le même temps, une analyse de génétique d'association sur un panel de diversité de 92 génotypes de colza d'hiver inoculé avec eH a également été effectuée.

Ces travaux sont présentés sous forme d'un article scientifique publié dans la revue *Theoretical and Applied Genetics*, dont je suis premier co-auteur : Laperche A, Aigu Y, *et al.*, (2017) Clubroot resistance QTL are modulated by nitrogen input in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 130:669–684.

Par la suite, grâce au développement de la nouvelle méthode de quantification des spores de repos produites dans les racines de la plante hôte par *P. brassicae*, nous nous sommes focalisés sur la détection des facteurs génétiques du colza impliqués dans la production de spores de repos par l'agent pathogène et à l'impact de la fertilisation azotée sur l'effet de ces facteurs. Nous avons adapté la méthode de quantification des spores de repos par cytométrie de flux à l'analyse d'un

grand nombre d'échantillons et réalisé une analyse de liaison sur la population d'haploïdes doublés issue du croisement entre Darmor-*bzh* et 'Yudal' inoculée par l'isolat eH sous deux conditions de fertilisation azotée (les mêmes que dans l'analyse précédente).

Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'une publication scientifique que sera soumise prochainement à la revue *Plant Pathology* dont je suis premier auteur : Aigu Y, Laperche A, Mendes J, Lariagon C, Guichard S, Manzanares-Dauleux MJ, Gravot A. Nitrogen supply exerts a "seesaw effect" on the relative contribution of two major resistance QTL controlling resting spore content in *Brassica napus* roots infected by *Plasmodiophora brassicae*.

Afin d'examiner la généralité des résultats obtenus, nous avons exploré l'impact de la fertilisation azotée sur la résistance d'un plus grand nombre de génotypes de colza à différents isolats de *P. brassicae* provenant d'une autre origine géographique, le Canada. Nous avons ainsi criblé la résistance de neuf génotypes de colza, vis-à-vis de 5 isolats canadiens appartenant chacun à un pathotype différent (selon la gamme d'hôtes différentiels de Williams *et al.* (1966). J'ai réalisé ces travaux dans l'équipe du Pr. Stephen Strelkov, au Department of Agricultural, Food and Nutritional Science de l'University of Alberta dans l'Edmonton, Canada, lors d'un séjour de trois mois (de Novembre 2016 à Février 2017) grâce à une bourse de Rennes Métropole.

Ces travaux sont présentés sous forme d'article scientifique (en construction) prévu pour soumission à la revue *Canadian Journal of Plant Pathologie* : Y. Aigu, T. Cao, IS. Strelkov, VP. Maloni, MJ. Manzanares-Dauleux, SE. Strelkov, A. Gravot. Identification of winter and spring *Brassica napus* genotypes with partial resistance to Canadian isolates of *Plasmodiophora brassicae*.

ARTICLE I: CLUBROOT RESISTANCE QTL ARE MODULATED BY NITROGEN INPUT IN BRASSICA NAPUS

A. Laperche¹, Y. Aigu¹, M. Jubault¹, M. Ollier¹, S. Guichard¹, P. Glory¹, SE. Strelkov², A. Gravot¹, MJ. Manzanares-Dauleux^{1*}

¹ IGEPP, AGROCAMPUS OUEST, INRA, Université de Rennes 1, Le Rheu, France

² Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta, Edmonton, Canada

* Corresponding author

A. Laperche and Y. Aigu have contributed equally to the work.

Author contribution statement

AL and YA carried out the genetic analyses and AL, YA, AG, MMD and SES wrote and assisted with manuscript editing. SG and PG were in charge of the experiments and of the collect of the data. MO participated in the experiments and assisted with statistical analyses. AL, AG, MJ and MMD conceived and coordinated the study.

I Introduction

Oilseed rape (*Brassica napus*) is the most important oil crop in the European Union and the third most important worldwide (FAOSTAT, 2016). Production has increased in recent years as a consequence of the growing demand for oil. This has created a number of challenges, including an increasing incidence of Brassica diseases, and economic and environmental issues associated with the high-nitrogen requirement of oilseed rape crops. Resistance to plant pathogens and adaptation to low-input agricultural practices (especially low nitrogen input) are thus two major traits targeted in oilseed rape breeding efforts (Bouchet *et al.*, 2014). Clubroot, one of the most damaging diseases of oilseed rape worldwide, is caused by the soil-borne protist *Plasmodiophora brassicae*. Infection of root tissues by this parasite causes abnormal cell proliferation and enlargement, leading to the formation of conspicuous galls (Kageyama and Asano 2009). These galls can impede nutrient and water uptake, stunting the growth of affected plants and reducing crop yield and quality (Dixon 2009a). Since chemical treatments to control *P. brassicae* are not generally effective or are too expensive, and since cultural management strategies do not provide sufficient control of the disease, the utilization of effective and durable genetic resistance in the host is considered an essential strategy for the management of clubroot in oilseed rape. Up to now, genetic and breeding efforts for the development of clubroot resistance have been carried out under high-nitrogen conditions. At present, however, extensive efforts are being directed towards breeding oilseed rape varieties adapted to low-nitrogen conditions. Therefore, there is a need to assess the impact of nitrogen supply on the level of host resistance to *P. brassicae*.

The positive or negative modulation of plant disease development resulting from variations in nitrogen supply has been reported for many pathosystems (Dordas 2008; Fagard *et al.*, 2014; Walters and Bingham 2007). In the case of clubroot disease, a few studies have suggested that a high-nitrogen supply tends to reduce the damage caused by *P. brassicae* infection (Dixon 2009b; Gossen *et al.*, 2014), while another drew the opposite conclusion (Pryor 1940). None of these reports, however, took into account the possible influence of plant genotype (mainly the presence of genetic resistance factors) on the observed interactions between disease development and nitrogen supply. Interestingly, recent research on resistance to rice blast (*Magnaporthe grisea*) has shown that high-nitrogen input can overcome the effect of a resistance gene (Ballini *et al.*, 2013), while the effect of QTL controlling partial resistance to this disease was stable regardless of N conditions (Talukder *et al.*, 2005). Thus, genetic approaches to study the crosstalk between nitrogen supply and disease resistance can allow an evaluation of the efficacy of genetic resistance factors in plants cultivated under low N supply.

Genetic sources of both qualitative and quantitative resistance to *P. brassicae* have been identified in *B. rapa* (Saito *et al.*, 2006; Sakamoto *et al.*, 2008; Suwabe *et al.*, 2003), *B. oleracea* (Lee *et al.*, 2016; Nagaoka *et al.*, 2010; Rocherieux *et al.*, 2004), and *B. napus* (Hasan and Rahman 2016; Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000, 2003; Werner *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015). Nonetheless, only a few commercial varieties with clubroot resistance are available currently, and most of these ('Mendel', 'Mendelsson', 'Cracker', 'Andromeda', 'SY Alister') possess qualitative resistance under oligogenic or major gene control. The deployment of clubroot-resistant varieties based on qualitative resistance can impose strong selection pressure on pathogen populations, favoring strains capable of overcoming resistance (McDonald and Linde 2002). In oilseed rape or canola, resistance defeating strains of *P. brassicae* were detected within 3–4 years of the introduction of clubroot-resistant host cultivars (Strelkov *et al.*, 2016). Indeed, many examples exist in which the effectiveness of major resistance genes has been broken, including various cases involving major genes for clubroot resistance (Osaki *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 1998, 1991). The pyramiding of qualitative and quantitative resistance is considered today as a key lever to increase the durability of plant resistance against rapidly evolving pathogen populations (Brun *et al.*, 2010; Tomita *et al.*, 2013). As with most quantitative traits, the effect of quantitative resistance is dependent on other biotic and abiotic environmental factors. The stability of quantitative resistance to clubroot under different fertilization regimes, including low nitrogen input, remains unknown.

The aims of this study were to evaluate the variability in the clubroot resistance response of oilseed rape under different nitrogen input levels and to characterize the impact of this nutritional supply on the effect of genetic resistance factors. A preliminary assay was conducted with non-inoculated (healthy) plants grown under standard clubroot resistance screening conditions, in order to assess the effect of two different NO₃⁻ levels on plant growth and leaf nitrogen content. A segregating host population and a collection of oilseed rape genotypes then were used to identify and compare clubroot resistance QTL under high- and low-nitrogen supply following inoculation with two different isolates of *P. brassicae*.

II Materials and methods

Plasmodiophora brassicae material and inoculum preparation

A selection isolate eH (Fähling *et al.*, 2003) and a single-spore isolate (ssi) K92-16, belonging, respectively, to pathotypes P1 and P4 of *P. brassicae* (as defined on the differentials of Somé *et al.* (1996)), were used in this study. The isolates were maintained on the roots of the universally susceptible Chinese cabbage (*B. rapa* subsp. *pekinensis*) cv. 'Granaat' (European Clubroot Differential ECD 05) (Buczacki *et al.*, 1975). Inoculum was prepared from clubs thawed out at room temperature. The clubs were ground in distilled water and filtered through three sieves

(500, 250 and 100 μm diameter pores). The final resting spore concentration was adjusted with distilled water to 1×10^7 spores/ml using a Malassez cell. In each inoculation, the host differential set of Somé *et al.* (1996) [*B. napus* cv. 'Nevin' (ECD 06), *B. napus* cv. 'Wilhelmsburger' (ECD 10), and *B. napus* cv. 'Brutor'] was included in the assessment to characterize the virulence profile of each isolate at 49 days after inoculation (dai). Inoculated and non-inoculated seedlings of ECD 05 also were included as controls.

Plant material and genetic map

Genetic maps

For linkage analyses, the 'Darmor-bzh' \times 'Yudal' genetic map was built using a population of 356 doubled haploid (DH) lines derived from the cross 'Darmor-bzh' \times 'Yudal' (Lombard and Delourme 2001). The progeny was genotyped using the Brassica Consortium Infinium genotyping 60 K array (Clarke *et al.*, 2016) and the 8 K SNP Illumina array designed by Delourme *et al.* (2013). A total of 28,000 loci were identified as polymorphic and represented 3 592 unique loci. The genetic map was built using Carthagene software (de Givry *et al.*, 2005). Nineteen linkage groups were identified, corresponding to the 19 *B. napus* chromosomes. The genetic map covered 2128.2 cM (1117.6 cM for the A genome and 1010.6 cM for the C genome) and corresponded to a marker density of one marker each 0.56 cM.

For the genome-wide association study (GWAS), the consensus genetic map described in Bouchet *et al.* (2016) was used. The map was obtained by successive projections of the individual maps of the crosses 'Aviso' \times 'Montego', 'Tenor' \times 'Express', 'Darmor-bzh' \times 'Bristol', 'Aviso' \times 'Aburamasari' on the 'Darmor-bzh' \times 'Yudal' genetic map. All individual progenies were genotyped using the 60 K SNP Illumina array.

Plant material for genetic analyses

The 'Darmor-bzh' \times 'Yudal' progeny was chosen for linkage analysis, since a previous study showed that the two parents displayed contrasting responses to *P. brassicae* infection: 'Darmor-bzh' was partially resistant and 'Yudal' was susceptible (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000). In this study a subset of 108 DH lines, termed the DY progeny, was selected randomly from the progeny.

For the genome-wide association studies, a diverse set of 92 winter oilseed rape (WOSR) accessions (hereafter referred to as the WOSR-92 population) was considered. The WOSR-92 population was composed of accessions originating mainly from Western Europe, including 50 of the double low type [(00), low in erucic acid and glucosinolates respectively], 17 of the [0+] type, one of the [+0] type, and 24 of the [++] type. The WOSR-92 collection is described in more detail

Elements	"N8" solution concentration (mM)	"N1" solution concentration (mM)
KNO ₃	3	1
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5
MgSO ₄ , 7H ₂ O	1	1
Ca(NO ₃) ₂ , 4H ₂ O	2.5	-
CaCl ₂ , 2H ₂ O	-	2.5
KCl	-	2
MnSO ₄ , H ₂ O	0.01	
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.001	
CuSO ₄	0.0005	
H ₃ Bo ₃	0.03	
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.001	
FeEDTA	0.027	

Supplementary table 1: Composition of N1 and N8 nutrient solutions.

Both solutions were modified from the solution proposed by Hoagland, in order to reduced N concentration, either to 1mM or to 8 mM. Bold lines indicate elements for which the concentration changed between the two nutrient solutions.

by Bouchet *et al.* (2016). The WOSR-92 population was genotyped using the Infinium Brassica 60 K array. A total of 30,050 SNPs were identified as polymorphic and 24,014 SNPs had a genetic position on the consensus map.

Experiment description and N management

All experiments were performed in a greenhouse. Sowing was always done in October and the tests ended 56 days after sowing (das), i.e. 49 days after inoculation (dai). Two sets of tests were carried out. The first was a single experiment designed to assess the development of control, non-inoculated plants ('Darmor-bzh' and 'Yudal') under the two chosen nitrogen fertilization regimes (N1 and N8, see below). The second set of tests consisted of five independent experiments dedicated to genetic analyses of clubroot resistance under contrasted nitrogen fertilization. Four experiments were conducted using the DY progeny and one was conducted using the WOSR-92 population.

First experiment: Characterization of the N constraint on the development of non-inoculated plants

The experiment was arranged in a split-plot design with two replicates per treatment. Two N fertilization rates were considered as main plots and the two genotypes, 'Darmor-bzh' and 'Yudal', were considered as subplots. Seeds were sown in 4-cm-diameter pots (1 seed per pot) filled with "Falienor 922016F3" potting medium (Falienor, Vivy, France), which consists of 65% Irish peat, 20% black peat, 15% perlite and 2% clay. The pots were transferred to a greenhouse equipped with heating and artificial lighting and maintained at temperatures ranging from 19 to 22 °C under a 16/8 h day/night cycle. Two nutrient solutions were supplied to the plants by watering at the bottom of the pots (sub-irrigation). These included (1) a N-non-limiting nutrient solution (N8) based on a half-strength modified Hoagland solution in which [KNO₃] was 8 mM (see detailed composition in Supplementary Table (1), and (2) a N-limited nutrient solution (N1) in which [KNO₃] was 1 mM and which was supplemented with KCl to readjust the total potassium concentration. The N conditions were applied from the time of sowing until the end of the experiment. Plants were sub-irrigated with the appropriate nutrient solution once a week until 20 days after sowing (das) and then twice a week until 56 das, based on the requirements of the plants under condition N1. Since transpiration was higher in the N8-treated plants, those plants also were supplied with water between applications of nutrient solution so as to avoid water stress. Plant samples were collected every 7 days from 7 to 56 das (i.e., a total of 8 sampling time-points). At each date and for each combination of N level, genotype and replicate, a sample was obtained from the whole leaves of 18 plants (pooled). Then, leaf samples were oven-dried at 70 °C for 48 h to obtain estimates of aerial dry matter. For samples collected at 20 and 35 das, N content of aerial

Table 1: Summary of clubroot resistance tests carried out for genetic analyses.

In each test, the year, the *Plasmodiophora brassicae* isolate, the host genetic material, the N levels as well as the experimental design are presented. The genetic analyses column refers to linkage analyses (LA) when experiments were conducted using the DY progeny or to Genome-wide associations studies (GWAS) when the WOSR-92 population was used. The genetic material column refers to the population used. The number of lines considered in each population is indicated into brackets.

Test name	Genetic analysis	Isolate	Biological repetition	Plant material	N level	Experimental design
LA_eH_1	LA	eH	R1	DY progeny (108)	Modified Hoagland N1[NO ₃ ⁻] = 1 mM N8[NO ₃ ⁻] = 8 mM	Split-plot (3 reps) N: main plots Genotypes: sub-plots
LA_eH_2	LA	eH	R2	DY progeny (108)	Modified Hoagland N1[NO ₃ ⁻] = 1 mM N8[NO ₃ ⁻] = 8 mM	Split-plot (3 reps) N: main plots Genotypes: sub-plots
LA_K92-16_1	LA	K92-16	R1	DY progeny (108)	Modified Hoagland N1[NO ₃ ⁻] = 1 mM N8[NO ₃ ⁻] = 8 mM	Split-plot (3 reps) N: main plots Genotypes: sub-plots
LA_K92-16_2	LA	K92-16	R2	DY progeny (108)	Modified Hoagland N1[NO ₃ ⁻] = 1 mM N8[NO ₃ ⁻] = 8 mM	Split-plot (3 reps) N: main plots Genotypes: sub-plots
GWAS_eH	GWAS	eH	-	WOSR-population (92)	Modified Hoagland N1[NO ₃ ⁻] = 1 mM N8[NO ₃ ⁻] = 8 mM	Split-plot (3 reps) N: main plots Genotypes: sub-plots

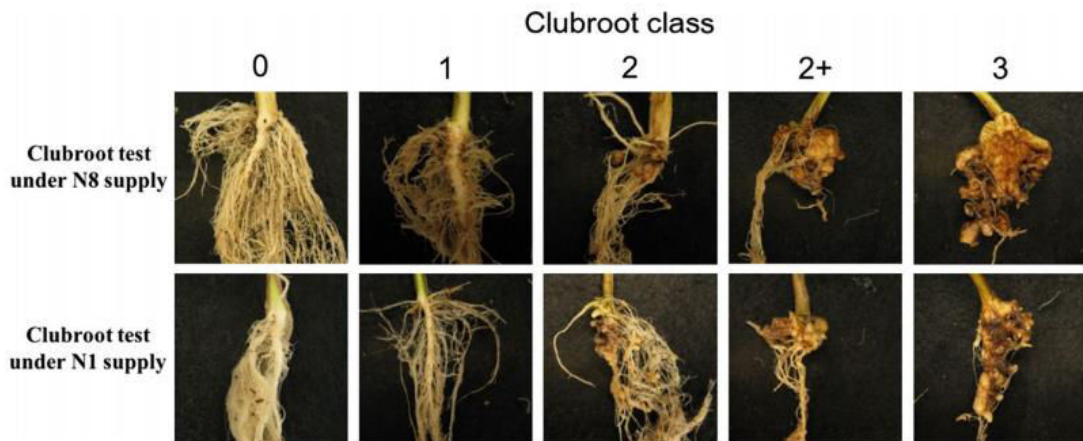


Figure 1: Score of clubroot symptoms used to determine DI values under N8 and N1 conditions.

Clubroot classes were determined according to Manzanares-Dauleux et al., 2000b.

plant parts was assessed by Dumas combustion (Dumas 1831) carried out on an elemental analyzer (EA1112 CHNS/O Thermo Electron).

Second set of tests: clubroot experiments for genetic analyses

Five inoculation tests were performed in this study, four using the DY progeny (consisting of 108 DH lines for linkage analysis) and one with the WOSR-92 population (Table 1). The sowing and plant growing conditions were similar to those described above for the N constraint characterization experiment. Inoculations were carried out one week after sowing by applying 1 mL of a resting spore suspension (1×10^7 spores/mL) to the bottom of the stem of each seedling. Final evaluation of disease severity was performed 49 dai. The name and the characteristics of the different tests are indicated in Table 1. All experiments were arranged in a split-plot design with three replicates, in which each experimental unit consisted of six plants. Nitrogen levels (N1 vs. N8) were considered as main plots and the plant genotypes were considered as sub-plots. The four tests with the DY progeny were carried out under N1 and N8 conditions, and included two biological repetitions with *P. brassicae* isolate eH (LA_eH_1 and LA_eH_2) as the inoculum, and two biological repetitions with K92-16 (LA_K92-1_14 and LA_K92-16_2) as the inoculum. For GWAS, the test was carried out in 2012 with isolate eH as the inoculum under N1 and N8 conditions (GWAS_eH).

Trait acquisition

In each test, a disease index (DI) was calculated at 49 dai for each genotype, each isolate, each N condition and each replicate. The DI was determined according to the method of Buczacki *et al.* (1975) as modified by Manzanares-Dauleux *et al.* (2000). For both nitrogen conditions, disease indices ranged from 0 for completely resistant plants (no symptoms) to 100 for the most susceptible plants (root system completely galled) (Figure 1). The N-response was characterized by the difference between the mean DI value under N8 condition and the mean DI value under N1 condition. This trait was termed Δ DI.

Statistical analyses

Statistical analyses were carried out with R software (RCoreTeam, 2013). For the DY progeny and for each *P. brassicae* isolate (eH and K92-16), Pearson's correlations were estimated between the mean DI obtained for each N condition and for each test.

Mixed models for single-test analyses

The mixed linear model presented in Eq. (1), called single-model, was used to analyze the DI data from each test: LA_eH_1, La_K92-16_1, LA_eH_2, LA_K92-16_2 and GWAS_eH. The

lme4 package (Bates *et al.*, 2014) and lmerTest package (Kuznetsova *et al.*, 2015) were used to test both random and fixed effects:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + N_j + R_k + GN_{ij} + NR_{jk} + e_{ijk} \quad (1)$$

where Y_{ijk} represents the disease index value of Genotype i estimated under the N condition j and in the replication k , μ stands for the population mean, e_{ijk} stands for the residual, GN_{ij} stands for the Genotype \times Nitrogen condition interaction and NR_{jk} stands for the Replication \times Nitrogen condition interaction. The underlined effects were declared as random. The model (1) also was used to estimate broad-sense heritability as presented in Eq. (2):

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \frac{\sigma_{GN}^2}{n} + \sigma_e^2} \quad (2)$$

where σ_G^2 stands for the genotypic variance, σ_{GN}^2 for the Genotype \times N condition variance, σ_e^2 for the residual variance and “ n ” represents the number of N conditions.

To estimate the genotypic value of each DH line for each N condition, another model was used for each test and each N condition (Eq. 3):

$$Y_{ij} = \mu + G_i + R_j + e_{ij} \quad (3)$$

where Y_{ij} stands for the disease index value of genotype i in the j^{th} replication, and e_{ij} stands for the residual. This model (3) also was used to estimate broad-sense heritability for each trait, each test and each N condition as proposed by Eq. (4):

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \sigma_e^2} \quad (4)$$

Mixed model for multi-tests analyses

For DY progeny and for each isolate, a mixed model (Eq. 5) was fitted across the biological repetitions: the eH model concerned the data from LA_eH_1 and LA_eH_2, while the K92-16 model concerned the data from LA_K92-16_1 and LA-K92-16_2.

$$Y_{ijkl} = \mu + G_i + N_j + T_k + R_l(T_k) + GN_{ij} + GT_{ik} + NT_{jk} + NR(T)_{jkl} + e_{ijkl} \quad (5)$$

The underlined effects were declared as random. According to this model (5), Genotype effects were estimates for each DH line; $G \times N$ effects were estimates for each DH line and each N condition (across biological repetition). These estimates were further used for QTL analyses. The model (5) also was used to estimate broad-sense heritability as presented in Eq. (6):

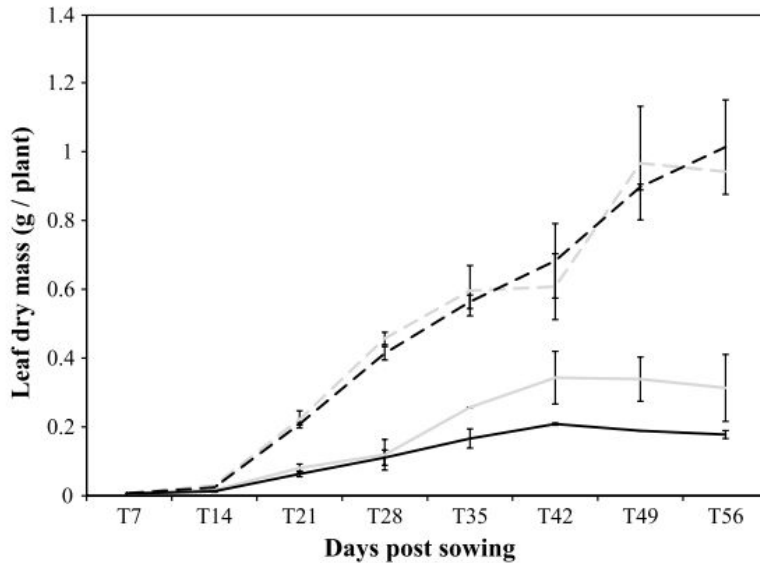


Figure 2: Effect of the two nitrogen levels, 8 and 1 mM, on leaf dry mass of *Brassica napus* plants that were not inoculated with *Plasmodiophora brassicae*.

The two parents of the DY population, ‘Darmor-*bzh*’ and ‘Yudal’, are considered. ‘Darmor-*bzh*’ and ‘Yudal’ are represented, respectively, as gray and black lines. N8 and N1 supplies are represented, respectively, as dotted and continuous lines. The standard errors are shown.

Table 2: Mean dry weight, N content and total N per plant aerial parts measured for ‘Darmor-*bzh*’ and ‘Yudal’ non-inoculated at 20 and 35 days after sowing under the two N treatments: N1[NO₃⁻] = 1 mM and N8: [NO₃⁻] = 8 mM.

Means are presented ± the standard error of the mean.

Genotype	das (days after sowing)	N supply	Aerial dry biomass (mg per plant)	Nitrogen content in aerial part (%)	Total nitrogen per plant aerial part (mg per plant)
Darmor- <i>bzh</i>	20	N1	149.8 ± 56.4	1.06 ± 0.17	1.5 ± 0.3
Darmor- <i>bzh</i>	20	N8	698.6 ± 23.6	3.50 ± 0.01	24.4 ± 0.7
Yudal	20	N1	158.3 ± 36.1	0.86 ± 0.01	1.4 ± 0.3
Yudal	20	N8	677.8 ± 22.2	2.77 ± 0.11	18.8 ± 0.1
Darmor- <i>bzh</i>	35	N1	468.5 ± 91.5	0.72 ± 0.07	3.3 ± 0.3
Darmor- <i>bzh</i>	35	N8	1095.1 ± 168.4	2.70 ± 0.09	29.7 ± 5.5
Yudal	35	N1	343.0 ± 4.0	0.69 ± 0.02	2.3 ± 0.0
Yudal	35	N8	1394.3 ± 199.8	2.32 ± 0.22	32.0 ± 1.5

$$H^2 = \frac{\sigma_G^2}{\sigma_G^2 + \frac{\sigma_{GN}^2}{n} + \frac{\sigma_{GT}^2}{t} + \sigma_e^2} \quad (6)$$

QTL mapping: linkage analyses and GWAS

A multiple QTL mapping model was tested using the R/qtl package (Broman *et al.*, 2003) to analyze data estimated from model (5) either for eH or for K92-16. For each DH line and each isolate, traits were defined as follows: (1) the Genotype estimates for each N condition according to model (5), corresponding to the DI value under N1 and to the DI value under N8; (2) the Δ DI corresponding to the difference between DI estimated under N8 and under N1, and (3) Genotype (G) and G \times N estimates (GN1 and GN8) according to model (5). First, a simple interval mapping (SIM) analysis was carried out to estimate roughly the number of QTL involved in the control of the trait under investigation (scanone function). For the SIM analysis, a LODscore threshold of 3.31 was estimated by 1 000 permutations ($\alpha = 0.05$). Then, a stepwise selection of QTL (forward and backward) was performed, allowing for QTL-pairwise interactions, using the Haley–Knott regression method (stepwiseqtl function). The Maximum QTL number (max.qtl) was set to the number of QTL previously identified by SIM. Thresholds for incorporating new additive QTLs and epistatic interactions into the model were calculated using 100 permutations with $\alpha = 0.05$ (calc.penalties function). The penalties obtained were (3.20, 5.02, 2.41). The chosen multiple QTL model corresponded to the model with the largest penalized LOD score (pLOD). An ANOVA was fitted to the chosen multiple QTL model (fitqtl function). QTL were retained in the final model when their effects were significant ($\alpha = 0.05$). Based on the same ANOVA, the percentage of variation explained by the global model and the R² of each QTL were assessed. The fitqtl function also provided the LOD value for each QTL. The confidence intervals of the QTL were assessed with a LOD drop of 1 unit (scaneone and lodint functions). QTL positions and marker names at these positions, confidence intervals, percentages of variation explained by each QTL (R²) and favorable alleles were scored.

For GWAS, a compressed mixed linear model (Zhang *et al.*, 2010) implemented in the GAPIT R package (Lipka *et al.*, 2012) was used for each N supply. For each trait and each genotype, the adjusted means were considered according to model (3). A mixed linear model (MLM) with the K matrix declared as random was applied for each test and marker effect was included one by one as fixed. The Kinship matrix was estimated according to VanRaden (2008). To correct for multiple analysis, a False Discovery Rate (FDR) was calculated for each test as described in Benjamini and Hochberg (1995), and the threshold under which the test was declared as significant was set to 10%.

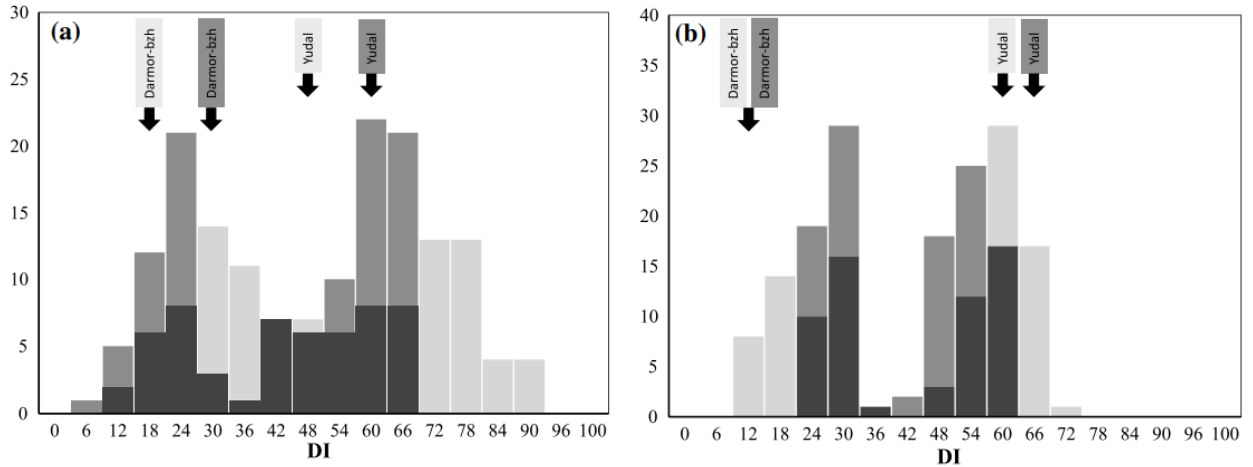


Figure 3: Histogram showing the distribution of disease indices of 108 doubled haploid lines from ‘Darmor-*bzh*’ × ‘Yudal’ progeny (DY progeny) under two nitrogen levels, high (8 mM) in light gray and low (1 mM) in medium grey, with *Plasmodiophora brassicae* isolates eH (a) and K92-16 (b).

When two bars (N1 and N8) are overlapping, the overlap is represented in dark gray.

Table 3: Mean disease index (DI) and heritability values calculated for DI in each test and each N condition for the DY progeny and WOSR-92 population.

Mean DI values are presented in Table 3a. Heritability values are presented in Table 3b.

Trait	Test and N supply	Population	Isolate		
			eH	K92-16	
<i>a</i>					
ΔDI	1	DY progeny	23.3	4.1	
	2	DY progeny	14.2	1.7	
	–	WOSR-92	19.6		
DI	1-N1	DY progeny	20.2	19.9	
	1-N8	DY progeny	43.5	24.0	
	2-N1	DY progeny	57.3	60.1	
	2-N8	DY progeny	71.5	61.8	
	-N1	WOSR-92	46.3		
	-N8	WOSR-92	65.9		
	Model		Population	Isolate	
			eH (%)	K92-16 (%)	
<i>b</i>					
Multitest model		–	DY progeny	79.8	73.8
Individual test model (across N)		1	DY progeny	79.5	77.5
		2	DY progeny	88.5	95.4
		–	WOSR-92	79.4	
Individual test model (biological repetitionxN)		1-N1	DY progeny	84.9	83.6
		1-N8	DY progeny	91.6	72.6
		2-N1	DY progeny	91.7	96.3
		2-N8	DY progeny	96.7	98.0
		-N1	WOSR-92	85.7	
		-N8	WOSR-92	91.4	

III Results

N1 treatment induced nitrogen deficiency and growth reduction from 21 das in non-inoculated plants grown under the clubroot test conditions

A low nitrogen supply (N1 nutrient solution, with 1 mM of NO_3^-) led to a 2/3rd reduction in leaf biomass as early as 21 das in both 'Darmor-bzh' and 'Yudal', relative to the high-nitrogen condition (Figure 2). The growth reduction caused by nitrogen deficiency was slightly stronger in 'Yudal' (900 mg/plant under N8 vs. 190 mg/plant under N1) than in 'Darmor-bzh' (930 mg/plant under N8 vs. 340 mg/plant under N1) at the end of the test (49 das). At both 20 and 35 das, a low N supply led to a sharp decrease in leaf nitrogen content. Under the N8 condition, each plant absorbed from 29.68 to 31.95 mg of nitrogen by 35 das. Under the N1 condition, plants absorbed only 2.35–3.29 mg of nitrogen (Table 2), indicating a clear difference in terms of N absorption under the two N levels. Altogether, these data suggest that supplying plants with the N1 solution triggered significant nitrogen stress at the same time points that correspond to secondary infection by *P. brassicae*. Thereafter, N1 and N8 supplies were used for further genetic experiments using plants inoculated with the pathogen.

N1 treatment resulted in the modulation of the host response to isolate eH, but not to isolate K92-16

The whole range of clubroot disease symptoms (classes 0–3) was observed within the DY progeny in both N1 and N8 conditions (Figure 1), i.e. DI near 100 was observed on some genotypes cultivated under N1 conditions (Figure 3). The DI distributions among the DY progeny showed enrichment in partially resistant genotypes under N1, compared to N8. Extreme disease phenotypes (very susceptible or very resistant) were more frequent under N8 conditions (Figure 3a). For the DY progeny challenged with the eH isolate, the analysis of DI using both single and multi-test mixed linear models revealed highly significant effects of genotype, nitrogen condition and $G \times N$ interaction. The genotypic effect explained 60.3% of the global variation observed, the $G \times N$ effect 8.8% and the $G \times \text{Test}$ 7.7%. Mean nitrogen effect on DI was characterized by a decrease of 23.3 DI units under the N1 treatment compared with the N8 treatment in the LA_eH_1 test and a decrease of 14.2 units in the LA_eH_2 test (Table 3a). Heritability values ranged from 79.8 to 96.7%, depending on the test or on the model considered (Table 3b).

In the assays in which the DY progeny was inoculated with isolate K92-16, genotype effects were significant and heritability values were high (from 73.8 to 95.36%) (Table 3b). Nitrogen effect was not significant, however, and significant $G \times N$ interactions were reported only in the LA_K92-16_2 test (Table 3a). According to the multi-test model, the variance was split as follows: 54.6%

Table 4: Correlation matrix of disease index (DI) measured on the DY progeny across the different tests.

The values represent the correlation coefficients calculated using Pearson's method. The labels refer to the experimental conditions. The first part of the name corresponds to the *Plasmodiophora brassicae* isolate that was used (eH or K92-16), the second part of the name corresponds to the test of the experiment (1 or 2, as defined in Table 2 and Table 1 legend) and the last part corresponds to the nitrogen conditions (N1: low nitrogen or N8: high nitrogen). Correlations obtained between experiments using the same isolate are indicated in italic for eH and in bold for K92-16.

	eH_1_N1	eH_1_N8	eH_2_N1	eH_2_N8	K92-16_1_N1	K92-16_1_N8	K92-16_2_N1	K92-16_2_N8
eH_1_N1	1							
eH_1_N8	<i>0.828</i>	1						
eH_2_N1	<i>0.743</i>	<i>0.823</i>	1					
eH_2_N8	<i>0.68</i>	<i>0.866</i>	<i>0.828</i>	1				
K92-16_1_N1	-0.17	-0.137	-0.098	-0.124	1			
K92-16_1_N8	-0.109	-0.109	-0.039	-0.117	0.752	1		
K92-16_2_N1	-0.092	-0.149	-0.073	-0.112	0.821	0.775	1	
K92-16_2_N8	-0.18	-0.199	-0.119	-0.156	0.828	0.78	0.957	1

QTLname	trait	Test Name	chromosome	position (cM)	Lod	IC (cM)	R ² (%)	favorable allele	
A01	DI with eH isolate- standard nitrogen fertilization	Manzanares-Dauleux et al, 2000	A01	37.6	5.13	15.4-38.7	1.84	Darmor-bzh	
A02			A02	37	9.98	32.2-39.6	3.72	Yudal	
A10			A10	66.6	4.1	63-68	1.46	Darmor-bzh	
C02			C02	130.8	6.64	126.5-134	2.41	Yudal	
C03			C03	80.4	3.17	75.1-88.1	1.12	Yudal	
C07			C07	86	1.89	85-93.9	0.66	Yudal	
C09			C09	58	89.83	57.8-58.4	67.94	Darmor-bzh	
A01:C09							2.4	0.84	
A02:C09							8.66	3.19	

QTLname	trait	Test Name	chromosome	position (cM)	Lod	IC (cM)	R ² (%)	favorable allele
A03	DI with K92-16 isolate- standard nitrogen fertilization	Manzanares-Dauleux et al, 2000	A03	130.4	11.47	128-138.7	34.60%	Darmor-bzh
C09			C09	58.7	8.04	52.1-61.0	22.40%	Darmor-bzh
A03:C09						3.05	7.60%	

Supplementary table 2: Results of the QTL detection carried out using the phenotyping data of Manzanares-Dauleux *et al.* (2003, 2006) with isolates eH and K92-16 and the genetic map presented in this article.

The mapping population consisted in 110 doubled haploid lines from the DY progeny. The phenotyping consisted in an estimation of the disease index according to the description made in the Materials and Methods part. Plants were grown in a greenhouse under N nonlimiting conditions. The nutrient solution corresponded to Lycoplant. Position, confidence Interval, R² of each QTL are reported in the table, as well as the favorable allele, that correspond to the allele conferring resistance (associated to a DI reduction).

for the genotype effect, 26.0% for the G × T effect and 0.38% for the G × N effect. This low impact of nitrogen constraint on DI is illustrated by the mean decrease of only 4.1 DI units between N8 and N1 conditions in LA_K92-16_1 and of 1.69 DI units in the LA_K92-16_2 tests (Table 3a). The DI distribution among the DY progeny for each N condition overlapped, illustrating this low impact of N (Fig. 3b).

Common DI patterns were observed following inoculation with either of the *P. brassicae* isolates: high heritability values, a similar sensitivity to uncontrolled variation (as shown by similar T and G × T effects) and bimodal distribution suggesting that resistance was controlled by at least one major gene/QTL. The DI values were not correlated between isolates, but did exhibit high correlations between the two N conditions for a given isolate (Table 4). This indicates that different genetic factors were implicated in the control of the resistance against each isolate and that common regions may be involved in the control of DI under both N conditions for a given isolate. Nonetheless, the clubroot response to N limiting supply differed when considering the two isolates: significant nitrogen and G × N effects were detected for eH but not for K92-16. For eH, the Δ DI ranged from -23.89 to 28.27 units in the DY progeny, while for K92-16 the Δ DI ranged only between -2.93 and 2.53 units.

QTL analyses and QTL typology

The results of the QTL detection study using the DY progeny and DI values as assessed for the two isolates (eH and K92-16) and two N conditions (N1 and N8) are presented here. QTL were named according to their corresponding chromosome. A QTL name indicates a single position regardless of the isolate or N conditions. When two QTL were detected on the same chromosome but were located at two different positions, a letter was added to the QTL name to distinguish the two positions. As G × N effects were not significant for K92-16, QTL detection was not carried out for Δ DI and G × N estimates with this isolate.

Nitrogen input modulated the relative effects of the QTL controlling resistance to eH in the DY progeny

QTL associated with clubroot resistance were detected under both N1 and N8 conditions at positions A07, C02, C03 and C09 (Table 5). 'Yudal' carried the resistance allele at the C02 and C03 QTL, whereas 'Darmor-bzh' carried the resistance allele at the A07 and C09 QTL. The A07, C02, C03 and C09 QTL were modulated differently by N supply: the effect of C09 QTL was lower under N1 than under N8 ($R^2 = 86.83$ and $R^2 = 66.51\%$, respectively), whereas the effects of A07 QTL, C02 QTL and C03 QTL were greater under N1. A few small-effect QTL were detected specifically under the N1 or N8 treatments on chromosome A05. Using the genotypic estimates assessed according to the multi-test model, the C02, C03 and C09 QTL also were detected with

Table 5: QTL detection results for linkage analyses performed on disease index (DI) values obtained following inoculation with *Plasmodiophora brassicae* eH isolate.

QTL were detected using multiple QTL mapping. QTL positions correspond to the position of the LOD score peak and are presented on the DY genetic map (cM). The closest marker from the QTL peak is indicated. Confidence intervals (CI) were estimated using a LODscore drop of one unit. The favorable allele corresponds to the allele associated with resistance. The QTL names were designed to be unique. The same QTL name reported for two different analyses (reported either in Table 5 or Table 6) indicates that the QTL were detected at the same position, or at overlapping positions, and were considered to represent the same locus. Epistatic interactions between QTL were assessed and reported in the Table as “QTL1 × QTL2” in the QTL name column. Once all QTL were detected for a single trait, a global linear model was fitted, including all QTL and the proportion of phenotypic variance explained by each QTL (R^2) was estimated. Six different traits were used for QTL detection: i) DI under N1 (low nitrogen) and DI under N8 (high nitrogen) correspond to lsmmeans of the DI obtained over the two tests (assessed for model (5) for these traits); the favorable allele corresponds to the allele associated with a DI decrease, ii) Δ DI was assessed for each genotype as the difference between mean DI observed under N8 and mean DI observed under N1; the favorable allele was defined as the allele that reduced the Δ DI, meaning that it increased the DI stability across N conditions, iii) G and G × N estimates according to model (5); the G estimates correspond to the global genetic performance of a DH line across N conditions, and the G × N estimates corresponds to the participation of a DH line to the G × N interaction. A low G × N interaction indicates that the DH line acted similar to the global mean population. G × N estimates were assessed both for N1 and N8 conditions. For G estimates, the favorable allele corresponds to the allele associated with resistance (as for Table 6) and to a DI decrease; for G × N estimates, the favorable allele corresponds to the allele associated with a DI decrease, and to a lower contribution to the G × N term

QTL name	Trait	Chromosome	Position (cM)	Closest marker	Lod	CI (cM)	R^2 (%)	Favorable allele
A05a	DI under N1	A05	40.5	Bn-A05-p5133417	5.6	38.7–44.5	2.42	Yudal
A07		A07	15.4	Bn-A07-p9336662	3.5	0–28.6	1.48	Darmor- <i>bzh</i>
C02		C02	138	BS008390	21	134.3–139.1	12.98	Yudal
C03		C03	32.2	Bn-C3-p5218330	14.6	31–33.4	7.75	Yudal
C09		C09	58.7	Bn-C9-p18977492	50.3	57.8–59.3	66.51	Darmor- <i>bzh</i>
A05c	DI under N8	A05	61.2	Bn-A05-p20009925	13	60.9–62.4	1.04	Yudal
A07		A07	27.1	scaffoldv4_1_369555	8.13	17.8–28.6	0.58	Darmor- <i>bzh</i>
C02		C02	139.5	Bn-C2-p52768801	19.7	139.1–140.3	1.84	Yudal
C03		C03	32.2	Bn-C3-p5218330	20.4	31.0–33.4	1.93	Yudal
C09		C09	58.7	Bn-C9-p18977492	98.4	57.8–59.3	86.83	Darmor- <i>bzh</i>
A05b	G- estimates	A05	52.5	scaffoldv4_388_420377	6.33	51.1–53.4	0.80	Yudal
C01		C01	55.3	scaffoldv4_95_32375	8.93	54.1–59.5	1.20	Darmor- <i>bzh</i>
C02		C02	139.5	Bn-C2-p52768801	28.84	139.1–139.9	6.22	Yudal
C03		C03	32.2	Bn-C3-p5218330	24.05	31.0–33.4	4.61	Yudal
C09		C09	58.7	Bn-C9-p18977492	82.88	57.8–59.3	82.50	Darmor- <i>bzh</i>
C02	Δ DI	C02	130.4	scaffoldv4_908_8062	5.2	127.5–131.5	10.08	Darmor- <i>bzh</i>
C09		C09	56.7	scaffoldv4_101_69199	18.9	49.9–56.9	48.70	Darmor- <i>bzh</i>
C02	G × N1 -estimates	C02	130.4	scaffoldv4_908_8062	7.2	127.5–139.1	19.62	Yudal
C09		C09	50.2	BS008740	9.21	47.1–59.6	26.24	Yudal
C09	G × N8 -estimates	C09	58.7	Bn-C9-p18977492	27.31	57.5–59.3	68.13	Darmor- <i>bzh</i>

similar effects, as well as additional QTL on chromosomes C01 and A05b. Nitrogen-interacting QTL, detected using the variable Δ DI (difference between two N conditions), were located on chromosomes C09 and C02 (Table 5). For both of these QTL, the 'Darmor-bzh' allele decreased the Δ DI (Table 5). Two QTL were detected for the G \times N estimates: the C02 QTL (G \times N1) and the C09 QTL (G \times N1 and G \times N8 estimates). For C02 and C09 QTL, the 'Yudal' allele contributed to phenotypes that were more resistant to *P. brassicae* under the N1 condition than would have been expected under the additive model.

Resistance to K92-16 was controlled mostly by a nitrogen-independent major QTL on chromosome A03

A major QTL was detected on position A03b across years and conditions and explained 92.5–94.10% of the phenotypic variation observed (Table 6). 'Darmor-bzh' carried the resistance allele. Four other QTL were detected either for genotypic estimates or under N1 and N8 conditions (Table 6) at positions A03a, A09, C02, and C03. These QTL explained a small part of the phenotypic variation ($R^2 < 2\%$). The A03b, A09 and C02 QTL were detected in all analyses, whereas the C03 and A03a QTL were detected only for the G-estimates. The resistance allele was carried by 'Darmor-bzh' at A03b and A09a, and by 'Yudal' at A03a, C02 and C03.

Modulation of QTL effects by P. brassicae isolate

Low correlations were found between the DI values obtained following inoculation with the eH and K92-16 isolates (Table 4). This may have reflected the fact that the main QTL involved in genetic control of DI were different in response to each isolate: C09 QTL for eH and A03b QTL for K92-16. Although common QTL also were involved in the response to these isolates, their effects were very different to each isolate. The three main QTL involved in plant resistance to eH were C09, C02 and C03, which explained 82.5, 8.5 and 12.5%, respectively, of the variation according to the multi-test model. These QTL also were detected using K92-16, but were found to have smaller effects: C02 explained 1.7% of the variation, while C03 explained 0.5% (Table 6). The C09 QTL was detected for K92-16 when the phenotypic data of Manzanares-Dauleux *et al.* (2000) were re-analyzed using the updated genetic map. It explained 22.4% of the phenotypic variation (Supplementary Table 2).

Nitrogen-related typology of clubroot resistance QTL detected in the DY progeny

The QTL detected were characterized according to (1) their isolate-specificity, (2) the magnitude of their effect (R^2) and (3) their N-sensitivity. QTL were considered as N-sensitive when they were detected under only one N condition (Tables 5, 6) or when they were detected using G \times N (Table 5, 6) or Δ DI estimates (Table 5, 6). Using these criteria, four QTL profiles were observed (Table 7): 1/low-effect QTL ($R^2 < 10\%$) that were isolate-specific and not "N-

Table 6: QTL detection results for linkage analyses performed on disease index (DI) values obtained following inoculation with *Plasmodiophora brassicae* isolate K92-16.

For more details, refer to the legend to Table 5.

QTL name	Trait	Chromosome	Position (cM)	Closest marker	Lod	CI (cM)	R^2 (%)	Favorable allele
A03b	DI under N1	A03	129.8	scaffoldv4_4635_7000	69.9	129.5–130.7	92.52	Darmor- <i>bzh</i>
A09		A09	45.1	BS006266	5.4	43.9–46.1	1.45	Darmor- <i>bzh</i>
C02		C02	138	BS008390	6.3	116.1–139.5	1.72	Yudal
A03bxC02					3.5		0.91	
A03b	DI under N8	A03	129.8	scaffoldv4_4635_7000	68.6	129.5–130.7	92.82	Darmor- <i>bzh</i>
A09		A09	45.1	BS006266	5.9	43.9–46.1	1.70	Darmor- <i>bzh</i>
C02		C02	134.3	scaffoldv4_672_168721	3.34	41.7–139.9	0.91	Yudal
A03a	G-estimates	A03	18.7	Bn-A03-p2665731	3.67	16.4–21.7	0.60	Yudal
A03b		A03	129.8	scaffoldv4_4635_7000	82.11	129.5–130.7	94.10	Darmor- <i>bzh</i>
A09		A09	45.5	Bn-A09-p5958764	6.45	44.7–46.1	1.10	Darmor- <i>bzh</i>
C02		C02	120.8	scaffoldv4_175_831011	9.3	119.6–139.9	1.70	Yudal
C03		C03	16.7	scaffoldv4_5_984975	3.37	4.7–37.9	0.50	Yudal
A03bxC02						4.2		0.70

Table 7: QTL typology.

QTL were classified according to three criteria. A QTL was considered as “N-sensitive” when it was detected specifically under one N condition, or when it was detected for $G \times N$ or ΔDI estimates. The second criterion corresponds to the isolate-specificity. A QTL was isolate-specific when it was detected for a single isolate of *Plasmodiophora brassicae*. The third criterion corresponds to the QTL effect: low effects correspond to $R^2 < 10\%$, medium effects to $R^2 > 10$ and $< 50\%$, and high effects to $R^2 > 50\%$.

QTL name	Isolate	QTL position (cM)	R^2 range	N-sensitivity	Isolate-specificity	Effect	Profile
A03a	K92-16	16.4–21.7	0.60	Not relevant	Yes	Low	PF1
A05b	eH	51.1–53.4	0.80	No	Yes	Low	
A07	eH	0–28.6	0.58–1.48	No	Yes	Low	
A09	K92-16	43.9–46.1	1.10–1.45	Not relevant	Yes	Low	
C01	eH	54.1–59.5	1.20	No	Yes	Low	
A03b	K92-16	129.5–130.7	92.52–94.10	Not relevant	Yes	High	PF2
C03	Both	4.7–37.9	0.50–7.75	Moderate	No	Medium	PF3
C02	Both	119.6–140.3	Main: 0.91–12.98 inter: 10.08–19.62	Yes	No	Medium	PF4
C09	Both	47.1–59.6	Main: 66.51–86.83 inter: 26.24–68.13	Yes	No	high	

sensitive” (profile PF1); 2/QTL of the profile PF2 that were not “N-sensitive” but had medium effects ($10\% < R^2 < 50\%$); 3/the C03 QTL (profile PF3) that were not detected using Δ DI or GxN estimates, but which had moderate “N-sensitivity” since the extent of phenotypic variation was affected by N supply (for eH, $R^2 = 1.93\%$ under N8 and 7.75% under N1); and 4/the C02 and C09 QTL (profile PF4) that were characterized as “N-sensitive”, not isolate-specific and presented medium to high effects ($R^2 > 50\%$).

Analysis of genetic diversity in the WOSR-92 population

The results described above indicated that a low-nitrogen supply enhanced resistance to *P. brassicae* isolate eH in the host genotype ‘Yudal’. This could be explained by the increased effects of the C02 and C03 QTL under the N1 treatment regime and by the fact that ‘Yudal’ possessed resistance alleles at these two QTL. The following steps were carried out to assess if nitrogen-driven modulation of clubroot symptom development is a general feature of every eH-susceptible oilseed rape genotype. This question was addressed by an analysis of nitrogen-driven clubroot symptom modulation and GWAS in a panel of diverse hosts (the WOSR-92 population).

Important variability of clubroot symptoms in low-nitrogen supply was detected in the WOSR-population using eH isolate

In the WOSR-92 population, three groups of genotypes showing different clubroot modulation under the two N conditions were observed (Figure 4). Two groups (G1 and G2) corresponded to non or moderate modulated genotypes. G1 included 26 genotypes that were resistant under both conditions ($DI < 40$), while G2 included 51 genotypes that were susceptible under both conditions ($DI > 40$). G3 included genotypes that exhibited a reduction in DI under low-nitrogen supply. G3 was composed of ten genotypes susceptible under N8 and resistant under N1. The genotypes in G3 included ‘Moldavia’ (Δ DI = 72), ‘Polux’ (Δ DI = 66), ‘Tosca’ (Δ DI = 63), ‘Sarepta’ (Δ DI = 63), ‘Olymp’ (Δ DI = 63), ‘Lembke’ (Δ DI = 58), ‘Doral’ (Δ DI = 56), ‘Quedlinburger’ (Δ DI = 56), ‘Oase’ (Δ DI = 54) and ‘Alsace1360’ (Δ DI = 48).

C09 QTL was the only QTL detected by GWAS

Highly significant effects of genotype, nitrogen and $G \times N$ were reported for the WOSR-92 population tested with the eH isolate. The genotypic effect explained 72% of the global variance and the $G \times N$ effect 15%. Nitrogen effect on DI was characterized by a decrease of 19.3 units between the N8 and N1 treatments. Only one QTL, C09 QTL, was detected by GWAS under both N1 and N8 conditions. It explained 31% of the phenotypic variation and in linkage analyses the allele present in ‘Darmor-bzh’ was associated with resistance. The GWAS analysis did not permit detection of additional QTL, such as the C02 QTL or the C03 QTL, although genotypes with

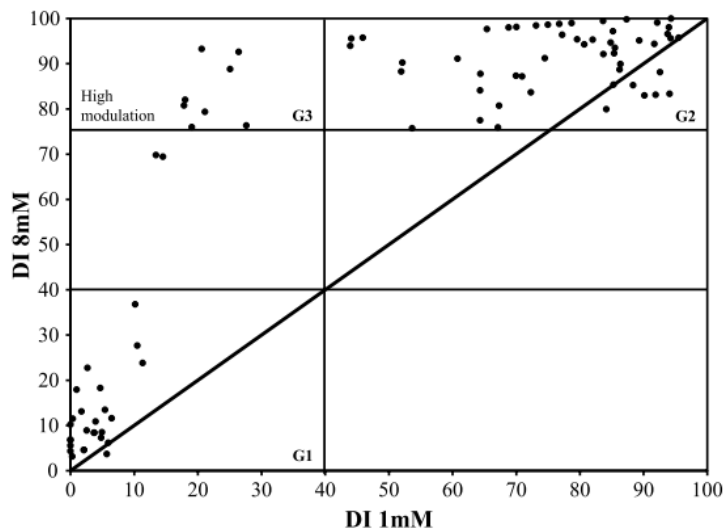


Figure 4: Plot of disease indices (DI) obtained for a diverse set of 92 winter oilseed rape (WOSR-92 population) under high-nitrogen (N8) conditions versus the DI obtained under low (N1) conditions.

Vertical and horizontal lines were added on the plot and represent DI values of 40 and 70 either under N8 or N1. Three groups of genotypes were identified using these lines: G1 corresponds to resistant genotypes presenting $DI < 40$ under both conditions; G2 corresponds to susceptible genotypes either non or moderately modulated by N condition: $DI > 70$ under N8 and $DI > 40$ under N1; and G3 corresponds to highly modulated genotypes: $DI > 70$ under N8 and $DI < 40$ under N1.

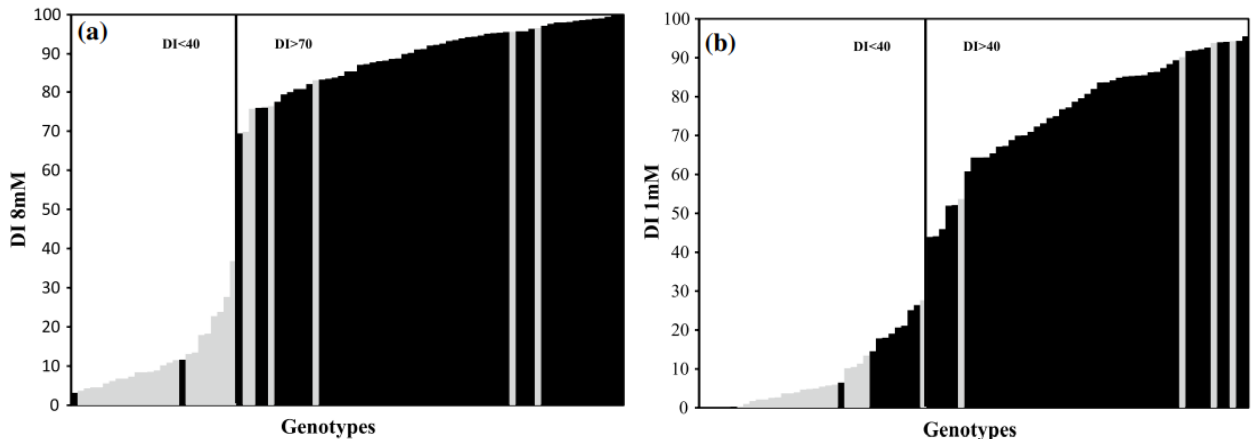


Figure 5: Graph of disease indices obtained following inoculation of the WOSR-92 population with *Plasmodiophora brassicae* isolate eH under high (8 mM) nitrogen conditions (a), and under low (1 mM) nitrogen conditions (b).

Genotypes with the resistance allele ('Darmor-*bzh*²) at the C09 QTL are represented in light gray. Genotypes with the susceptibility allele ('Yudal') at the C09 QTL are represented in dark. a Under the N8 condition, two distinct groups were distinguished. The first group was resistant to eH ($DI < 40$) and composed mainly of genotypes possessing the resistance allele at C09 QTL. The second group was susceptible to eH ($DI > 70$) and mainly composed of genotypes with the susceptibility allele at the C09 QTL. No genotypes were found with DI ranging between 40 and 70. b Under the N1 condition, two groups were distinguished based on their DI value. The first group was resistant to eH ($DI < 40$) and 2/3rds of the genotypes possessed the resistance allele at C09 QTL and 1/3rd possessed the susceptibility allele at C09 QTL. The second group was susceptible or partially susceptible to eH ($DI > 40$) and was composed mainly of genotypes with the susceptibility allele at the C09 QTL.

nitrogen-induced modulation of resistance were reported in the WOSR-92 population (as presented above).

Under the N8 condition, only six accessions included in the WOSR-92 population ('Quedlinbuerger', 'Constable', 'Alsace1360', 'Forto', 'Hokkaido' and 'Janetzki') and carrying the 'Darmor-bzh' allele at the C09 QTL were susceptible (Figure 5a), while the remainder were resistant. Only two genotypes carrying the 'Yudal' allele at the C09 QTL were resistant ('Montego' and 'Madrigal'). Under the N1 condition, genotyping of the C09 QTL could not predict whether a plant would be resistant or not. Ten genotypes carried the 'Yudal' allele at the C09 QTL but were resistant ('Montego', 'Madrigal', 'Oase', 'Olymp', 'Tosca', 'Doral', 'Moldavia', 'Lembke', 'Sarepta' and 'Polux'), and four carried the 'Darmor-bzh' allele but were susceptible ('Constable', 'Forto', 'Janetzki' and 'Hokkaido') (Figure 5b).

IV Discussion

The aims of this study were to evaluate the variability of the clubroot resistance response under different nitrogen input levels, and to characterize the impact of this nutritional supply on the effect of genetic resistance factors. The results obtained indicated that, for both *P. brassicae* isolates examined, major QTL controlling 'Darmor-bzh' resistance were modulated weakly by N input. In contrast, the effects of minor QTL implicated in the resistance to isolate eH in 'Yudal' were modulated more strongly by N supply. Genetic variability for clubroot resistance and for the stability of resistance according to N supply was observed in a panel of winter oilseed rape accessions.

Previous QTL analyses carried out on the DY progeny had shown that clubroot resistance could be effective and was detected starting at 21 dai (corresponding to 28 das) in a standard clubroot assay lasting 56 days (Wagner *et al.*, 2012). Therefore, to study the effect of nitrogen deficiency on QTL effects, an experiment was designed in which N constraint was imposed very early on seedlings grown under controlled conditions. A low-N supply of 1 mM was selected to guarantee a clear nitrogen deficiency during the earliest steps of infection by *P. brassicae* (Figure 2). Since nitrate is the preferred nitrogen source of rapeseed (Arkoun *et al.*, 2012), a modified half-strength Hoagland nutrient solution was used, in which nitrogen is present only as nitrate (without ammonium). The low N solution was depleted for both KNO_3 and $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. Since both potassium and calcium have been described as having effects on clubroot symptom development (Dixon 2009b), and assuming that chloride does not have a major effect on plant clubroot response (Elmer *et al.*, 2007), K^+ and Ca_2^+ concentrations were adjusted in the low-N solution by the addition of KCl and CaCl_2 . This allowed comparisons between the N1 and N8 treatments to be focused on the nitrate effect *per se*.

Under high-nitrogen supply N8, clubroot resistance to isolates eH and K92-16 was found to be controlled mainly by a major QTL (C09 and A03b, respectively) explaining more than 65% of the phenotypic variation and several minor QTL. This global genetic architecture was similar to that already described for the species *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana* (Piao *et al.*, 2009) for different isolates. There was evidence for the C09, C02 and A03a&b QTL in earlier reports (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000, 2003; Werner *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2015). It is possible that the C09 QTL detected in this study was the same that the QTL identified by Werner *et al.* (2008) on the C09 chromosome using the isolate e4, which is very similar to eH, as derived from the same field population. It is not possible, however, to verify this as neither the markers nor the segregating population were the same. Several major resistance genes identified on the A03 chromosome of *B. rapa*, Rcr1, Crr3, Crk, CRa and CRb (Chu *et al.*, 2014; Kato *et al.*, 2013; Matsumoto *et al.*, 1998; Saito *et al.*, 2006), were located at the same genomic region that the A03b QTL detected in this work. It is noteworthy that the best hit in a blast search with the CRa gene on the *B. napus* genome was located in the confidence interval of the A03b QTL. QTL with minor effects, such as C02 and C03, also were identified at syntenic positions on *B. oleracea* LG C02 and C03 and conferred resistance to two to three pathotypes of *P. brassicae* (Lee *et al.*, 2016; Nagaoka *et al.*, 2010).

Nitrogen restriction (N1) led to the modulation of clubroot symptoms in the DY progeny following inoculation with isolate eH. One interpretation of the obtained results could be that plant growth limitation under N1 condition could impair the development of clubs and that such an effect could be genotype-dependent. However, we identified genotypes with high DI values (>90) for both eH and K92-16 isolates under N1 condition, suggesting that N limitation per se does not prevent clubroot development. To further assess that clubroot response under the N1 condition was not an effect of a specific reduction in plant size affecting some genotypes more than others, a side-experiment was conducted in the laboratory with a subset of the HD genotypes analyzed in the present work (details are given in supplementary data S3). The results showed clearly that genotypes showing a reduced stature/size when growing under low nitrogen supply are not necessarily the same genotypes displaying few symptoms or clubs of reduced size (and vice versa). We concluded that the modulation of clubroot symptoms under low nitrogen supply is not correlated to the effect of a nitrogen constraint on plant growth.

These results serve to highlight the complexity of the clubroot pathosystem. Many earlier reports (reviewed by Dixon 2009b) suggested that a nitrogen supplementation of hosts reduces the severity of clubroot symptoms. As shown in the current study, the modulation of clubroot resistance by nitrogen constraint differs depending on the specific *P. brassicae* isolate and *B. napus* genotype. It is reasonable to postulate, therefore, that the effect of nitrogen on the clubroot response of

different Brassica species could be even more different, helping to explain the apparent contradictions between different studies. Moreover, the conditions under which an experiment is carried out (for example in the field versus greenhouse or growth room) also could influence the relationship between nitrogen rate and disease expression.

There is an abundant amount of literature on the influence of nitrogen on disease development under field and controlled conditions, with recurrent reports supporting the assumption that nitrogen stimulates disease caused by biotrophic pathogens. However, there also are many contradictory reports and exceptions to this hypothesis (Fagard *et al.*, 2014). In a given pathosystem, the complexity of crosstalk between nitrogen nutrition and disease development may be linked to different combinations of the resistance loci present in each plant genotype, given that responsiveness to nitrogen constraint may be different from one QTL to another. There are, however, only a few studies to date that have addressed this issue. In one report by Souza *et al.* (2000), most QTL conferring resistance to bacterial blight in common bean were found to be specific to one of the two N supply conditions studied. Nitrogen-induced susceptibility (NIS) has been studied more specifically in the context of the resistance of rice to *M. grisea*, although it has been examined through genetic analyses in only two reports. In a study by Talukder *et al.* (2005), a significant QTL \times N interaction was reported for the larger effect QTL, which were less effective at a high-nitrogen level; the effect of eight other QTL remained stable regardless of the N condition. In another report by Ballini *et al.* (2013), various interactions between nitrogen and genetic resistance were identified: i) a high-nitrogen supply was found to induce susceptibility to rice-blast in only half of the rice genotypes examined, in a finding consistent with the results of the current study on the panel of winter rapeseed, ii) analysis of a progeny led to the identification of one QTL associated with nitrogen-induced susceptibility, and iii) the effect of one NBS-LRR resistance gene was lost under high-nitrogen supply, whereas the effect of two other R genes was independent of nitrogen fertilization. Similarly, a nuanced situation was found in the current study, where only two minor QTL for clubroot resistance (C02 and C03) gained substantial effect under low nitrogen supply (Table 7), whereas two major resistance QTL were not affected much by N constraint. Thus, general rules cannot be applied in this field, and the current findings further highlight the importance of studying fertilization/disease resistance crosstalk through quantitative genetic approaches. The genes underlying clubroot partial resistance QTL are not known, making it difficult to comment on the mechanisms governing the interaction between nitrogen supply and QTL expression. Nonetheless, the C02 and C09 QTL are promising targets for functional studies into the mechanisms of QTL sensitivity and stability in response to nitrogen supply.

Most of the QTL identified in this study were specific to one isolate (with the exception of QTL C02 and C09), which is consistent with an earlier report by Manzanares-Dauleux *et al.* (2003).

In addition, modulation of the QTL effect by nitrogen was more important for the host response to isolate eH than to isolate K92-16. Most studies aimed at deciphering the genetic architecture of a quantitative trait and its variation under biotic constraints rely on the comparison of QTL detected under different conditions. As a consequence of experimental constraints and the need to characterize the same population under different environments, the population sizes analyzed are often small, hence decreasing the power of the genetic analysis. In this context, QTL spectra may not be properly assessed due to the limited population sizes used in most studies. In the current study, the use of multi-test models, combined with highly heritable traits, enabled the detection of reliable QTL with small effects (profiles PF1) that were not identified using test-specific analyses. GWAS analysis allowed the detection of only the major C09 QTL. This apparent low detection power of GWAS can be due to both the small size and the composition of the panel. The panel studied comprised 92 accessions of old and modern winter oilseed rape cultivars. This panel has already been successfully used to identify QTL for seed yield and nitrogen use efficiency (Bouchet *et al.*, 2016), but does not show enough diversity for clubroot resistance. One way to increase GWAS resolution is to add resistant accessions allowing thus the increasing of the resistance alleles frequency in the panel.

Even if the effect of several of the QTL was variable depending on N conditions and/or *P. brassicae* isolate, the same allelic form was considered favorable regardless of the conditions. Therefore, fixing the “resistance” alleles at the two major QTL C09 and A03b could allow for the development of genotypes possessing a good level of resistance. In addition, since the resistance allele at the C09 QTL was identified very frequently in the panel of hosts evaluated, it may be simpler to incorporate it with other clubroot resistance loci in resistance gene pyramiding strategies. Up to now, the development of resistant varieties has been based on *B. rapa* major genes, including those located on A03 (Kato *et al.*, 2012, 2013; Rahman *et al.*, 2014). However, a combination of major QTL with other minor QTL or with major genes can enhance the durability of clubroot resistance (Tomita *et al.*, 2013).

Darmor-*bzh* is not cultivated today because its low agronomic performance (1.4 t/ha seed yield less than current elite cultivars). However, Darmor was used as progenitor in several breeding schemes for the creation of European oilseed rape elite cultivars. QTL with profiles PF3 (i.e. C03 QTL) and PF4 (i.e. C02 QTL) profiles (Table 7) are good candidates to be combined with C09 and/or A03b. These QTL coming from ‘Yudal’ presented small to moderate effects and were identified under all the N conditions and clubroot isolates evaluated. The C02 QTL also was detected by Manzanares-Dauleux *et al.* (2000) using an isolate classified as pathotype P7, according to Somé *et al.* (1996). C03 also was detected with the two *P. brassicae* isolates in the present study and with three *P. brassicae* isolates in *B. oleracea* (Lee *et al.*, 2016). The QTL with

a PF1 profile presented small effects and were detected as active against either eH or K92-16. As discussed before, this isolate-specificity may reflect a lack of power of detection for small-effects QTL. In general, it is assumed that the suitable number of QTL needed in Marker Assisted Selection (MAS) programs is four, which corresponds to the analyses of around 800 F2 plants (Lecomte *et al.*, 2004). The next steps before using C09, A03b, C02 and C03 QTL in a MAS program will be to reduce their confidence intervals and identify closely linked markers.

It is worth noting that in the current study, some genotypes classified as susceptible became resistant under N constraint. These genotypes were older varieties bred prior to the 1980s and could be used today as “new” sources of resistance adapted to low N-inputs. Evaluation of a more diverse set of germplasm including winter and spring rapeseed varieties with different geographic origins and morphotypes (Gazave *et al.*, 2016) could enable the identification of other sources of clubroot resistance adapted to low-inputs.

V Supplementary data S3: Relationship between plant growth under N1 condition and clubroot development under N1 condition on a subset of 11 HD genotypes from the cross Darmor-bzh x Yudal.

Material and Methods

The experiment was conducted on 11 HD genotypes from the cross Darmor-bzh x Yudal. The HD were selected for their diversity of clubroot resistance modulation by N constraint for eH isolate. This selection was based on the results of the LA_eH_1 and LA-eH_2 experiments. The experiment was performed in a Phytotron and arranged in a split-split-plot design with 3 replicates, each experimental unit consisting in plants. Inoculation was considered as the main plot (with two modalities: inoculated and non-inoculated), nitrogen levels (N1 vs. N8) were considered as sub-plots and the plant genotypes were considered as sub-sub-plots. Sowing was done in April and the test ended 49 days after sowing (das), i.e. 42 days after inoculation (dai). Leaf and root parts were collected, oven dried at 80 °C during 48 hours and dry matter was estimated for non-inoculated plants. The total dry mass (TDM) corresponded to the sum of the Leaf and roots dry matter. Δ TDM was calculated as the difference between the TDM estimated under N8 and the TDM estimated under N1. For inoculated plants, DI was calculated at 42 dai for each genotype, each isolate, each N condition and each replicate. The DI was determined according to the method of Buczacki *et al.* (1975) as modified by Manzanares-Dauleux *et al.* (2000). Δ DI was calculated as the difference between DI estimated under N8 and DI estimated under N1.

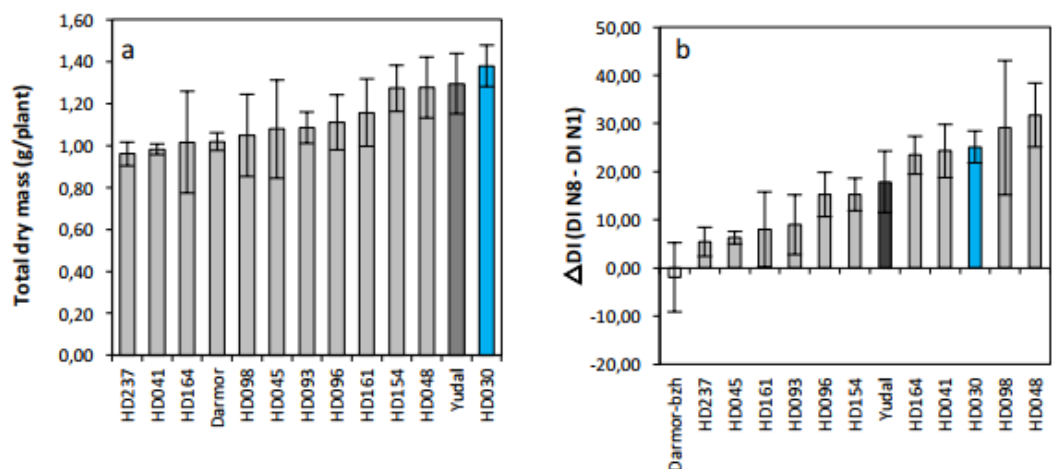


Figure S3: Distribution of (a) total dry mass under N1 supply and (b) rDI (DI N8 – DI N1). The standard errors are shown.

	DI under N1	Δ DI	TDM under N1	Δ TDM
DI under N1	1.00	-0.19	0.11	-0.11
Δ DI	-0.19	1.00	0.12	0.05
TDM under N1	0.11	0.12	1.00	-0.01
Δ TDM	-0.11	0.05	-0.01	1.00

Table S3: Correlation matrix between Total Dry Mass and DI.

The values represent the correlation coefficients calculated using Pearson's method.

Results

Whatever the plant genotype, total biomass values of non-inoculated plants cultivated under N1 conditions were in an interval between about 1 and 1.4 g DW per plant (Figure S3a), suggesting a low variability of plant stature under this nutritional condition. When inoculated with *P. brassicae*, some genotypes such as HD30 showed a high Δ DI between N1 and N8 conditions (Fig S3b), despite the fact that the non-inoculated HD30 plants had the most important dry biomass under low nitrogen condition (Figure S3a). DI and TDM under N1, Δ DI and Δ TDM values were not correlated (Table S3).

Conclusion

Results from this experiment show clearly no correlation between the modulation of the plant growth by nitrogen supply and, on the other side the modulation of the disease rates by nitrogen supply.

VI References

- Arkoun M, Sarda X, Jannin L, Laîné P, Etienne P, Garcia-Mina J-M, Yvin J-C, Ourry A (2012) Hydroponics versus field lysimeter studies of urea, ammonium and nitrate uptake by oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J Exp Bot* 63:5245–5258
- Ballini E, Nguyen TT, Morel J-B (2013) Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. *Rice* 6:32
- Bates D, Maechler M, Bolker B, Walker S (2014) lme4: linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1
- Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc* 57:289–300
- Bouchet A-S, Nesi N, Bissuel C, Bregeon M, Laripe A, Navier H, Ribière N, Orsel M, Grezes-Besset B, Renard M, Laperche A (2014) Genetic control of yield and yield components in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) grown under nitrogen limitation. *Euphytica* 199:183–205
- Bouchet A-S, Laperche A, Bissuel-Belaygue C, Baron C, Morice J, Rousseau-Gueutin M, Dheu JE, George P, Pinochet X, Foubert T, Maes O, Dugué D, Guinot F, Nesi N (2016) Genetic basis of nitrogen use efficiency and yield stability across environments in winter rapeseed. *BMC Genet* 17:131
- Broman KW, Wu H, Sen S', Churchill GA (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889–890
- Brun H, Chevre AM, Fitt BD, Powers S, Besnard AL, Ermel M, Huteau V, Marquer B, Eber F, Renard M, Andrivon D (2010) Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol* 185:285–299
- Buczacki S, Toxopeus H, Mattusch P, Johnston T, Dixon G, Hobolth L (1975) Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: proposals for attempted rationalization through an international approach. *T Brit Mycol Soc* 65:295–303
- Chu M, Song T, Falk KC, Zhang X, Liu X, Chang A, Lahlali R, McGregor L, Gossen BD, Yu F (2014) Fine mapping of Rcr1 and analyses of its effect on transcriptome patterns during infection by *Plasmodiophora brassicae*. *BMC Genom* 15:1166

- Clarke WE, Higgins EE, Plieske J et al (2016) A high-density SNP genotyping array for *Brassica napus* and its ancestral diploid species based on optimised selection of single-locus markers in the allotetraploid genome. *Theor Appl Genet* 129:1887
- de Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T (2005) CARTHAGENE: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* 21:1703–1704
- Delourme R, Falentin C, Fopa Fomeju B, Boillot M, Lassalle G, André I, Duarte J, Gauthier V, Lucante N, Marty A, Pauchon M, Pichon JP, Ribière N, Trotoux G, Blanchard P, Rivière N, Martinant JP, Pauquet J (2013) High-density SNP-based genetic map development and linkage disequilibrium assessment in *Brassica napus* L. *BMC Genom* 14:120
- Dixon GR (2009a) The occurrence and economic impact of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease. *J Plant Growth Regul* 28:194–202
- Dixon GR (2009b) *Plasmodiophora brassicae* in its environment. *J Plant Growth Regul* 28:212–228
- Dordas C (2008) Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture: a review. *Agron Sustain Dev* 28:33–46
- Dumas JBA (1831) Procédés de l'analyse organique. *Annal Chem Phys* 2:198–213
- Elmer P, Spiers T, Wood P (2007) Effects of pre-harvest foliar calcium sprays on fruit calcium levels and brown rot of peaches. *Crop Prot* 26:11–18
- Fagard M, Launay A, Clement G, Courtial J, Dellagi A, Farjad M, Krapp A, Soulie MC, Masclaux-Daubresse C (2014) Nitrogen metabolism meets phytopathology. *J Exp Bot* 65:5643–5656
- Fähling M, Graf H, Siemens J (2003) Pathotype separation of *Plasmodiophora brassicae* by the host plant. *J Phytopathol* 151:425–430
- Gazave E, Tassone EE, Ilut DC, Wingerson M, Datema E, Witsenboer HM, Davis JB, Grant D, Dyer JM, Jenks MA (2016) Population genomic analysis reveals differential evolutionary histories and patterns of diversity across subgenomes and subpopulations of *Brassica napus* L. *Front Plant Sci* 7:525
- Gossen BD, Deora A, Peng G, Hwang S-F, McDonald MR (2014) Effect of environmental parameters on clubroot development and the risk of pathogen spread. *Can J Plant Pathol* 36:37–48
- Hasan MJ, Rahman M (2016) Genetics and molecular mapping of resistance to *Plasmodiophora brassicae* pathotypes 2, 3, 5, 6 and 8 in rutabaga (*Brassica napus* var. *napobrassica*). *Genome* 59:1–11
- Kageyama K, Asano T (2009) Life Cycle of *Plasmodiophora brassicae*. *J Plant Growth Regul* 28:203–211
- Kato T, Hatakeyama K, Fukino N, Matsumoto S (2012) Identification of a clubroot resistance locus conferring resistance to a *Plasmodiophora brassicae* classified into pathotype group 3 in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). *Breeding Sci* 62:282–287
- Kato T, Hatakeyama K, Fukino N, Matsumoto S (2013) Fine mapping of the clubroot resistance gene CRb and development of a useful selectable marker in *Brassica rapa*. *Breed Sci* 63:116–124
- Kuznetsova A, Brockhoff PB, Christensen RHB (2015) Package 'lmerTest'. R package version 2
- Lecomte L, Duffé P, Buret M, Servin B, Hospital F, Causse M (2004) Marker-assisted introgression of five QTLs controlling fruit quality traits into three tomato lines revealed interactions between QTLs and genetic backgrounds. *Theor Appl Genet* 109:658–668
- Lee J, Izzah NK, Choi B-S, Joh HJ, Lee S-C, Perumal S, Seo J, Ahn K, Jo EJ, Choi GJ, Nou I-S, Yu Y, Yang T-J (2016) Genotyping-by-sequencing map permits identification of clubroot resistance QTLs and revision of the reference genome assembly in cabbage (*Brassica oleracea* L.). *DNA Res* 23:29–41
- Lipka AE, Tian F, Wang Q, Peiffer J, Li M, Bradbury PJ, Gore MA, Buckler ES, Zhang Z (2012) GAPIT: genome association and prediction integrated tool. *Bioinformatics* 28:2397–2399

- Lombard V, Delourme R (2001) A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.): construction and integration of three individual maps from DH populations. *Theor Appl Genet* 103:491–507
- Manzanares-Dauleux M, Delourme R, Baron F, Thomas G (2000) Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 101:885–891
- Manzanares-Dauleux M, Delourme R, Glory P, Giboulot A, Thomas G (2003) Mapping QTLs and major resistance genes to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassica napus*. 13th Crucifer Genetics Workshop, UC Davis, March, California, 23–26
- Matsumoto E, Yasui C, Ohi M, Tsukada M (1998) Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Euphytica* 104:79–86
- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* 40:349–379
- Nagaoka T, Doullah MA, Matsumoto S, Kawasaki S, Ishikawa T, Hori H, Okazaki K (2010) Identification of QTLs that control clubroot resistance in *Brassica oleracea* and comparative analysis of clubroot resistance genes between *B. rapa* and *B. oleracea*. *Theor Appl Genet* 120:1335–1346
- Osaki K, Tanaka S, S-i Ito (2008) Pathogenicity of *Plasmodiophora brassicae* populations from small, spheroid, resistant-type clubroot galls on roots of clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*). *J Gen Plant Pathol* 74:242–245
- Piao Z, Ramchiary N, Lim YP (2009) Genetics of clubroot resistance in Brassica species. *J Plant Growth Regul* 28:252–264
- Pryor DE (1940) The effect of some mineral nutrients on the development of clubroot of crucifers. *J Agric Res* 61:149–160
- Rahman H, Peng G, Yu F, Falk KC, Kulkarni M, Selvaraj G (2014) Genetics and breeding for clubroot resistance in Canadian spring canola (*Brassica napus* L.). *Can J Plant Pathol* 36:122–134
- Rocherieux J, Glory P, Giboulot A, Boury S, Barbeyron G, Thomas G, Manzanares-Dauleux MJ (2004) Isolate-specific and broadspectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 108:1555–1563
- Saito M, Kubo N, Matsumoto S, Suwabe K, Tsukada M, Hirai M (2006) Fine mapping of the clubroot resistance gene, *Crr3*, in *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet* 114:81–91
- Sakamoto K, Saito A, Hayashida N, Taguchi G, Matsumoto E (2008) Mapping of isolate-specific QTLs for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Theor Appl Genet* 117:759–767
- Somé A, Manzanares M, Laurens F, Baron F, Thomas G, Rouxel F (1996) Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathol* 45:432–439
- Souza AA, Boscariol RL, Moon DH, Camargo LE, Tsai SM (2000) Effects of *Phaseolus vulgaris* QTL in controlling host-bacteria interactions under two levels of nitrogen fertilization. *Genet Mol Biol* 23:155–161
- Strelkov SE, Hwang S-F, Manolii VP, Cao T, Feindel D (2016) Emergence of new virulence phenotypes of *Plasmodiophora brassicae* on canola (*Brassica napus*) in Alberta, Canada. *Eur J Plant Pathol* 145:517–529
- Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Fujimura M, Nunome T, Fukuoka H, Matsumoto S, Hirai M (2003) Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *Theor Appl Genet* 107:997–1002
- Talukder ZI, McDonald AJ, Price AH (2005) Loci controlling partial resistance to rice blast do not show marked QTL × environment interaction when plant nitrogen status alters disease severity. *New Phytol* 168:455–464

- Tanaka S, Sakamoto Y, Kajima K, Fujieda K, Katumoto K, Nishi Y (1991) Pathogenicity of three isolates of clubroot fungus attacking clubroot-resistant cultivars of Chinese cabbage. *Bull Fac Agric-Yamaguchi Univ (Japan)* 39:113–122
- Tanaka S, Fujiyama S, Shigemori S, Nakayama A, Ito S, Kameya Iwaki M (1998) Pathogenesis of isolates of *Plasmodiophora brassicae* from Japan, 1: race and pathogenesis in clubroot resistant cultivars. *Proceedings of the Association for Plant Protection of Kyushu (Japan)* 44:15–19
- Tomita H, Shimizu M, Doullah MA-u, Fujimoto R, Okazaki K (2013) Accumulation of quantitative trait loci conferring broadspectrum clubroot resistance in *Brassica oleracea*. *Mol Breed* 32:889–900
- VanRaden P (2008) Efficient methods to compute genomic predictions. *J Dairy Sci* 91:4414–4423
- Wagner G, Charton S, Lariagon C, Laperche A, Luga R, Hopkins J, Frendo P, Bouchereau A, Delourme R, Gravot A (2012) Metabotyping: a new approach to investigate rapeseed (*Brassica napus L.*) genetic diversity in the metabolic response to clubroot infection. *Mol Plant Microbe Interact* 25:1478–1491
- Walters DR, Bingham IJ (2007) Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *Ann Appl Biol* 151:307–324
- Werner S, Diederichsen E, Frauen M, Schondelmaier J, Jung C (2008) Genetic mapping of clubroot resistance genes in oilseed rape. *Theor Appl Genet* 116:363–372
- Zhang Z, Ersoz E, Lai C-Q, Todhunter RJ, Tiwari HK, Gore MA, Bradbury PJ, Yu J, Arnett DK, Ordovas JM (2010) Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nat Genet* 42:355–360
- Zhang H, Feng J, Hwang SF, Strelkov S, Falak I, Huang X, Sun R (2015) Mapping of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) resistance in canola (*Brassica napus*). *Plant Pathol* 65:435–440

ARTICLE II: NITROGEN SUPPLY EXERTS A MAJOR/MINOR SWITCH BETWEEN TWO QTL CONTROLLING PLASMODIOPHORA BRASSICAE SPORE CONTENT IN RAPESEED

Y. Aigu¹, A. Laperche¹, J. Mendes¹, C. Lariagon¹, S. Guichard¹, A. Gravot¹, MJ. Manzanares-Dauleux^{1*}

¹IGEPP, AGROCAMPUS OUEST, INRA, Université de Rennes 1, Le Rheu, France

* Corresponding author

I Introduction

Clubroot, caused by the obligate biotrophic soil-borne *Plasmodiophora brassicae*, is a worldwide root disease, affecting *Brassicaceae* species (Dixon, 2009a). The pathogen life cycle is completed in three stages: first primary zoospores infect root hairs and peridermal cells leading to the production of zoosporangia and the release of secondary zoospores. Then, secondary zoospores infect root cortical cells, which initiates the second phase of infection. In this phase typical root gall (club) symptoms develop due to the induction of plant cell hyperplasia and hypertrophy and this allows intracellular proliferation of secondary plasmodia. Finally, plasmodia develop into resting spores of about 3µm (Buczacki & Cadd, 1976), which are released when the clubs decompose (Kageyama & Asano, 2009). Resting spore longevity, up to 10-20 years in infected soils (Wallenhammar, 1996), is a key factor for the steady diffusion of clubroot disease and has paralleled the worldwide development of *Brassica napus* cultivated areas in the last decades.

Agronomic approaches to reduce clubroot incidence include controlling soil pH (Murakami *et al.*, 2002), nitrogen and boron fertilization (Dixon, 2009b), rotations (Hwang *et al.*, 2015), and biological control. However, the use of plant genetic resistance is still considered as the most effective way to manage clubroot disease (Diederichsen *et al.*, 2009). Several genetic factors conferring resistance to *P. brassicae* have been identified in *Brassica napus*, *B. rapa*, *B. oleracea* (recently reviewed in Neik *et al.*, 2017). Many breeding efforts have been focused on qualitative monogenic resistance s, and several research groups have also investigated the potential interest of QTL involved in partial resistance (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000a, 2003, Werner *et al.*, 2008, Tomita *et al.* 2013, Li *et al.* 2016, Yu *et al.* 2017). Recent research highlighted that various abiotic factors, such as flooding and nitrogen fertilization, can modulate the effect of resistance QTL (Gravot *et al.*, 2016; Laperche *et al.*, 2017). This indicates that the effect of quantitative resistance genetic factors can also be optimized through appropriate cropping practices. Nevertheless, regardless of the combinations of management and genetic approaches used, resistance breaking has been increasingly reported in areas of *Brassica* sp. production (Diederichsen *et al.*, 2014; Strelkov *et al.*, 2016). Thus, there is a need to identify new clubroot resistance factors and gain a better understanding of their mode of action to rationalize their use in breeding programs.

Up till now, the screening of clubroot resistance accessions and development of breeding strategies have been mostly based on estimates of disease index (DI), i.e., a phenotypic evaluation which takes into account both the degree of root gall development and loss of functional root system. DI is thus a proxy for the impact of clubroot infection on plant agronomic performance, and a primary criterion for plant breeding. DI can also be used as a gross estimate of the number of resting spores that can be released into the soil. In this regard, genotypes with low DI are

generally assumed to produce negligible amounts of resting spores. However, the two variables are not necessarily tightly correlated. Indeed, Siemens *et al.* (2002) showed that for two given genotypes with a similar DI value, spore content can vary two fold. Furthermore, the pathogen life cycle was shown to complete in small spheroid galls from genotypes considered 'resistant' (Rennie *et al.*, 2013), and also in mutant genotypes defective for a gene involved in the plant cell cycle, which should therefore impair club development (Malinowski *et al.*, 2012). Thus, as 1/ the number of spores released is directly related to the pathogen fitness and may in some way not fully depend on club development, and 2/ as this trait plays an important role in clubroot epidemics and probably in resistance breaking dynamics, then its genetic control may deserve more specific attention.

Hemocytometer methods for counting *P. brassicae* resting spores have been used in few studies to compare responses to clubroot in a series of plant genotypes (Siemens *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 2011). However, the low-throughput nature of this method clearly limited the number of samples quantified, and it was thus rarely used to phenotype clubroot resistance in medium or large-scale assays. This is probably why there have been no reports of quantitative studies on the genetic control of resting spore content in infected roots. Recently, we reported a simple flow cytometer-based method for resting spore quantification in clubroot-infected *Arabidopsis thaliana* roots (Gravot *et al.*, 2016). This method was applied on a few pairs of near-isogenic lines, highlighting that some QTL can affect club development without having an effect on root spore content.

In the present study, we adapted this flow cytometer method to rapidly estimate spore number in a large series of root samples typically used for genetic analyses. This study was conducted using the same root samples as used in Laperche *et al.* (2017). In this work, resistance to clubroot symptom development was examined in a *B. napus* segregating population (from the cross 'Darmor-*bzh*' x 'Yudal') challenged with the eH isolate of *P. brassicae*, under two nitrogen fertilization regimes (N1 and N8 corresponding to 1mM and 8mM nitrate, respectively). This previous study by Laperche *et al.* (2017) highlighted that nitrogen supply exerted moderate changes on the effect of two QTL controlling symptom development, on chromosome C09 (resistance allele from 'Darmor-*bzh*') and on chromosome C02 (resistance allele from 'Yudal'). In the present study, spore content in this segregating population was assessed, with the aims of identifying the plant genetic factors (QTL) involved in the control of *P. brassicae* resting spore production and comparing them to QTL involved in the control of clubroot symptoms (DI), and ii) studying the influence of nitrogen fertilization on the effect of these QTL.

II Material and method

Disease assays under low and high nitrogen supply

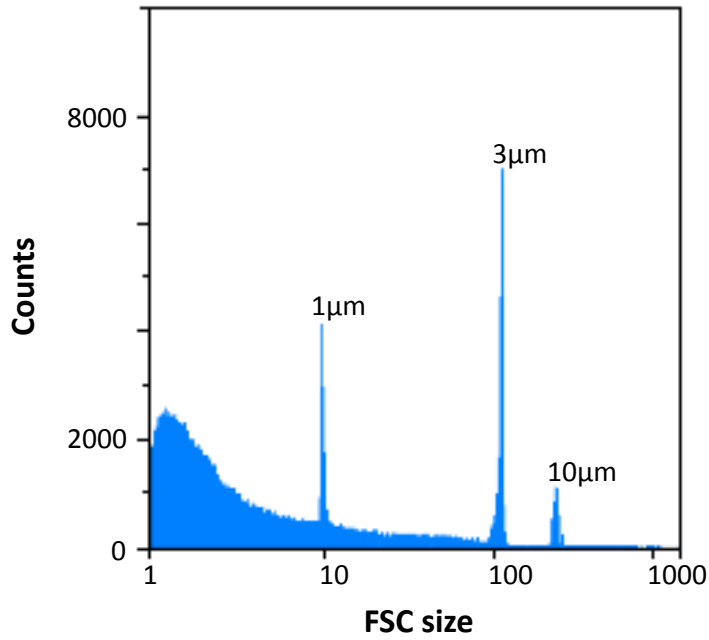
In the present study, infected roots were sampled from a series of clubroot assays performed with 108 rapeseed doubled haploids (DH), detailed in Laperche *et al.* (2017) and below. That study was conducted using the selection isolate eH (Fähling *et al.*, 2003), belonging to pathotype 1, as defined by Somé *et al.* (1996) and inoculations were carried out with spore suspensions (1×10^7 spores/ml) as previously described in Manzanares -Dauleux *et al.* (2000b). Two nutrient solutions were supplied to the plants: (1) a nitrogen-non-limiting nutrient solution (N8) based on half-strength modified Hoagland's solution with 8mM of [KNO₃] and (2) a nitrogen-limited nutrient solution (N1) in which the [KNO₃] concentration was reduced to 1mM and the potassium concentration was readjusted using KCl. The experiment was designed as a split-plot with three replicates. The two nitrogen fertilization conditions (N1 and N8) were considered as main plots and the 108 DH lines were considered as subplots. Additional details of disease assay conditions are described in Laperche *et al.* (2017). A final evaluation of disease severity and root sampling was performed 49 days after inoculation (dai). Root samples, corresponding to each genotype x nitrogen x replicate combination, were frozen at -20°C.

Plant material and genetic map

The 'Darmor-*bzh*' × 'Yudal' genetic map was built using Carthagene software (de Givry *et al.*, 2005), with a population of 356 doubled haploid (DH) lines derived from the 'Darmor-*bzh*' × 'Yudal' cross (Lombard & Delourme, 2001). This progeny was previously genotyped using the Brassica Consortium Infinium genotyping 60 K array (Clarke *et al.*, 2016) and the 8 K SNP Illumina array designed by Delourme *et al.* (2013). A total of 28,000 SNP were identified as polymorphic and represented 3592 unique loci. Nineteen linkage groups were identified, corresponding to the 19 *B. napus* chromosomes. The genetic map covered 2128.2 cM (1117.6 cM for the A genome and 1010.6 cM for the C genome) and corresponded to a marker density of one marker every 0.56 cM.

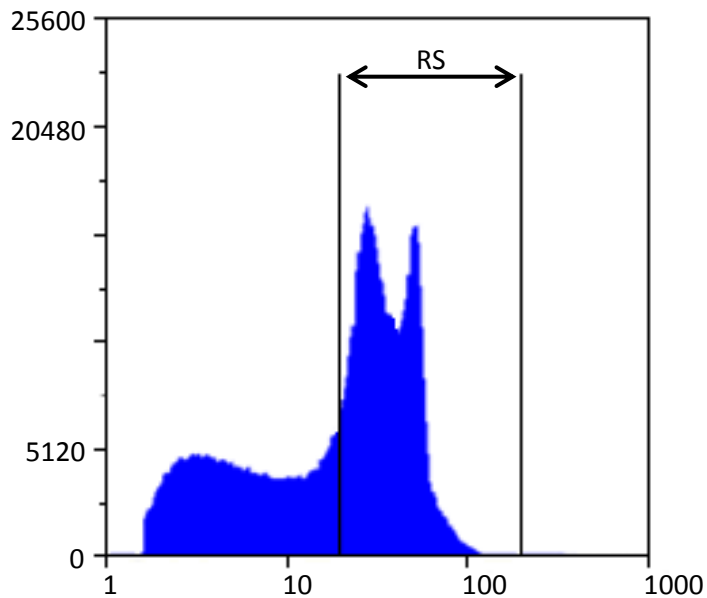
Spore quantification by flow cytometry

Frozen roots were thawed at room temperature and ground using a blender MB1001 (Homeland Housewares, Los Angeles, United States) in deionized water (30 ml for N1 samples and 100 ml for N8 samples). The resulting suspension was then filtered through two sieves (100 and 50 µm diameter pores). The resulting eluate was diluted with deionized water, 200 times for N1 samples and 400 times for N8 samples. Next, particles were counted. The samples were injected in a CyFlow flow cytometer (Sysmex Partec, Görlitz, Germany), equipped with a 20 mW blue laser



Supplementary Figure 1: Visualization of flow cytometer calibration using FloMax software.

1 μm, 3 μm and 10 μm calibration beads were used.



Supplementary Figure 2: Visualization of sample quantification using flow cytometer and FloMax software.

Particle size cutoff was set to count only particles with a FSC between 20 and 200.

488 nm and a Forward-SCatter (FSC) detector to determine particle size. The FSC was calibrated using FloMax (Sysmex Partec) software, using three sizes of calibration beads (Sysmex Partec), 1 μm , 3 μm and 10 μm , and the gain was adjusted to obtain FSC values of 10, 100 and 200, respectively (Supplementary Figure 1). Preliminary analyses had indicated that infected roots typically produced particles with a size distribution of around 3 μm (Supplementary Figure 2), therefore the particle size cutoff was set to count only particles with a FSC between 20 and 200.

This flow cytometry method was used for the building of two standard curves. A master spore suspension was prepared from a root sample with a high resting spore content. Its resting spore concentration was assessed through classical hemocytometer counting (mean of five technical counting replicates using a Malassez double cell). This master suspension was then diluted to produce seven suspensions with concentrations ranging from 25,000 spores.ml⁻¹ to 500,000 spores.ml⁻¹. The dilution process was replicated three times. For each point of dilution, particles were counted with flow cytometry, using two injection speed parameters; the first with a speed parameter of three (arbitrary units), for maximal reliability in counting, and the second with a speed parameter of 20, for exploring the possibility of increasing the rate of analyses. At speed 3 and 20, one sample was analyzed each 150 and 30 seconds, respectively. According to the standard curves, two equations (given in the results section) were used to predict resting spores quantified by flow cytometry. The resting spore contents are further expressed as a number of spores per plant.

Statistical analyses

To normalized resting spore distribution, the data were transformed using Log². Statistical analyses were carried out with R software (RCoreTeam 2013). Pearson's correlations were estimated between the resting spore number per plant for each N condition and each replicate for the DY progeny. The mixed linear model presented in Eq.1 was used to analyze the Log2(Resting Spore content) (Log2RS) data. The lme4 package (Bates *et al.*, 2014) and lmerTest package (Kuznetsova *et al.*, 2015) were used to test both random and fixed effects:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + N_j + R_k + GN_{ij} + e_{ijk} \quad (\text{Eq. 1})$$

where Y_{ijk} represents the Log2RS value of Genotype i , estimated under the N condition j , and in the replication k , μ stands for the population mean, e_{ijk} stands for the residual, GN_{ij} stands for the Genotype \times Nitrogen condition interaction. G and GN effects were declared as random, the other effects were declared as fixed.

The mixed linear model was also used to estimate broad-sense heritability as defined by Holland *et al.* (2003), and presented in Eq.2:

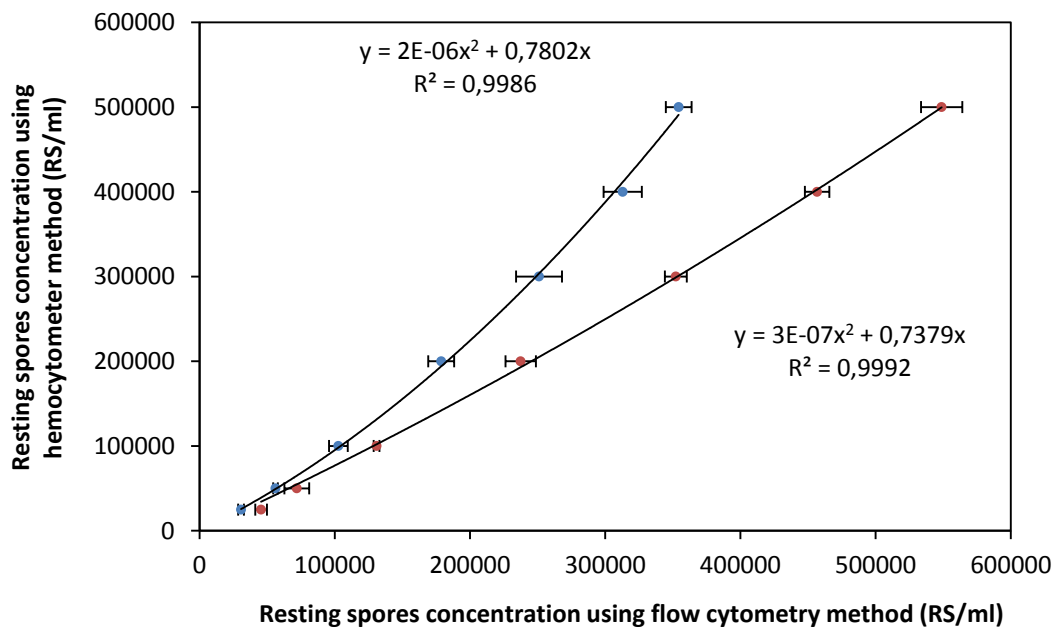


Figure 1: Standard curve of resting spores quantification.

A hemocytometer counting method was considered as the reference. Two injection speeds were tested: speed 3 is shown in red and speed 20 is in blue.

$$H^2 = \frac{\sigma^2_G}{\sigma^2_G + \frac{\sigma^2_{GxN}}{n} + \frac{\sigma^2_e}{n+r}} \quad (\text{Eq. 2})$$

where n represented the number of nitrogen conditions and r represented the number of replicates.

Linkage analyses

A multiple QTL mapping model was used (R/qtl package, Broman *et al.*, 2003) to analyze the data. The phenotypic data used for QTL detection were corrected using the mixed linear model (Eq. 1). For each DH line, traits were estimated according to the model as follows: (1) resting spore content based on the linear mixed model estimate under N1 and N8, and (2) genotype estimates G and (3) GxN estimates ($GxN1$ and $GxN8$). QTL analyses methods were described in Laperche *et al.* (2017). QTL detection was performed using composite interval mapping methods. LOD scores and R^2 were calculated using `fitqtl` function of R/qtl. Confidence intervals were defined using a LOD drop-off of one unit.

III Results

Resting spore quantification with flow cytometry

Flow cytometer-based resting spore quantification was tested using two speed parameters, 3 and 20. At 3, particle concentrations measured using flow cytometry were slightly higher than expected spore concentrations, with an apparent plateau effect for the highest concentrations, especially at speed 20 (Figure 1). To correct this phenomenon, values obtained with flow cytometry were adjusted to fit those obtained by cell counting using the following binomial equation:

$$\text{resting spore.ml}^{-1} (\text{hemocytometer}) = 3 \times 10^{-7} \text{ resting spore.ml}^{-1} (\text{Flow cytometry}) + 0.7379 \text{ resting spore.ml}^{-1} (\text{Flow cytometry}); R^2 = 0.99 \quad (\text{Eq. 3})$$

Influence of nitrogen input and plant genotype on resting spore content in roots

Resting spores were quantified within the DY progeny in both N1 and N8 conditions. The number of spores per plant in 'Darmor-*bzh*' and 'Yudal', the two parents of the DY progeny, was 2.7×10^8 and 4.4×10^8 under N8, and 5.3×10^7 and 1.9×10^7 under N1, respectively. In the DY progeny, an overall reduction in spore content was also observed under N1 (mean concentration of 1.1×10^8 resting spores per plant) compared to the N8 treatment (1.5×10^9 resting spores per plant). This more than 1/10 diminution of mean spore content under low nitrogen was paralleled to 1/4 reduction of the biomass of inoculated roots in the DY progeny (0.6 g per plant under low nitrogen, and 2.5 g

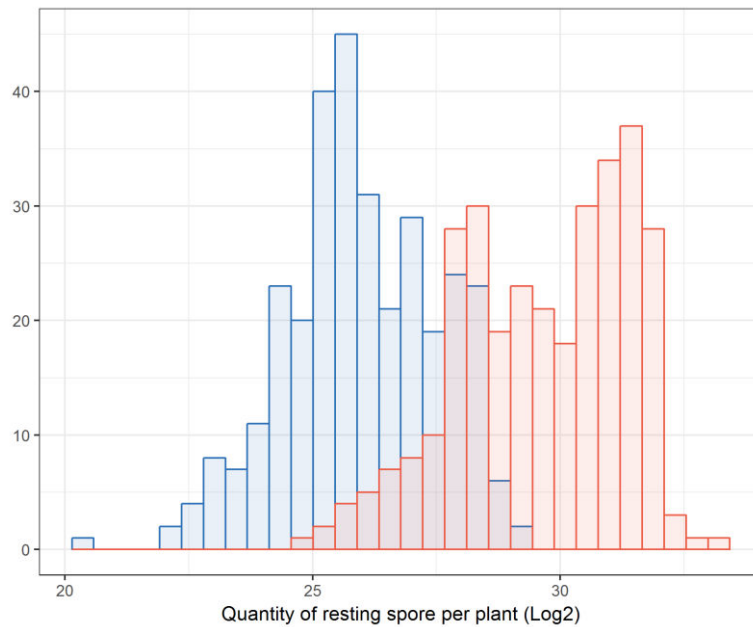
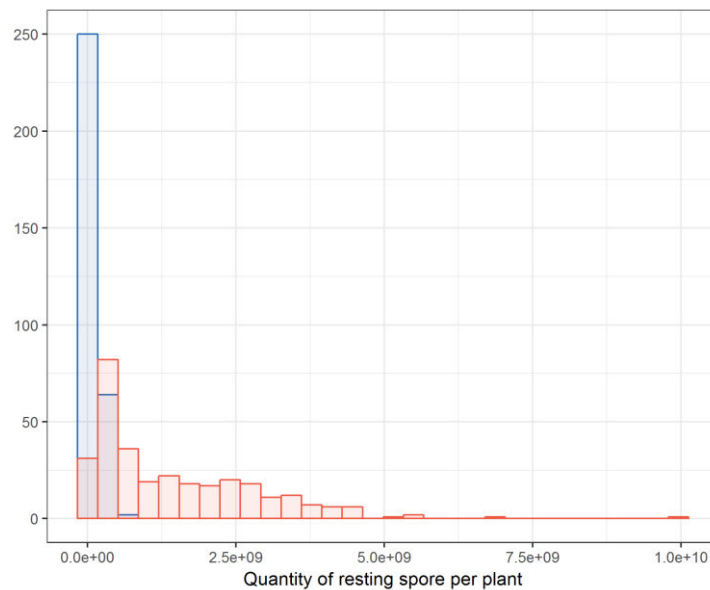


Figure 2: Distribution of resting spore content (Log2 per plant) for ‘Darmor-*bzh*’ x ‘Yudal’ progeny under low- and high-nitrogen conditions.

The ‘Darmor-*bzh*’ x ‘Yudal’ progeny consisted of 108 doubled haploid plants. High-nitrogen conditions (8mM) are shown in red and low-nitrogen conditions (1mM) are in blue.



Supplementary Figure 3: Distribution of resting spore content of the ‘Darmor-*bzh*’ x ‘Yudal’ progeny under low- and high-nitrogen conditions.

‘Darmor-*bzh*’ x ‘Yudal’ progeny consisted of 108 doubled haploid plants. High-nitrogen conditions (8mM) are shown in red and low-nitrogen conditions (1mM) are in blue.

under high N8). Log^2 transformation of the resting spores dataset (Log2RS) (Figure 2, the distribution of untransformed data is also shown in Supplementary Figure 3), produced Gaussian distributions and was used for subsequent statistical analyses. The Log2RS distribution of resting spore estimates among the DY progeny was continuous under both N1 and N8 conditions. Thus, altogether the results suggested quantitative genetic control of resting spore content. Resting spore contents under N1 and N8 were correlated ($R^2 = 0.60$). For the DY progeny there were highly significant effects of genotype (G), nitrogen supply (N) and $G \times N$ interaction. The genotypic effect explained 38.6% of the global variation observed and the $G \times N$ effect 28.3%. The heritability of the trait was high (68.2%).

Influence of nitrogen on QTL controlling resting spore content

QTL detection was first performed using resting spore content based on the linear mixed model estimates for each nitrogen condition. QTL were named according to the chromosome on which they were detected. When two QTL were detected on the same chromosome but were located at two different positions, a letter was added to the QTL name to distinguish the two positions (Table I). Four QTL controlling resting spore content were identified in the DY lines. Two major QTL associated with resting spores were detected under both nitrogen conditions on chromosomes C09 and C02. QTL C09a was the main QTL detected under N8 ($R^2 = 72.8\%$, favorable allele diminishing resting spore production from 'Darmor-*bzh*') and its effect was lower under N1 ($R^2 = 30.8\%$) (Table I). QTL C02 was the main QTL detected under N1 ($R^2 = 52\%$, favorable allele diminishing resting spore production from 'Yudal') and its effect was dramatically lower under N8 ($R^2 = 9.6\%$) (Figure 3). A positive epistasis effect was observed between QTL C02 and QTL C09a under both nitrogen supplies ($R^2 = 14.6\%$ under N1; $R^2 = 5.8\%$ under N8). One QTL on chromosome A07, with the smallest effect, was specifically detected under N8 ($R^2 = 4.8\%$, favorable allele 'Darmor-*bzh*').

QTL analyses were then carried out using a series of additional variables (G , $G \times N1$ and $G \times N8$) to gain more detail on the genetic control of resting spore content. QTL analysis using the genotypic estimate G (i.e. a genotype effect independently of the nitrogen condition), detected the QTL C02 ($R^2 = 32.7\%$, favorable allele from 'Yudal') and C09a ($R^2 = 58.5\%$, favorable allele from 'Darmor-*bzh*'), thus validating the important roles played by these two loci in resting spore production. A positive epistasis effect was detected between QTL C02 and QTL C09 ($R^2 = 11.7\%$). To target the genomic regions involved in modulating resting spore production as a function of nitrogen supply ($G \times N$ interaction), we considered either the $G \times N1$ or $G \times N8$ interactive terms in the QTL analyses. Using the $G \times N1$ estimates, two QTL were detected, QTL C02 ($R^2 = 48.3\%$) and another distinct QTL on chromosome C09, C09b ($R^2 = 16.9\%$). A positive epistasis effect was

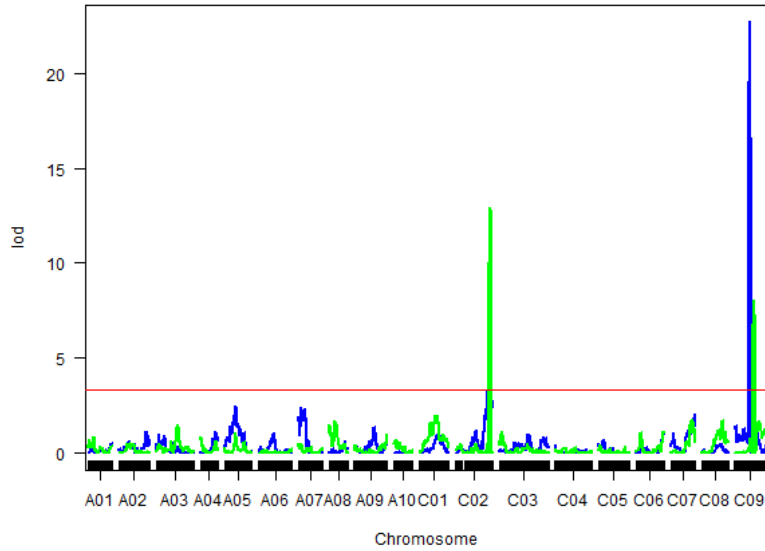


Figure 3: LOD scores for SNPs using resting spore content under high- and low-nitrogen.

The high-nitrogen condition is shown in blue. The low-nitrogen condition is in green.

Table I: QTL detection results for linkage analyses performed on resting spore values obtained following inoculation with the *Plasmodiophora brassicae* eH isolate.

QTL name	Trait	Chromosome	Position (cM)	Closest marker	Lod	CI (cM)	R ² (%)	Favorable allele
C02	RS under N1	C02	131.5	scaffoldv4_908_152987	20.4	131 - 135	52.0	Yudal
C09a		C09	57.8	Bn-C9-p18013886	14.1	57.5 - 59.3	30.8	Darmor- <i>bzh</i>
C02xC09a					7.7		14.6	
A07	RS under N8	A07	23.5	Bn-A07-p10635069	4.4	13.1 - 28.6	4.8	Darmor- <i>bzh</i>
C02		C02	133	scaffoldv4_908_84377	8.1	130.8 - 136	9.6	Yudal
C09a		C09	59	scaffoldv4_155_697885	33.2	58.7 - 59.3	72.8	Darmor- <i>bzh</i>
C02xC09a					5.3		5.8	
C02	G- estimate	C02	133	scaffoldv4_908_84377	18.5	132.2 - 134	32.7	Yudal
C09a		C09	59	scaffoldv4_155_697885	26.8	57.5 - 59.3	58.5	Darmor- <i>bzh</i>
C02xC09a					8.4		11.7	
C02	G x N1- estimate	C02	131.8	scaffoldv4_4698_8192	16.8	129.4 - 133	48.3	Yudal
C09b		C09	51	scaffoldv4_390_148794	7.3	48 - 52.9	16.9	Yudal
C02xC09b					5.2		11.5	
A07	G x N8- estimate	A07	28	Bn-A02-p551481	3.4	20.4 - 28.6	4.9	Darmor- <i>bzh</i>
C09a		C09	56.9	scaffoldv4_776_95635	25.8	56.6 - 59	64.8	Darmor- <i>bzh</i>

found between QTL C02 and QTL C09b using $G \times N1$ ($R^2 = 11.5\%$). Using the $G \times N8$ estimates, two QTL were identified, QTL A07 ($R^2 = 4.9\%$) and QTL C09a ($R^2 = 64.8\%$).

The effects of the two main QTL with an effect on resting spores, QTL C09a and QTL C02, were represented on a box plot (Figure 4). The resting spore content was clearly lower under N1 compared with the N8 condition, irrespective of the presence or absence of each major QTL. The favorable allele at QTL C09a conferred a strong reduction in resting spore content under N8 and a moderate reduction under N1 compared to the genotype with an unfavorable allele at QTL C09a and C02. In contrast, the favorable allele at QTL C02 led to a moderate reduction in resting spore content under N8 and a strong reduction under N1. The combination of favorable alleles at both QTL slightly decreased the resting spore content compared to the single presence of either of the two QTL, regardless of nitrogen supply.

Comparison of the genetic factors controlling resting spore content and DI

To investigate the relationship between genetic factors implicated in the control of both resting spore production and symptom severity, the results obtained in this study were compared with those previously obtained by Laperche *et al.* (2017). Both studies were assessed on the same genotypes using the same isolate eH. Comparison between resting spore content and DI highlighted significant correlations ($R^2=0.70$ under N1 and $R^2=0.74$ under N8). The majority of DY genotypes harbored similar DI values under both nitrogen conditions, whereas the resting spore content was lower for all the genotypes under low-nitrogen conditions. Furthermore, under both nitrogen levels, some genotypes with low symptom severity contained a high resting spore quantity (Supplementary Figure 4). Genotype effect (G) explained a smaller proportion of the variance (38.6%) for resting spore content compared to G effect previously reported for DI value (60.3%). In contrast, the interactive effect, $G \times N$, explained a higher proportion of the variance (28.3%) for resting spore content, compared to DI values (8.8%).

All four QTL detected using resting spore values (QTL C09a, QTL C09b, QTL C02 and QTL A07) had been previously detected using DI, and favorable alleles at each locus were consistent between the two studies. In the previous study reported in Laperche *et al.* (2017) on DI, the effect of QTL C09a was major under both N8 and N1 ($R^2=86.8\%$ and $R^2=66.5\%$, respectively) while the effect of QTL C02 was modulated by nitrogen input from a low effect under N8 ($R^2=1.8\%$) to a moderate effect under N1 ($R^2=13\%$). In contrast, in the present study, nitrogen levels had a more pronounced influence on the respective effects of QTL controlling spore content. Indeed, the effect of QTL C09a was found to range from a major effect under N8 ($R^2=72.8\%$) to a moderate

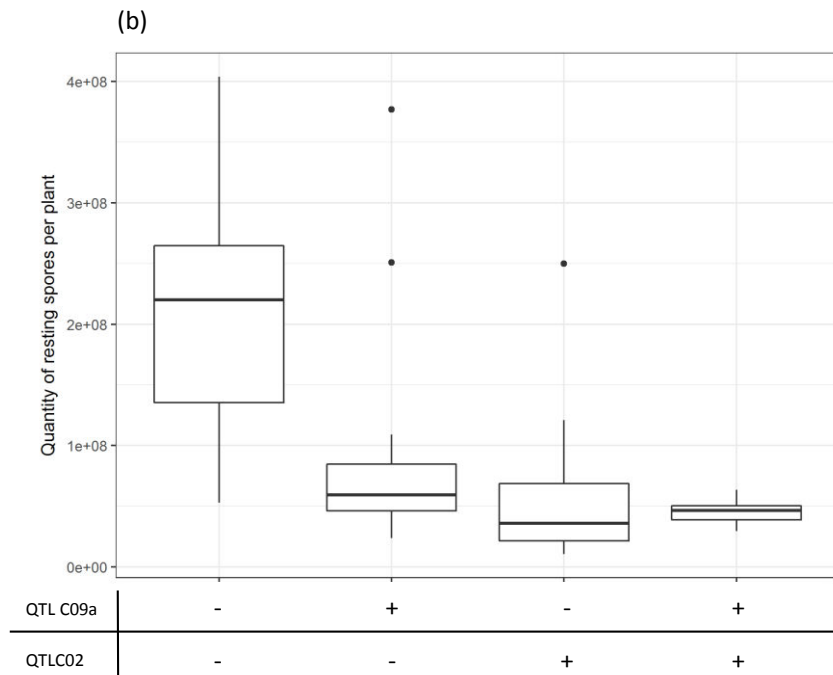
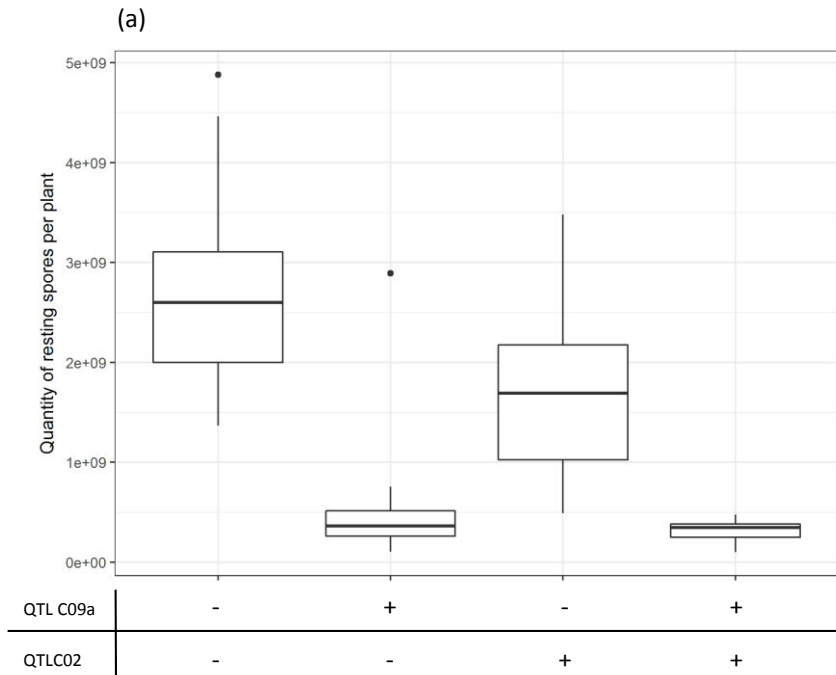


Figure 4: Effect of QTL C09a and QTL C02 on the resting spore content per plant. High-nitrogen (8mM) and low-nitrogen conditions (1mM) are shown in (a) and (b), respectively. Alleles at the SNPs used for genetic analysis included in the confidence interval of QTL C09a and QTL C02 were taken into account.

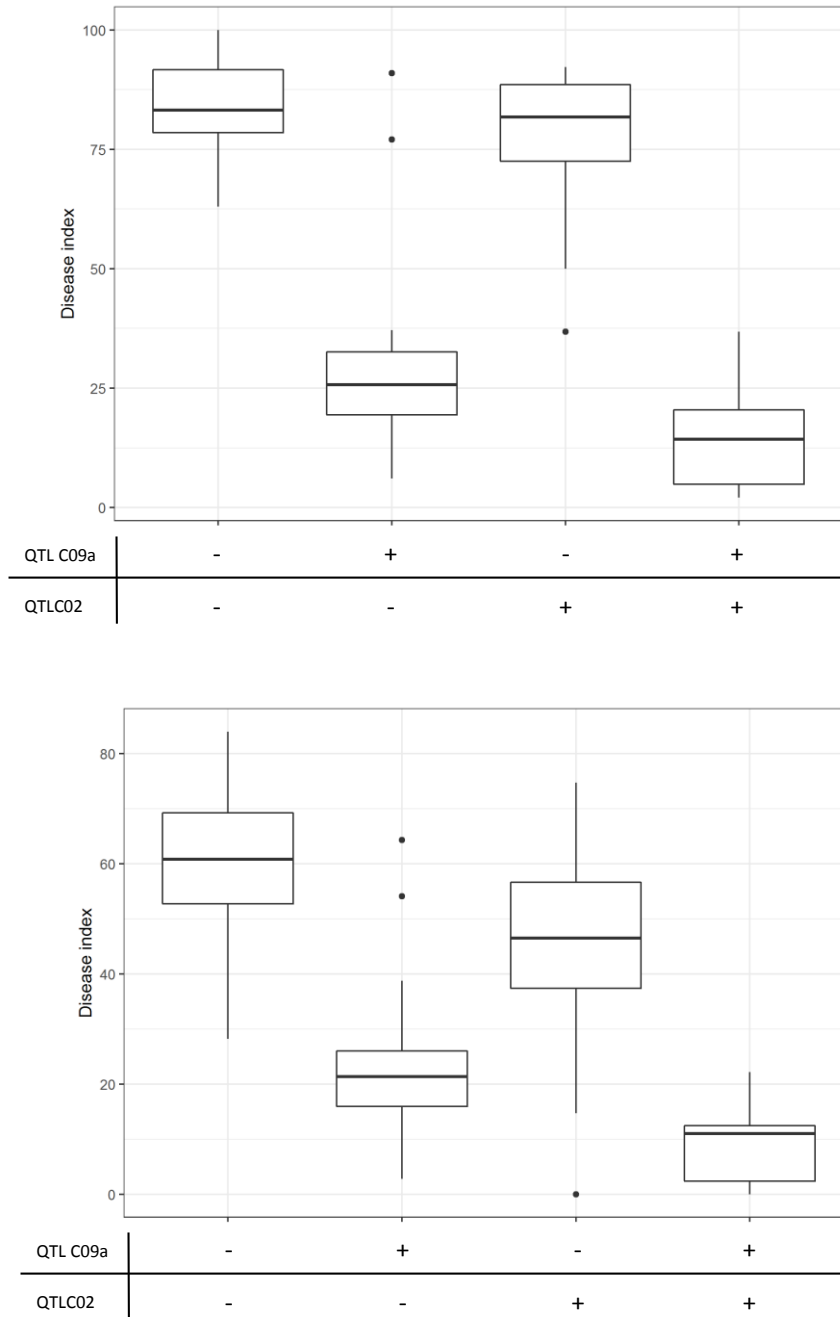
effect under N1 ($R^2=30.8\%$), while the effect of QTL C02 was moderate under N8 ($R^2=9.6\%$) and major under N1 ($R^2=52\%$).

IV Discussion

A series of earlier studies reported that, for some genotypes carrying high levels of resistance to clubroot symptom development, inoculated roots nevertheless contained high levels of *P. brassicae* resting spores (Siemens *et al.*, 2002; Hwang *et al.*, 2013). More generally, clubroot symptoms related to DI values were not tightly correlated with resting spore content. The amount of spores released in cultivated soil is a key component of epidemic processes, and in resistant genotypes, it is a key component of resistance breakdown. Thus, it is important to broaden our view from a focus on symptom development and address the capacity of *P. brassicae* to produce and release resting spores into the soil. However, methodological difficulties associated to the quantification of resting spore content in large numbers of samples have been yet a major limitation to the use of this criterion for genetic analyses.

In the present study, an accurate and high-throughput flow cytometry-based method was developed, suitable for quantification of *P. brassicae* resting spores in large numbers of *B. napus* root samples. This approach had been previously used to quantify resting spores in a small series of *A. thaliana* samples (Gravot *et al.*, 2016). Here the method was adapted to improve analytic throughput. The small bias in resting spore quantification was easily correctable using a standard curve. To take small variations into account, that may affect the technical performances of the flow cytometer over time, performing standard curves at regular intervals between sample series is recommended. By shortening the analytic time for resting spore quantification, compared to hemocytometer counting, a larger number of samples could be analyzed. QTL analysis using resting spore content as a quantitative variable can thus be achieved.

The roots of 'Darmor-*bzh*', a genotype previously reported to be partially resistant to symptom development when challenged with isolate eH (DI=30 in Laperche *et al.*, 2017), nevertheless contained high levels of resting spores under high nitrogen (2.7×10^8 spores per plant). Similar results were observed by Siemens *et al.* (2002), using the resistant *A. thaliana* ecotype Tsu-0 (DI < 20 and resting spores per gram of gall > 1×10^6), and also by Hwang *et al.* (2013) using a resistant cultivar of canola (resting spores per gram of gall > 5×10^9). These results were also consistent with the presence of resting spores in spheroid galls, although described as resistance structures (Rennie *et al.*, 2013). Hwang *et al.* (2013) showed that repeated cycles of culture with genotypes described as resistant to clubroot only slightly reduced the quantity of resting spores in soils.



Supplementary Figure 4: Effect of QTL C09a and QTL C02 on the disease index.

High-nitrogen (8mM) and low-nitrogen conditions (1mM) are presented in (a) and (b), respectively. The alleles at the SNPs used for genetic analysis included in the confidence interval of QTL C09a and QTL C02 were taken into account.

Breeding efforts to develop clubroot resistant varieties based on the evaluation of club symptoms have clearly gained some success in giving solutions to limit the agronomic impact of clubroot on *Brassica* crops. However, breeding and cropping strategies may also benefit from considering the genetic factors associated with the control of resting spore density in infected roots, and the possible influence of agronomical practices on this trait.

Our findings also highlighted the overall similarity between the genetic architecture controlling clubroot symptom development and resting spore production. Although this conclusion may appear intuitively obvious, contradictory results were reported for wheat resistance to the fungus *Zymoseptoria tritici*, where QTL controlling pathogen reproduction were not associated with the control of symptom development (Stewart *et al.*, 2017). In addition, although C02 and C09a were both associated with the control of both club development and resting spore production, their respective effect on resting spore production was influenced by nitrogen at a much higher level than club development. Thus, a “seesaw” effect was observed between the relative contributions of these QTL depending on the nitrogen supply (Figure 3). The QTL C09a has a major effect on spore production under high nitrogen supply, but seems to lose most of its efficiency in a low nitrogen environment. In contrast, the QTL C02 is clearly a major factor under low nitrogen supply and appears to be almost dampened under high nitrogen supply. In the context of low input agrosystems, QTL C02 becomes the major QTL to reduce *P. brassicae* inoculum.

Under low-nitrogen conditions, a significant reduction in resting spore content was observed compared to high-nitrogen conditions, regardless of genotypes. The negative impact of low-nitrogen conditions on resting spores was remarkably significant, with more than 10 times less resting spores than under high-nitrogen conditions. This one-order magnitude contrast has to be compared with the fact that the total root biomass was only reduced by a factor 4 in the progeny. This suggests that the reduction of the total spore number per plant was not only a result from a reduction of root biomass, but also resulted from an additional influence of nitrogen input on root spore density in infected cells and tissues. This conclusion was consistent with the fact that under N8 condition, the mean concentration of spores per g of fresh roots (in the whole set of genotypes) was found 3.7 fold higher than under N1 condition. Thus, the nitrogen influence on spore production seems to rely both on its impact on spore concentration in tissues, and on its influence on the root and club biomass. Additional studies are now required to assess a possible additional effect of nitrogen supply on resting spore infectivity. Regardless, this fertilization effect on spore production is relatively larger than that exerted on symptom development (a mean DI of 72.0 under N8 dropped to a mean DI of 56.8 under N1, in Laperche *et al.*, 2017). In addition, this drop was linked to a large decrease in DI in a few genotypes harboring QTL C02 and/or QTL C09a, whereas the DI of most genotypes was similar under both nitrogen conditions. From a field-scale clubroot control

perspective, our results may suggest that nitrate over-fertilization may contribute to a pronounced stimulation of spore production and clubroot spreading across years. However, genetic factors remained essential to limit resting spore production (maximum resting spore content in root plant under N1 = 5.8×10^8 and minimum under N8 = 2.9×10^7).

In conclusion, the results presented in this study and previously in Laperche *et al.*, (2017) highlight how nitrogen fertilization can modulate the effect of genetic factors controlling symptom development and spore production. This brings new perspectives to an emerging breeding context oriented toward durability of clubroot control, and a need to develop combined genetic and cropping approaches for maintaining both low DI and resting spores.

V References

- Bates D., Maechler M., Bolker B., Walker S. (2014) lme4: Linear mixed-effects models using Eigen and S4. R package version 1
- Broman K.W., Wu H., Sen S., Churchill G.A. (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19:889–890.
- Buczacki S.T., Cadd S.E. (1976) Size distribution of the clubroot organism, *Plasmodiophora brassicae*. *Transactions of the British Mycological Society* 67:133–136.
- Clarke W.E., Higgins E.E., Plieske J., Wieseke R., Sidebottom C., Khedikar Y., Batley J., Edwards D., Meng J., Li R. (2016) A high-density SNP genotyping array for *Brassica napus* and its ancestral diploid species based on optimised selection of single-locus markers in the allotetraploid genome. *Theoretical and applied genetics* 129:1887–1899.
- Delourme R., Falentin C., Fomeju B.F., Boillot M., Lassalle G., André I., Duarte J., Gauthier V., Lucante N., Marty A., Pauchon M., Pichon J.-P., Ribièrè N., Trotoux G., Blanchard P., Rivière N., Martinant J.-P., Pauquet J. (2013) High-density SNP-based genetic map development and linkage disequilibrium assessment in *Brassica napus* L. *BMC genomics* 14:120.
- Diederichsen E., Frauen M., Linders E.G.A., Hatakeyama K., Hirai M. (2009) Status and Perspectives of Clubroot Resistance Breeding in Crucifer Crops. *Journal of plant growth regulation* 28:265–281.
- Diederichsen E., Frauen M., Ludwig-Müller J. (2014) Clubroot disease management challenges from a German perspective. *Canadian journal of plant pathology* 36:85–98.
- Dixon G.R. (2009a) The Occurrence and Economic Impact of *Plasmodiophora brassicae* and Clubroot Disease. *Journal of plant growth regulation* 28:194–202.
- Dixon G.R. (2009b) *Plasmodiophora brassicae* in its Environment. *Journal of Plant Growth Regulation* 28: 212–228.
- Fähling M., Graf H., Siemens J. (2003) Pathotype Separation of *Plasmodiophora brassicae* by the Host Plant. *Journal of Phytopathology* 151:425–430.
- de Givry S., Bouchez M., Chabrier P., Milan D., Schiex T. (2005) Carhta Gene: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics* 21:1703–1704.
- Gravot A., Lemarié S., Richard G., Lime T., Lariagon C., Manzanares-Dauleux M.J. (2016) Flooding affects the development of *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis* roots during the secondary phase of infection. *Plant pathology* 65:1153–1160.
- Hasan M.J., Rahman H. (2016) Genetics and molecular mapping of resistance to *Plasmodiophora brassicae* pathotypes 2, 3, 5, 6, and 8 in rutabaga (*Brassica napus* var. *napobrassica*). *Genome / National Research Council Canada* 59:805–815.

- Holland J.B., Nyquist W.E., Cervantes-Martinez C.T. (2003) Estimating and interpreting heritability for plant breeding: an update. *Plant Breeding Review* 22:9-112.
- Huang Z., Peng G., Liu X.J., Deora A., Falk K.C., Gossen B.D., McDonald M.R., Yu F.Q. (2017) Fine Mapping of a Clubroot Resistance Gene in Chinese Cabbage Using SNP Markers Identified from Bulked Segregant RNA Sequencing. *Frontiers in Plant Science* 8:1448.
- Hwang S.F., Ahmed H.U., Zhou Q., Rashid A., Strelkov S.E., Gossen B.D., Peng G., Turnbull G.D. (2013) Effect of susceptible and resistant canola plants on *Plasmodiophora brassicae* resting spore populations in the soil. *Plant pathology* 62:404–412.
- Hwang S.F., Ahmed H.U., Zhou Q., Turnbull G.D., Strelkov S.E., Gossen B.D., Peng G. (2015) Effect of host and non-host crops on *Plasmodiophora brassicae* resting spore concentrations and clubroot of canola. *Plant pathology* 64:1198–1206.
- Kageyama K., Asano T. (2009) Life Cycle of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of plant growth regulation* 28:203–211.
- Kuznetsova A., Brockhoff P.B., Christensen R.H.B. (2015) Package “lmerTest.” R package version 2.
- Laperche A., Aigu Y., Jubault M., Ollier M., Guichard S., Glory P., Strelkov S.E., Gravot A., Manzanares-Dauleux M.J. (2017) Clubroot resistance QTL are modulated by nitrogen input in *Brassica napus*. *TAG Theoretical and applied genetics* 130:669–684.
- Lee J., Izzah N.K., Choi B.-S., Joh H.J., Lee S.-C., Perumal S., Seo J., Ahn K., Jo E.J., Choi G.J., Nou I.-S., Yu Y., Yang T.-J. (2016) Genotyping-by-sequencing map permits identification of clubroot resistance QTLs and revision of the reference genome assembly in cabbage (*Brassica oleracea* L.). *DNA research* 23:29–41.
- Li L., Luo Y., Chen B., Xu K., Zhang F., Li H., Huang Q., Xiao X., Zhang T., Hu J., Li F., Wu X. (2016) A Genome-Wide Association Study Reveals New Loci for Resistance to Clubroot Disease in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science* 7:1483.
- Lombard V., Delourme R. (2001) A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.): construction and integration of three individual maps from DH populations. *Theoretical and applied genetics* 103:491–507.
- Malinowski R., Smith J.A., Fleming A.J., Scholes J.D., Rolfe S.A. (2012) Gall formation in clubroot-infected *Arabidopsis* results from an increase in existing meristematic activities of the host but is not essential for the completion of the pathogen life cycle. *The Plant journal* 71:226–238.
- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Baron F., Thomas G. (2000a) Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theoretical and applied genetics* 101:885–891.
- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Glory P., Giboulot A., Thomas G. (2003) Mapping QTLs and major resistance genes to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassica napus*. In: 13th Crucifer Genetics Workshop, UC Davis, California, March.pp 23–26.
- Manzanares-Dauleux M.J., Divaret I., Baron F., Thomas G. (2000b) Evaluation of French *Brassica oleracea* landraces for resistance to *Plasmodiophora brassicae*. *Euphytica* 113:211.
- Murakami H., Tsushima S., Kuroyanagi Y., Shishido Y. (2002) Reduction of resting spore density of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease severity by liming. *Soil science and plant nutrition* 48:685–691.
- Nagaoka T., Doullah M.A.U., Matsumoto S., Kawasaki S., Ishikawa T., Hori H., Okazaki K. (2010) Identification of QTLs that control clubroot resistance in *Brassica oleracea* and comparative analysis of clubroot resistance genes between *B. rapa* and *B. oleracea*. *Theoretical and applied genetics* 120:1335–1346.
- Neik T.X., Barbetti M.J. and Batley J. (2017) Current Status and Challenges in Identifying Disease Resistance Genes in *Brassica napus*. *Frontiers in Plant Science* 8:1788.

- Rennie D.C., Manolii V.P., Plishka M., Strelkov S.E. (2013) Histological analysis of spindle and spheroid root galls caused by *Plasmodiophora brassicae*. European journal of plant pathology 135:771–781.
- Rocherieux J., Glory P., Giboulot A., Boury S., Barbeyron G., Thomas G., Manzanares-Dauleux M.J. (2004) Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. Theoretical and applied genetics 108:1555–1563.
- Saito M., Kubo N., Matsumoto S., Suwabe K., Tsukada M., Hirai M. (2006) Fine mapping of the clubroot resistance gene, *Crr3*, in *Brassica rapa*. Theoretical and applied genetics 114:81–91.
- Sakamoto K., Saito A., Hayashida N., Taguchi G., Matsumoto E. (2008) Mapping of isolate-specific QTLs for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Theoretical and applied genetics 117:759–767.
- Sharma K., Gossen B.D., McDonald M.R. (2011) Effect of temperature on cortical infection by *Plasmodiophora brassicae* and clubroot severity. Phytopathology 101:1424–1432.
- Siemens J., Nagel M., Ludwig-Müller J., Sacristán M.D. (2002) The Interaction of *Plasmodiophora brassicae* and *Arabidopsis thaliana*: Parameters for Disease Quantification and Screening of Mutant Lines. Journal of Phytopathology 150:592–605.
- Somé A., Manzanares M.J., Laurens F., Baron F., Thomas G., Rouxel F. (1996) Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. Plant pathology 45:432–439.
- Stewart E.L., Croll D., Lendenmann M.H., Sanchez-Vallet A., Hartmann F.E., Palma-Guerrero J., Ma X., McDonald B. (2016) QTL mapping reveals complex genetic architecture of quantitative virulence in the wheat pathogen *Zymoseptoria tritici*. Molecular Plant Pathology. doi: 10.1111/mpp.12515
- Strelkov S.E., Hwang S.-F., Manolii V.P., Cao T., Feindel D. (2016) Emergence of new virulence phenotypes of *Plasmodiophora brassicae* on canola (*Brassica napus*) in Alberta, Canada. European journal of plant pathology 145:517–529.
- Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Matsumoto S., Hirai M. (2003) Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. Theoretical and applied genetics 107:997–1002.
- Tomita H., Shimizu M., Doullah M.A., Fujimoto R., Okazaki K. (2013) Accumulation of quantitative trait loci conferring broad-spectrum clubroot resistance in *Brassica oleracea*. Mol Breeding 32:889-900.
- Wallenhammar A.-C. (1996) Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. Plant pathology 45:710–719.
- Werner S., Diederichsen E., Frauen M., Schondelmaier J., Jung C. (2008) Genetic mapping of clubroot resistance genes in oilseed rape. Theoretical and applied genetics 116:363–372.
- Yu F.Q., Zhang X.G., Peng G., Falk K.C., Strelkov S.E., Gossen B.D. (2017) Genotyping-by-sequencing reveals three QTL for clubroot resistance to six pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica rapa*. Scientific Reports 7:4516.
- Zhang H., Feng J., Hwang S.-F., Strelkov S.E., Falak I., Huang X., Sun R. (2015) Mapping of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) resistance in canola (*Brassica napus*). Plant pathology 65:435–440.

**ARTICLE III: IDENTIFICATION OF WINTER AND SPRING
BRASSICA NAPUS GENOTYPES WITH PARTIAL RESISTANCE
TO CANADIAN ISOLATES OF *PLASMODIOPHORA BRASSICAE***

Y. Aigu¹, T. Cao², IS. Strelkov², VP. Maloni², MJ. Manzanares-Dauleux¹, SE. Strelkov²,
A. Gravot¹

¹IGEPP, AGROCAMPUS OUEST, INRA, Université de Rennes 1, Le Rheu, France

² Department of Agricultural, Food and Nutritional Science, University of Alberta,
Edmonton, Canada

I Introduction

Clubroot, caused by the soilborne obligate parasite *Plasmodiophora brassicae* Woronin, is an important root disease of *Brassica napus* and other crucifers worldwide. The life cycle of *P. brassicae* includes two infection phases, primary infection restricted to the root hairs, and secondary infection of the cortical and stele cells (Kageyama and Asano, 2009). Secondary infection is associated with the formation of galls, resulting from host cell hyperplasia and hypertrophy (Tommerup and Ingram, 1971; Kageyama and Asano, 2009). The infected root tissues eventually decompose, with large numbers of resting spores released back into the soil. These resting spores, which have a half-life of approximately 4 years (Wallenhammar, 1996), can remain viable for up to 20 years in soil. When gall development is severe, host nutrient and water uptake are greatly reduced, resulting in stunting, yellowing and premature senescence. These effects on plant development can reduce crop yield and quality significantly. On a global scale, losses to clubroot have been estimated as ranging from 10 to 15% (Dixon, 2009).

Clubroot was detected in North America for the time in 1852 (Karling, 1968), probably introduced with infected fodder turnips come from Europe (Howard *et al.*, 2010). More recently, clubroot has become an important problem in the canola/oilseed rape (*Brassica napus* L.) producing prairie region of western Canada. The identification of clubroot on the canola crop in Canada has the potential for significant financial implications, given the importance of this crop to farmers and the vast acreages that are planted to canola (Rempel *et al.*, 2014). In the province of Alberta, the number of *P. brassicae*-infected fields has increased since the first identification of clubroot on canola in 2003 (Tewari *et al.*, 2005), from just 12 confirmed infestations to more than 2 400 infestations by 2016 (Strelkov *et al.*, 2017). Fields with *P. brassicae* infestations have also been reported in the provinces of Manitoba and Saskatchewan (Cao *et al.*, 2009; Dokken-Bouchard *et al.*, 2010). The spread of clubroot seems to result mainly from the movement of *P. brassicae*-infected soil (Cao *et al.*, 2009), although the movement of *P. brassicae* resting spores in windborne dust may also contribute to its dissemination (Rennie *et al.*, 2015). In Canada, five pathotypes of *P. brassicae* (pathotypes 2, 3, 5, 6, and 8) have been identified on the differentials of Williams (1966) (reviewed in Strelkov and Hwang, 2014). The most prevalent pathotype in Alberta is pathotype 3 (Strelkov *et al.*, 2006, 2007; Xue *et al.*, 2008).

Given the long viability of resting spores in the soil (Wallenhammar, 1996) and the rapid increase of soil inoculum in the presence of susceptible hosts (Hwang *et al.*, 2013), clubroot disease management is difficult. Many strategies have been proposed for clubroot control, such as liming to increase the soil pH (Webster and Dixon, 1991; Murakami *et al.*, 2002; Donald and Porter, 2014), application of fungicides to suppress infections, modification of seeding dates to obtain

better environmental conditions (Gossen *et al.*, 2012), and the sanitization of farm machinery to limit clubroot spread (Strelkov *et al.*, 2011). While these strategies have a positive effect on clubroot disease reduction, they are either not sufficiently effective or too expensive to be applied on a large scale (Howard *et al.*, 2010; Hwang *et al.*, 2014). In contrast, the use of host genetic resistance is considered as a highly effective strategy to manage clubroot (Diederichsen *et al.*, 2009). In Canada, the first clubroot resistant canola cultivar was released in 2009, and was followed by other resistant cultivars soon thereafter. The deployment of genetically resistant cultivars has become the most important clubroot management tool in canola (Peng *et al.*, 2014b).

However, the high selection pressure imposed by the use of resistant cultivars in very short rotations and in heavily infested fields can lead to rapid erosion in that resistance (Seaman *et al.*, 1963; Hatakeyama *et al.*, 2006; Diederichsen *et al.*, 2014). In fact, recently, the clubroot resistance in Canadian canola cultivars has been overcome by new strains of *P. brassicae* in Alberta (Strelkov *et al.*, 2016). While these strains are classified as pathotype 5 based on the reaction of the differentials of Williams (1966), they differ from other pathotype 5 strains by their ability to cause disease on clubroot resistant (CR) canola genotypes (Strelkov *et al.*, 2016), and are referred to as pathotype '5X' to denote this fact. Given the loss of resistance observed in some fields of canola in Alberta, the detection of new clubroot resistance sources to develop CR canola cultivars is a major objective. To improve genetic diversity and maximize the capacity to identify genetic resistance factors, screening for clubroot resistance was carried out previously with *B. napus* genotypes from different geographical areas (Hasan *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2014a; Rahman *et al.*, 2014). However, few CR lines or cultivars were identified.

In order to identify novel sources of resistance, the response of a set of *B. napus* genotypes, previously characterized for resistance to European isolates of *P. brassicae* (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000a, 2003, and unpublished results), was evaluated for resistance to Canadian isolates and field populations of the pathogen. In order to be able to compare the clubroot responses directly, the test conditions were used as in the previous test conducted with the European isolates (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000b). Since the response to clubroot can be modulated by low-nitrogen fertilization (Laperche *et al.*, 2017), this effect on resistance to Canadian isolates of *P. brassicae* also was examined. In the present study, nine *B. napus* genotypes from Europe, Korea and Australia were assessed for resistance to *P. brassicae* isolates and field populations from Canada representing pathotypes 2, 3, 5, 6 and 5X. The specific objectives of the study were to: 1) identify host genotypes with genetic resistance to clubroot to perform further genetic analyses, and 2) study the influence of nitrogen fertilization on clubroot resistance in the genotypes.

II Materials and methods

P. brassicae and plant material

Four single-spore isolates of *P. brassicae* from Canada, which represented pathotypes 2 (isolate SACAN-ss3), 3 (SACAN-ss1), 5 (ORCA-ss4), and 6 (AbotJE-ss1) (Xue *et al.*, 2008) were used in this study. In addition, a mix of field populations (L-G1, L-G2 and L-G3 in equal proportions), representing a variant of pathotype 5 (pathotype 5X) that is able to overcome resistance in canola (Strelkov *et al.*, 2016), was also included in the analysis. The resting spores were extracted from frozen root clubs in distilled-water and filtered as described previously (Strelkov *et al.*, 2006). The spore concentration was measured by counting with a hemocytometer, and adjusted to a final concentration of 1×10^7 spores/ml with sterile distilled water as needed (Strelkov *et al.*, 2006; Strelkov *et al.*, 2016).

Six European winter oilseed rape cultivars (Aviso, Bristol, Darmor-*bzh*, Express, Montego and Samourai) and 3 spring oilseed rape cultivars from different geographic origins (Crésor from Europe, Yudal from Korea, and Grouse from Australia), were used for the symptom measures and *P. brassicae* DNA quantification. These genotypes were chosen because they displayed differential responses (from high susceptibility to resistance) to different isolates of *P. brassicae* (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000a, 2003, and unpublished results).

Brassica rapa spp. *pekinensis* cv. Granaat (Chinese cabbage, ECD5) was used as susceptible control in all tests.

Clubroot assays

Seeds of the nine *B. napus* genotypes were sown in 4-cm-diameter pots filled with “Falienor 922016F3” potting medium (Falienor, Vivy, France), which consists of 65% Irish peat, 20% black peat, 15% perlite and 2% clay. The pots were transferred to a greenhouse equipped with heating and artificial lighting and maintained at temperatures ranging from 19 to 22 °C under a 16/8 h day/night cycle. Inoculations were performed one week after sowing by applying 1 ml of the resting spore solution (1×10^7 spores/ml) as previously described by Manzanares-Dauleux *et al.* (2000a). Plant cultures were conducted under two fertigation regimes, using two Hoagland-based nutrient solutions containing either 1 mM (thereafter called N1 solution or low-fertilization) or 8 mM (N8 solution or high fertilization) NO_3^- (detailed composition in Laperche *et al.*, 2017). As the water requirements for the N8-treated plants was greater, water was added as needed to avoid drought stress. Resistance tests were conducted with the nine *B. napus* genotypes tested with the 5 pathotypes in high and lower-fertilisation conditions in a randomized block design with 3 replicates. Six plants were used per combination genotype x nitrogen x pathotype x replicate. In

parallel, the five above-described isolates were assayed on the host differential set of (Somé *et al.*, 1996), and were classified in pathotype P2.

Plant roots were thoroughly washed and records were made 42 days after inoculation (dai) to calculate a Disease Index (DI) using the Buczacki *et al.*, scale (1975) as modified by Manzanares-Dauleux *et al.* (2000b).

DNA extraction and qPCR analysis

Total DNA was extracted from 50 mg of lyophilized infected roots using a NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. The DNA quantity was measured with a Nanodrop 2 000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham USA) and adjusted to 10 ng/μl. Quantitative PCR (qPCR) analysis was performed using a Light Cycler 480 thermocycler (Roche, Basel Switzerland) in a 12.5 μl volume with the following components: 2.5 ng of DNA, 6.25 μl of 2X Light Cycler 480 Syber Green I Master (Roche), 2.5 μl of forward and reverse primers (4 mM) and 1.25 μl of ultrapure water. Two primer sets were used to quantify *P. brassicae* and *B. napus* DNA: PbK1 (forward: TTGGGTAATTTGCGCGCCTG and reverse: CAGCGGCAGGTCATTCAACA, those two primers were designed starting from the *P. brassicae* genomic sequence of eH isolate, unpublished data) and CruA (forward: GGCCAGGGTTTCCGTGAT and reverse: CCGTCGTTGTAGAACCATTGG from Wu *et al.*, 2010), respectively. Reactions were performed over 50 cycles of denaturation at 95 °C (15 s) and annealing/extension at 61 °C for (30 s). Three technical replicates were performed for each sample. The results were expressed as the ratio between the DNA quantities of *P. brassicae* and the corresponding plant genotype DNA.

Statistical analysis

Statistical comparisons were made using a Student's t-test for unpaired data. Differences were considered statistically significant at $P < 0.05$.

III Results

Under high nitrogen fertilization, the partial resistance level of the nine host genotypes varied according to the *P. brassicae* pathotype

The disease index (DI) of 9 canola genotypes inoculated with each of five Canadian isolates or field populations of *P. brassicae*, classified as pathotypes 2, 3, 5, 5X and 6, was measured under both low and high-nitrogen fertilization. In the case of tests under high nitrogen supply (using the N8 solution), the check ECD 05 was completely susceptible to all five pathotypes evaluated (DI = 100). Different levels of clubroot resistance were observed depending on the combination of

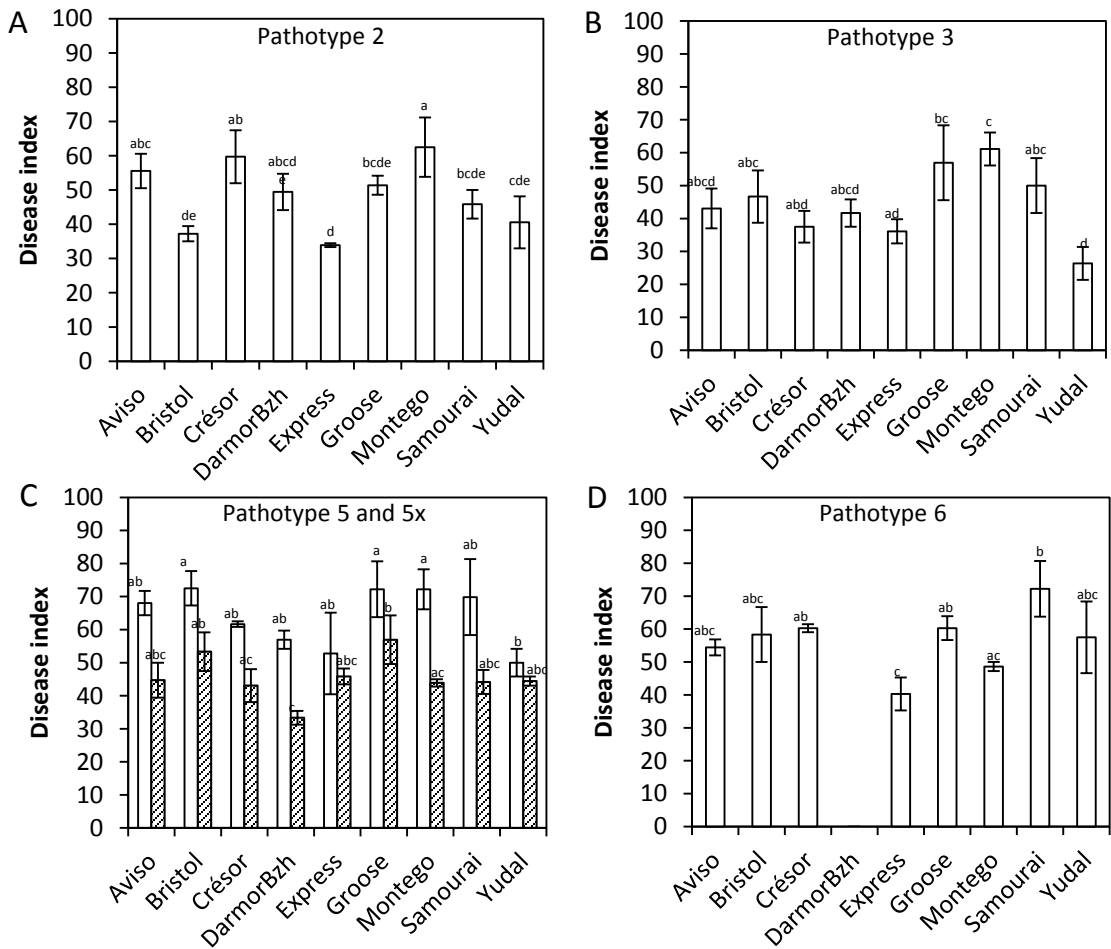


Figure 1: Disease index of the nine *Brassica napus* genotypes inoculated using five isolates of *Plasmodiophora brassicae* under high-nitrogen condition.

T-tests ($p < 0.05$) were performed between genotypes for each isolate. DI of genotypes inoculated by pathotype 5x were represented using hatch.

genotypes and pathotypes studied (Figure 1). The statistical test performed for each genotype highlighted the presence of significant variation in partial resistance to each pathotype. Moreover, the classification of the genotypes based on their level of (partial) resistance varied according to the pathotype. The most resistant genotypes were Express (DI = 33.8 and 40.2) to pathotypes 2 and 6, Yudal (DI = 26.3 and 50) to pathotypes 3 and 5, and Darmor-*bzh* (DI = 33.3) to pathotype 5X. The less resistant genotypes included Montego (DI = 59.7 and 61.1) to pathotypes 2 and 3, Grouse (DI = 72.2 and 56.9) to pathotypes 5 and 5x, and Samouraï (DI = 72.2) to pathotype 6.

Responses to pathotypes 5 and pathotype 5X

The DIs of the nine canola genotypes, inoculated with pathotypes 5 and 5X, were compared to determine if any of the hosts expressed differential responses to these pathotypes. In three of the hosts (Express, Grouse and Yudal), there were no clear differences in response to either pathotype. The other six hosts, however, were found to be more resistant to pathotype 5X than to pathotype 5. In fact, the differences in DI in response to pathotypes 5 and 5X was greater than 18 for these six genotypes (Montego Δ DI = 28.3, Samouraï Δ DI = 25.7, Darmor-*bzh* Δ DI = 23.6, Aviso Δ DI = 23.3, Bristol Δ DI = 19.2 and Cresor Δ DI = 18.6).

Low-nitrogen condition improved the resistance of some genotypes inoculated with pathotypes 2 and 3

To evaluate the effect of low-nitrogen fertilization on partial clubroot resistance, the DIs of the 9 genotypes inoculated with each of the 5 pathotypes were measured under low nitrogen fertilization rates (using the N1 solution). In all cases, the mean DI was reduced under low nitrogen compared with high nitrogen. This reduction was highest in response to pathotype 2 (reduction of 24.5 DI point), moderate in response to pathotypes 3 and 5 (reductions of 13.6 and 9.7 DI points, respectively) and lowest in response to pathotypes 5X and 6 (reductions of 4.2 and 4.7 DI point, respectively). A t-test was performed to compare the DI under low- and high-nitrogen fertilization for each genotype/pathotype combination (Figure 2). Partial resistance of the nine genotypes to pathotype 6 was not significantly impacted by nitrogen fertilization. Moreover, three genotypes (Aviso, Samouraï and Yudal) conserved the same level of resistance independently of nitrogen fertilization according to the pathotype with which they were challenged. By contrast, the partial resistance of the six other genotypes was significantly increased using one or more pathotypes. The partial resistance of four of the genotypes (Cresor, Darmor-*bzh*, Express and Grouse) was significantly increased under low-nitrogen when inoculated with pathotype 2. Two genotypes were more resistant under low-nitrogen when tested with pathotype 3 (Darmor-*bzh* and Montego) and

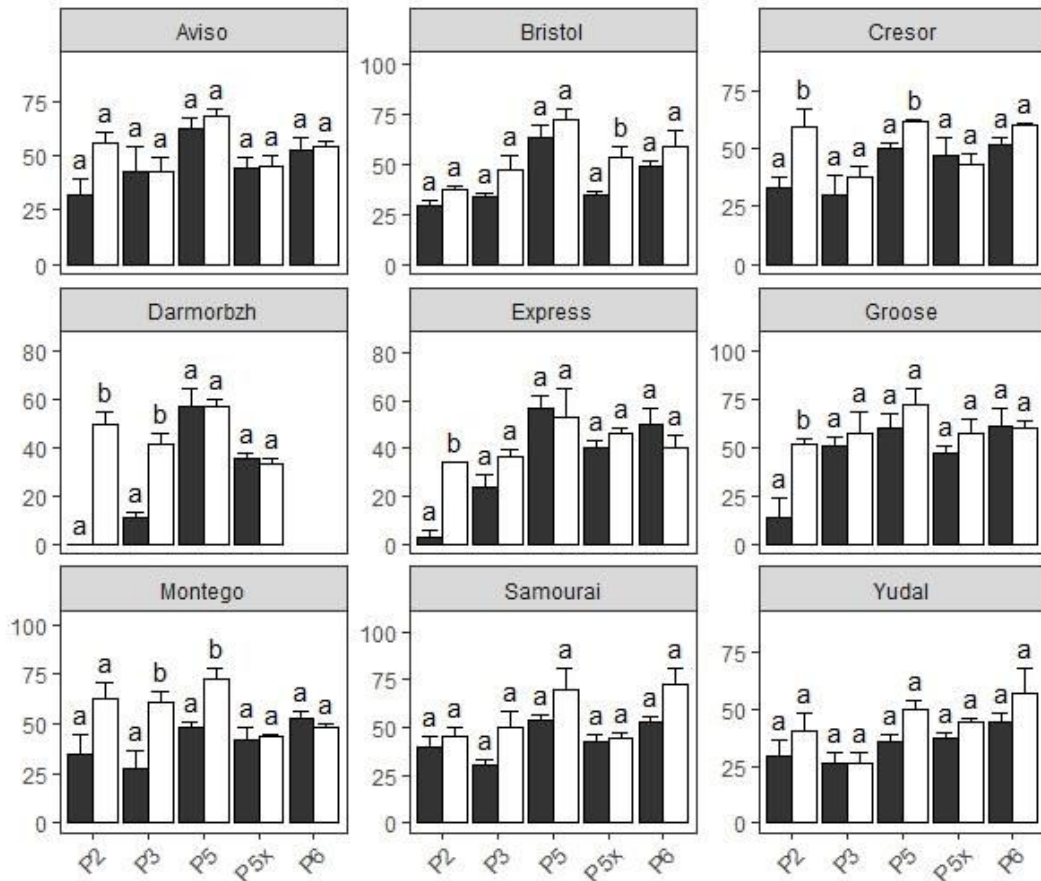


Figure 2: Comparison of disease index of the nine *Brassica napus* genotypes inoculated using five isolates of *Plasmodiophora brassicae* under low- and high-nitrogen conditions.

T-tests ($p < 0.05$) were performed between low- and high-nitrogen samples for each combination genotype / isolate. DI under low- and high-nitrogen conditions were represented in black and white, respectively.

pathotype 5 (Cresor and Montego). Only the partial resistance of Bristol was increased under low-nitrogen fertilization when inoculated with pathotype 5X.

No symptoms were observed in Darmor-bzh inoculated with pathotype 2 under low-nitrogen, but the pathogen was detected in low amounts in its roots

The modulation of Darmor-*bzh* resistance to pathotype 2 was particularly interesting. In fact, the DI of this genotype was 60 points lower under low-nitrogen condition, leading to an absence of symptom development. To determine the ability of *P. brassicae* pathotype 2 to infect and to develop in Darmor-*bzh* under low nitrogen, a DNA quantification was performed. DNA quantification results highlighted a large reduction in the amount of *P. brassicae* in the roots under low-nitrogen versus high-nitrogen condition (9x lower under low-nitrogen) (Figure 3).

IV Discussion

Since the identification of clubroot in the Canadian canola crop, breeders and pathologists have made significant efforts to develop CR cultivars by introgressing genetic resistance into spring canola (Rahman *et al.*, 2014). Resistance from the winter canola cultivar ‘Mendel’ (bred by NPZ-Lembke company in Germany), a rutabaga inbred line (Rutabaga-BF) and *B. rapa* have been used by public researchers to develop clubroot-resistant canola (Rahman *et al.*, 2011, 2014; Hasan and Rahman, 2016). Since the identification of novel strains of the clubroot pathogen capable of overcoming genetic resistance, however, there is renewed interest in identifying novel sources of resistance. The first objective of this study was to screen *B. napus* genotypes from different geographic origins for resistance to Canadian isolates and field populations of *P. brassicae*. Several of these genotypes were previously reported to harbor resistance to European isolates of *P. brassicae*, as for example Darmor-*bzh* (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000a, 2003, and unpublished results). The second objective of this study was to determine the effect of nitrogen fertilization on the clubroot response of these genotypes, given its potential impact on the clubroot response (Laperche *et al.*, 2017).

Results obtained in the present study confirmed that several of the *B. napus* genotypes evaluated showed resistant or partially resistant responses to pathotypes of *P. brassicae* from Canada. Many other screenings for clubroot resistance have been already performed to test *B. napus* genotypes from areas other than North America to Canadian (Rahman *et al.*, 2011, 2014; Hasan *et al.*, 2012; Peng *et al.*, 2014a). For example, the winter canola cultivar ‘Mendel’, from Germany, carries resistance to Canadian isolates belonging to some of the major pathotypes reported from Canada, including pathotypes 3, 5 and 6 (Rahman *et al.*, 2011). With the recent identification of strains (pathotype 5X) of *P. brassicae* able to overcome the genetic resistance in

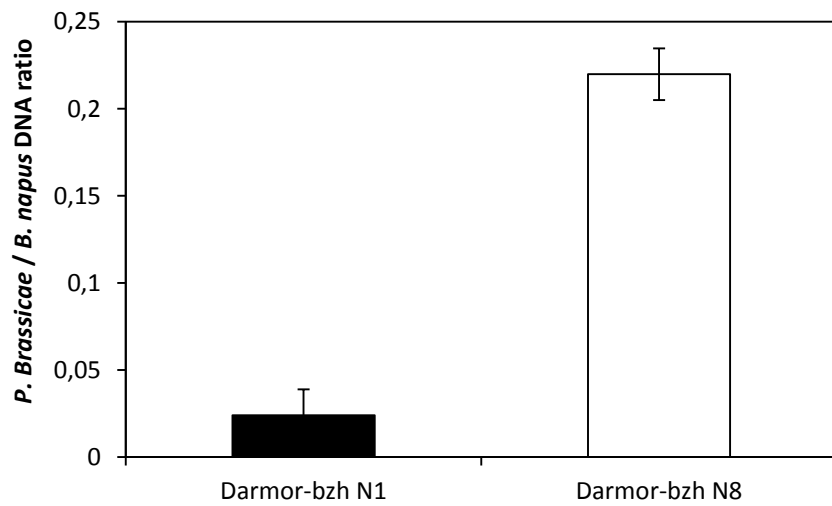


Figure 3: The DNA ratio (*Plasmodiophora brassicae* / *Brassica napus*) in Darmor-bzh roots inoculated by pathotype 2 under low- (N1) and high (N8)-nitrogen fertilization.

DNA ratio under low- and high-nitrogen condition were represented in black and white, respectively.

commercial canola cultivars (Strelkov *et al.*, 2016), however, the identification of new sources of clubroot resistance has gained increased urgency. In the present study, screening with pathotype 5 identified several oilseed rape genotypes with partial resistance to this new strain. The host genotype most resistant to pathotype 5X in this study, Darmor-*bzh*, may represent a good source of resistance against this strain of *P. brassicae*. Previous genetic studies on Darmor-*bzh* x Yudal progenies detected several QTL or resistance from Darmor-*bzh* to several European isolates (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000a, 2003; Laperche *et al.*, 2017). It would be interesting in the future to analyze the genetic basis of the resistance harbored by the different genotypes analyzed in this study to detect genetic factors efficient against the Canadian isolates.

The reduction of clubroot symptoms under low nitrogen has been reported previously (Pryor *et al.*, 1940; Laperche *et al.*, 2017). In the current study, nitrogen level influenced clubroot response differentially according to the specific host genotype/*P. brassicae* pathotype combination. Moreover, the nitrogen-induced modulation of clubroot response was always characterized by an increase in resistance under low-nitrogen. The intensity of symptom reduction, however, also varied according to genotype/pathotype combination. Amongst the genotypes with the greatest reduction in clubroot symptoms were Darmor-*bzh*, which became highly resistant to pathotypes 2 and 3, and Express and Grouse, which became highly resistant to pathotype 2. A similar result was observed by Laperche *et al.* (2017) using European isolates of *P. brassicae*. In this previous work, clubroot resistance in Yudal and Darmor-*bzh* to the French isolate eH was highly or moderately improved, respectively, in the low-nitrogen condition. In contrast, the clubroot resistance of these same cultivars to another French isolate (K92-16) was not significantly impacted by nitrogen condition.

More broadly, the results of the present work confirm that the nitrogen content in the soil is an essential factor to consider in clubroot resistance breeding programs, independently of the geographical region intended for deployment of that resistance. Regardless of the resistance used, it seems that nitrogen availability needs to be considered as part of a general strategy for clubroot management and control (Laperche *et al.*, 2017).

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge Mr. Rémi Naasz at Premier Tech Horticulture (Olds, AB) for kindly providing the potting mix for this experiment. Yoann Aigu is the recipient of a 3-year PhD fellowship from the University of Rennes 1, and of a 3-months international outgoing fellowship from Rennes Métropole. We acknowledge the Genetic Resource Center (BrACySol, UMR IGEPP Ploudaniel, France) for providing the seeds of some *B. napus* varieties.

V References

- Cao T., Manolii V.P., Strelkov S.E., Hwang S.-F., Howard R.J. (2009) Virulence and spread of *Plasmodiophora brassicae* [clubroot] in Alberta, Canada. Canadian journal of plant pathology 31:321–329.
- Diederichsen E., Frauen M., Linders E.G.A., Hatakeyama K., Hirai M. (2009) Status and Perspectives of Clubroot Resistance Breeding in Crucifer Crops. Journal of plant growth regulation 28:265–281.
- Diederichsen E., Frauen M., Ludwig-Müller J. (2014) Clubroot disease management challenges from a German perspective. Canadian journal of plant pathology 36:85–98.
- Dixon G.R. (2009) The Occurrence and Economic Impact of *Plasmodiophora brassicae* and Clubroot Disease. Journal of plant growth regulation 28:194–202.
- Dokken-Bouchard F.L., Bassendowski K.A., Boyle T., Cowell L.E., Gugel R.K., Ippolito J., Kirkham C.L., Kutcher H.R., Lewchuk Z., Miller S.G., Morrall R.A.A., Phelps S., Schemenauer I., Sommerfeld S., Vakulabharanam V. (2010) Survey of canola diseases in Saskatchewan, 2009. Canadian plant disease survey.
- Donald E.C., Porter I.J. (2014) Clubroot in Australia: the history and impact of *Plasmodiophora brassicae* in Brassica crops and research efforts directed towards its control. Canadian journal of plant pathology 36:66–84.
- Gossen B.D., Adhikari K.K.C., McDonald M.R. (2012) Effect of seeding date on development of clubroot in short-season *Brassica* crops. Canadian journal of plant pathology 34:516–523.
- Hasan M.J., Rahman H. (2016) Genetics and molecular mapping of resistance to *Plasmodiophora brassicae* pathotypes 2, 3, 5, 6, and 8 in *rutabaga* (*Brassica napus* var. *napobrassica*). Genome / National Research Council Canada 59:805–815.
- Hasan M.J., Strelkov S.E., Howard R.J., Rahman H. (2012) Screening of *Brassica* germplasm for resistance to *Plasmodiophora brassicae* pathotypes prevalent in Canada for broadening diversity in clubroot resistance. Canadian journal of plant science 92:501–515.
- Hatakeyama K., Fujimura M., Ishida M., Suzuki T., Sato T. (2006) Classification of pathogenicity of *Plasmodiophora brassicae* field isolates in Japan based on resistance of F1 cultivars of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) to clubroot. Acta horticulturae:323–328.
- Howard R.J., Strelkov S.E., Harding M.W. (2010) Clubroot of cruciferous crops--new perspectives on an old disease. Canadian journal of plant pathology 32:43–57.
- Hwang S.-F., Ahmed H.U., Zhou Q., Rashid A., Strelkov S.E., Gossen B.D., Peng G., Turnbull G.D. (2013) Effect of susceptible and resistant canola plants on *Plasmodiophora brassicae* resting spore populations in the soil. Plant pathology 62:404–412.
- Hwang S.-F., Howard R.J., Strelkov S.E., Gossen B.D., Peng G. (2014) Management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola (*Brassica napus*) in western Canada. Canadian journal of plant pathology 36:49–65.
- Kageyama K., Asano T. (2009) Life Cycle of *Plasmodiophora brassicae*. Journal of plant growth regulation 28:203–211.
- Laperche A., Aigu Y., Jubault M., Ollier M., Guichard S., Glory P., Strelkov S.E., Gravot A., Manzanares-Dauleux M.J. (2017) Clubroot resistance QTL are modulated by nitrogen input in *Brassica napus*. Theoretical and applied genetics 130:669–684.
- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Baron F., Thomas G. (2000) Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. Theoretical and applied genetics 101:885–891.

- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Glory P., Giboulot A., Thomas G. (2003) Mapping QTLs and major resistance genes to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassica napus*. In: 13th Crucifer Genetics Workshop, UC Davis, California, March. pp 23–26.
- Manzanares-Dauleux M.J., Divaret I., Baron F., Thomas G. (2000) Evaluation of French *Brassica oleracea* landraces for resistance to *Plasmodiophora brassicae*. *Euphytica* 113:211.
- Murakami H., Tsushima S., Kuroyanagi Y., Shishido Y. (2002) Reduction of resting spore density of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease severity by liming. *Soil science and plant nutrition* 48:685–691.
- Peng G., Falk K.C., Gugel R.K., Franke C., Yu F., James B., Strelkov S.E., Hwang S.-F., McGregor L. (2014) Sources of resistance to *Plasmodiophora brassicae* (clubroot) pathotypes virulent on canola. *Canadian journal of plant pathology* 36:89–99.
- Peng G., Lahlali R., Hwang S.-F., Pageau D., Hynes R.K., McDonald M.R., Gossen B.D., Strelkov S.E. (2014) Crop rotation, cultivar resistance, and fungicides/biofungicides for managing clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola. *Canadian journal of plant pathology* 36:99–112.
- Pryor D.E. (1940) The effect of some mineral nutrients on the development of clubroot of crucifers. *Journal of agricultural research* 61:149–160.
- Rahman H., Peng G., Yu F., Falk K.C., Kulkarni M., Selvaraj G. (2014) Genetics and breeding for clubroot resistance in Canadian spring canola (*Brassica napus* L.). *Canadian journal of plant pathology* 36:122–134.
- Rahman H., Shakir A., Hasan M.J. (2011) Breeding for clubroot resistant spring canola (*Brassica napus* L.) for the Canadian prairies: Can the European winter canola cv. Mendel be used as a source of resistance? *Canadian journal of plant science* 91:447–458.
- Rempel C.B., Hutton S.N., Jurke C.J. (2014) Clubroot and the importance of canola in Canada. *Canadian journal of plant pathology* 36:19–26.
- Rennie D.C., Holtz M.D., Turkington T.K., Leboldus J.M., Hwang S.-F., Howard R.J., Strelkov S.E. (2015) Movement of *Plasmodiophora brassicae* resting spores in windblown dust. *Canadian journal of plant pathology* 37:188–196.
- Seaman W.L. (1963) A new race of *Plasmodiophora brassicae* affecting Badger Shipper cabbage. *Phytopathology* 53:1426–1429.
- Somé A., Manzanares M.J., Laurens F., Baron F., Thomas G., Rouxel F. (1996) Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant pathology* 45:432–439.
- Strelkov S.E., Hwang S.-F. (2014) Clubroot in the Canadian canola crop: 10 years into the outbreak. *Canadian journal of plant pathology* 36:27–36.
- Strelkov S.E., Hwang S.-F., Howard R.J., Hartman M., Turkington T.K. (2011) Progress towards the sustainable management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) of canola on the Canadian prairies. *Prairie Soils and Crops* 4:114–121.
- Strelkov S.E., Hwang S.-F., Manolii V.P., Cao T., Feindel D. (2016) Emergence of new virulence phenotypes of *Plasmodiophora brassicae* on canola (*Brassica napus*) in Alberta, Canada. *European journal of plant pathology* 145:517–529.
- Strelkov S.E., Manolii V.P., Cao T., Xue S., Hwang S.F. (2007) Pathotype Classification of *Plasmodiophora brassicae* and its Occurrence in *Brassica napus* in Alberta, Canada. *Journal of Phytopathology* 155:706–712.
- Strelkov S.E., Manolii V.P., Harding M.W., Hwang S.F., Manolii E., Zuzak K., Rennie D.C., Feng J., Rahaman M., Daniels G.C., Burke D.A., Hill T.B., Zhar K., Feindel D. (2017) Occurrence and spread of clubroot on canola in Alberta in 2016. *Canadian Plant Disease Survey* 97:164–167.

Chapitre II : Analyse génétique de l'impact de la fertilisation azotée sur la résistance du colza à la hernie

- Strelkov S.E., Tewari J.P., Smith-Degenhardt E. (2006) Characterization of *Plasmodiophora brassicae* populations from Alberta, Canada. Canadian journal of plant pathology 28:467–474.
- Tewari J.P., Strelkov S.E., Orchard D., Hartman M., Lange R.M., Turkington T.K. (2005) Identification of clubroot of crucifers on canola (*Brassica napus*) in Alberta. Canadian journal of plant pathology 27:143–144.
- Tommerup I.C., Ingram D.S. (1971) The life-cycle of *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica tissue cultures* and in intact roots. The New phytologist 70:327–332.
- Wallenhammar A.-C. (1996) Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. Plant pathology 45:710–719.
- Webster M.A., Dixon G.R. (1991) Calcium, pH and inoculum concentration influencing colonization by *Plasmodiophora brassicae*. Mycological research 95:64–73.
- Williams P.H. (1966) A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. Phytopathology 56:624–626.
- Wu G., Zhang L., Wu Y., Cao Y., Lu C. (2010) Comparison of five endogenous reference genes for specific PCR detection and quantification of *Brassica napus*. Journal of agricultural and food chemistry 58:2812–2817.
- Xue S., Cao T., Howard R.J., Hwang S.F., Strelkov S.E. (2008) Isolation and Variation in Virulence of Single-Spore Isolates of *Plasmodiophora brassicae* from Canada. Plant disease 92:456–462

CONCLUSIONS PARTIELLES

L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre était de caractériser l'impact du niveau de fertilisation azotée sur les facteurs génétiques de la plante hôte contrôlant les processus de développement des symptômes et de production de spores de repos lors de l'infection par *P. brassicae*. Les résultats obtenus nous ont permis d'établir les conclusions suivantes :

1. Le développement des galles, lors de l'infection du colza par *P. brassicae*, peut être modulé par la fertilisation azotée. L'amplitude de cette modulation est variable selon la combinaison génotype de colza/isolat de *P. brassicae* utilisée : une forte diminution des symptômes est observée pour certains génotypes en condition de faible fertilisation tandis que pour d'autres le niveau de symptômes reste inchangé quel que soit le niveau d'apport azoté. Indépendamment des génotypes de la plante hôte et des isolats de l'agent pathogène, nous observons globalement une diminution des symptômes lorsque la fertilisation azotée est réduite.
2. Contrairement au développement des symptômes, la production de spores de repos est systématiquement réduite dans des conditions de faible fertilisation azotée. Cependant, la réduction de la production de spores de repos est également variable selon la combinaison génotype de colza/isolat de *P. brassicae* utilisée.
3. L'impact de la fertilisation azotée sur le développement des galles n'est pas lié à la tolérance des génotypes à la carence azotée. En effet, il n'y a pas de corrélation entre la biomasse de la plante hôte ou sa teneur en azote et le delta de symptômes observé entre les deux conditions de fertilisation azotée.
4. Le développement des galles et la production de spores de repos lors de l'infection, sont contrôlés par des facteurs génétiques de la plante hôte. Dans le cas de l'isolat eH, les principaux facteurs génétiques contrôlant ces deux processus sont communs. Les deux QTL majeurs impliqués dans le contrôle de ces deux variables sont le QTL C09a et le QTL C02.
5. La réponse différentielle de la plante à l'infection par la hernie, évaluée dans différentes conditions de fertilisation azotée, peut être expliquée, au moins partiellement, par une modulation spécifique de l'effet des QTL contrôlant le développement des galles ou la production de spores de repos.
6. Globalement l'apport azoté module la réponse du colza à l'infection par la hernie, quelques soient les génotypes de la plante hôte et les isolats de l'agent pathogène.

L'amplitude de la modulation est toutefois génotype plante/isolat agent pathogène dépendante.

CHAPITRE III

**CARACTERISATION DE LA REPONSE
TRANSCRIPTOMIQUE ET
METABOLOMIQUE LIE A
L'AUGMENTATION DE RESISTANCE
DU GENOTYPE 'YUDAL' VIS-A-VIS
DE L'ISOLAT EH EN CONDITION DE
FAIBLE APPORT AZOTE**

CHAPITRE III : CARACTERISATION DE LA REPONSE TRANSCRIPTOMIQUE ET METABOLOMIQUE LIE A L'AUGMENTATION DE RESISTANCE DU GENOTYPE 'YUDAL' VIS-A-VIS DE L'ISOLAT EH EN CONDITION DE FAIBLE APPORT AZOTE

PREAMBULE

En parallèle des analyses génétiques de la résistance à la hernie réalisées chez les Brassicacées ayant pour objectif d'identifier les facteurs génétiques impliqués dans la résistance (Saito *et al.*, 2006 ; Sakamoto *et al.*, 2008 ; Suwabe *et al.*, 2003 ; Lee *et al.*, 2016 ; Nagaoka *et al.*, 2010 ; Rocherieux *et al.*, 2004 ; Hasan et Rahman, 2016 ; Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000 ; Manzanares-Dauleux *et al.*, 2003 ; Werner *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2015 ; Jubault *et al.*, 2008), de nombreuses analyses de type omique ont également été effectuées visant à comprendre les bases moléculaires et biochimiques de la réponse à la hernie (Jubault *et al.*, 2013 ; Pedras *et al.*, 2008 ; Wagner *et al.*, 2012 ; Siemens *et al.*, 2006). Ces travaux ont notamment permis de mettre en avant la régulation de processus associés au métabolisme primaire et secondaire de la plante hôte lors de l'infection par *P. brassicae* (Pedras *et al.*, 2008 ; Wagner *et al.*, 2012 ; Siemens *et al.*, 2011 ; Devos *et al.*, 2006). Elles ont également permis de mettre en évidence le rôle des voies de défense contrôlées par le salicylate et le jasmonate, deux phytohormones, dans la réduction du développement des symptômes (Jubault *et al.*, 2013 ; Lemarié *et al.*, 2015).

Sur la base des résultats présentés dans le chapitre III, mettant en avant une forte modulation de la réponse du génotype 'Yudal' à l'isolat eH de *P. brassicae* à la hernie ('Yudal' présente très peu de symptômes en conditions de faible apport azoté et est très sensible à la hernie en conditions de forte fertilisation azotée), l'objectif des travaux présentés dans ce chapitre est d'identifier les réponses transcriptomiques et métabolomiques sous-jacentes à cette modulation et permettant une augmentation du niveau de résistance de ce génotype en conditions de faible fertilisation azotée.

Afin de pouvoir caractériser spécifiquement la réponse de résistance de 'Yudal' en conditions de faible intrant azoté, nous avons comparé les profils transcriptomiques et métabolomiques de 'Yudal' à un second génotype, très sensible à la hernie et dont la réponse n'est pas modulée par la fertilisation azotée. L'haploïde doublé HD018, issu du croisement entre Darmor-*bzh* et 'Yudal', a été donc sélectionné du fait de l'absence de modulation de sa réponse, mais également de par son niveau de symptômes similaire à celui du génotype 'Yudal' en condition

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

de forte fertilisation azotée. Ces deux génotypes possèdent une partie de leur génome en commun ('Yudal' est l'un des parents de HD18).

Afin de caractériser le plus finement possible les mécanismes impliqués dans l'augmentation de résistance de 'Yudal', un test hernie combinant quatre facteurs, le génotype de colza ('Yudal' et HD018), l'inoculation (inoculation avec eH et non inoculation), la fertilisation azotée (8 mM et 1 mM d'azote) et le temps cinétique (14, 27 et 42 jours après inoculation) a été mis en place. Par la suite, le transcriptome et le métabolome de l'ensemble de ces échantillons ont été respectivement analysés par des méthodes de RNA-seq (Hiseq 4 000) et de chromatographie (LC/MS, GC-FID et Orbitrap).

Une partie des résultats obtenus sont présentés sous forme d'article scientifique prévu pour soumission à la revue *Frontiers in Plant Science* : Yoann Aigu, Stéphanie Daval, Anne Laperche, Fabrice Legeai, Christine Lariagon, Kevin Gazangel, Maria Manzanares-Dauleux et Antoine Gravot. Low-nitrogen conditional resistance to clubroot in the *Brassica napus* genotype 'Yudal' is associated to the induction of genes involved in nitrate assimilation.

Dans une deuxième partie, je présente les résultats des analyses non ciblées métabolomiques. Ces analyses ont été effectuées sur les mêmes échantillons que ceux présentés dans la première partie de ce chapitre et en plus sur les échantillons obtenus à 42 jours après inoculation.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

ARTICLE IV: LOW-NITROGEN CONDITIONAL RESISTANCE TO CLUBROOT IN THE *BRASSICA NAPUS* GENOTYPE 'YUDAL' IS ASSOCIATED WITH THE INDUCTION OF GENES INVOLVED IN NITRATE ASSIMILATION

Y. Aigu¹, S. Daval¹, A. Laperche¹, F. Legeai¹, C. Lariagon¹, K. Gazangel¹, MJ. Manzanares-Dauleux¹ and A. Gravot¹

¹IGEPP, AGROCAMPUS OUEST, INRA, Université de Rennes 1, Le Rheu, France

I Introduction

Clubroot, caused by the obligate biotrophic parasite *Plasmodiophora brassicae*, is a worldwide root disease affecting all *Brassicaceae* species. The life cycle of *P. brassicae* starts with a primary infection phase in the root hairs for a few days, followed by weeks of secondary infection inside cortical and stele cells, triggering cell proliferation, and leading to the development of root galls (Tommerup and Ingram, 1971; Kageyama and Asano, 2009). Genetic resistance plays a pivotal role in the management of clubroot disease in *Brassica* crop production. However, efforts are needed to face to a steady rise of resistance breaking. A better understanding of clubroot resistance is needed to support knowledge-based breeding and management of resistant varieties. In this perspective, several NBS-LRR-based qualitative resistances have been identified mainly from accessions of *Brassica rapa* (reviewed in Piao *et al.*, 2009; Hatakeyama *et al.*, 2017), and a significant number of QTL involved in quantitative resistance to clubroot have also been reported in many Brassica crops (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000a; Piao *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2017) and in *Arabidopsis* (Jubault *et al.*, 2008). In parallel, increasing omics-based efforts have been carried out to address the molecular and biochemical basis of clubroot responses. Those works have highlighted the importance of a series of regulatory processes associated with plant primary and secondary metabolism (Pedras *et al.*, 2008; Siemens *et al.*, 2011; Wagner *et al.*, 2012) and the central role of auxin, cytokinin and brassinosteroid-driven regulations (Devos *et al.*, 2006; Siemens *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2011; Schuller *et al.*, 2014). There also have been reported the role of JA and SA-driven defense responses in the inhibition of symptom development (Agarwal *et al.*, 2011; Jubault *et al.*, 2013; Lemarié *et al.*, 2015), and transcriptional features associated to the expression of major resistance loci (Chen *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2017).

The recent work of Laperche *et al.* (2017) identified a series of *B. napus* genotypes, including 'Yudal', displaying interesting levels of partial resistance to clubroot when cultivated under low nitrate supply, but for which partial resistance was almost lost when switching plant culture to high nitrate input. Low nitrogen-triggered resistance was not systematically observed in the progeny of 'Yudal', and a linkage genetic analysis identified a couple of resistance QTL for which the relative effect of resistance alleles from 'Yudal' was conditional to nitrogen fertilization level (Laperche *et al.*, 2017). Similar conclusions, *i.e.*, that varying nitrogen supply can dampen or enhance the resistance level for specific genotypes and for specific nitrogen-conditional resistance loci, have been reported for other pathosystems (Ballini *et al.*, 2013; Thalineau *et al.*, 2017). However, the cellular and molecular elements underlying such genotype x environment crosstalk remain largely unknown.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

Nitrogen fertilization has been for long studied in relation to its impact on plant diseases (Huber and Watson, 1974; Walters and Bingham, 2007; Dordas, 2009; Fagard *et al.*, 2014; Hacquard *et al.*, 2016; Mur *et al.*, 2017). Although it has long been recognized that the chemical form of nitrogen fertilizer matters (Huber and Watson, 1974), there are also important quantitative concerns. It is indeed often expected - *a priori* - that excessive nitrogen levels tend to promote the severity of plant diseases (Huber and Watson, 1974). However, the reverse has been frequently reported and then no general pattern applies to all pathosystems. Among the reasons most frequently given is that the levels of organic or inorganic nitrogen in plant tissues can directly affect the development of the pathogen because of basic nutritional reasons (Talbot *et al.*, 1997; Snoeijers, 2000). Fertilization can also indirectly influence plant-signaling pathways, promoting or depreciating a plant's ability to trigger the relevant defense responses. Finally, plant nitrogen status exerts sometimes a critical influence on the cellular physiology of the pathogen itself, modulating part of virulence functions (Bolton and Thomma, 2008, Lopez-Berges *et al.*, 2010).

As highlighted above for resistance to clubroot, an important point to consider is that the modulation exerted by nitrogen on disease severity can be very much plant-genotype dependent (Laperche *et al.*, 2017; Thalineau *et al.*, 2017). Based on the strong link between pathogen nutritional requirement and plant metabolism, one first hypothesis is that any plant genetic variation influencing nitrogen use efficiency could theoretically influence the level of susceptibility/resistance of plants cultivated under low nitrogen input (Ballini *et al.*, 2013). In this perspective, experimental attempts to decipher the molecular basis of nitrogen-driven resistance may meet molecular processes involved in basic plant nitrogen assimilation. Alternately, plant genetic variations might have a more focused impact on regulatory hubs at the crossroad between defense and metabolism, with only limited consequences on basic nitrogen homeostatic responses *per se*.

The aim of the present study was to understand the molecular processes associated with the modulation of clubroot resistance by low nitrogen conditions in the *B. napus* genotype 'Yudal'. Nitrogen-dependent cellular responses to infection were analyzed in 'Yudal' and in the genotype HD018 used as a control. HD018 was chosen among a double haploid progeny from the cross between 'Darmor-bzh' and 'Yudal' (Foisset *et al.*, 1996, Laperche *et al.*, 2017) in such a way that its level of susceptibility level remained invariably high whatever the amount of nitrate supplied. Transcriptional and metabolic responses were investigated in inoculated roots of both 'Yudal' and HD018 at 14 and 27 days post-inoculation (dpi), and root pathogen content was quantified in the samples using qPCR. Results were analyzed with the prospect of: 1/ the identification of contrasted genotype-dependent responses to low nitrogen, which would be independent of clubroot infection but might have relevant consequences on physiopathological responses, and 2/ the identification

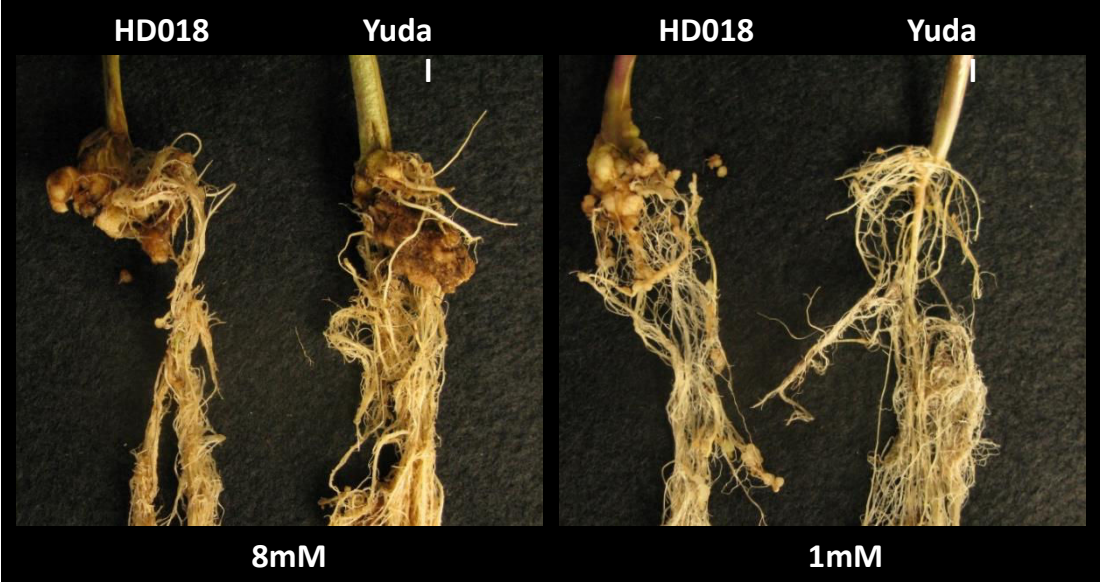


Figure 1: Root symptoms of two *B. napus* genotypes, 'Yudal' and HD018, 49 days after inoculation with eH isolate of *P. brassicae*, under two nitrogen supply, 1mM and 8mM.

of possible contrasting genotype-dependent responses to the specific combination of abiotic (nitrogen) and biotic (*P. brassicae* infection) constraints.

II Materials and methods

Plasmiodiophora brassicae and plant material

The *P. brassicae* selection isolate eH (Fähling *et al.*, 2003), belonging to pathotype P1, as defined by (Somé *et al.*, 1996), was propagated on Chinese cabbage (*B. rapa* spp. *pekinensis* cv. Granaat). *B. napus* cv 'Yudal', a spring oilseed rape, and HD018, a doubled haploid (DH) from the 'Darmor-bzh' x 'Yudal' progeny (Foisset *et al.*, 1996), were used for the RNA-seq and metabolic analyses. Both genotypes were previously described as susceptible to isolate eH of *P. brassicae* when cultivated under standard fertilization conditions. Clubroot symptoms have been shown to be significantly lower in 'Yudal' when cultivated under low nitrogen input, whereas HD018 remained highly susceptible (Laperche *et al.*, 2017, see also Figure 1).

Clubroot assay under low- and high-nitrogen conditions

Seeds of 'Yudal' and HD018 were sown in 4-cm-diameter pots (1 seed per pot) filled with "Falienor 922016F3" potting medium (Falienor, Vivy, France), which consists of 65% Irish peat, 20% black peat, 15% perlite and 2% clay. The pots were transferred to a phytotron maintained at temperatures ranging from 19 °C to 22 °C under a 16/8 h day/night cycle. Two Hoagland-based nutrient solutions containing 1 mM (thereafter called N1 solution) or 8 mM (N8 solution) of nitrate, were supplied to the plants by watering at the bottom of the pots (sub-irrigation) according to (Laperche *et al.*, 2017). Plants were sub-irrigated with the appropriate nutrient solution twice a week from sowing to 21 days after sowing (das) and then three times per week until the end of the assays. This frequency was based on the requirement of the plants under N1 condition. Since transpiration and water requirement was higher in the N8-treated plants, those plants also were additionally supplied with N1 nutrient solution when needed, so as to avoid water stress. Inoculations were performed one week after sowing by applying 1 ml of resting spores solution (1×10^7 spores/ml) as previously described by Manzanares-Dauleux *et al.* (2000b). Experiments were conducted in four replicates. Macroscopic root symptoms were observed and a disease index was determined at 27 and 42 days post inoculation (dpi) according to the method of (Buczacki *et al.*, 1975) as modified by (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2003). Root samples were collected 14, 27 and 42 dpi. Root samples were collected from 24 plants at 14 dpi, 12 plants at 27 dpi and 6 plants at 42 dpi, for each combination of nitrogen level, genotype, inoculation and for each of the four replicates (total = 32 samples per time-course point). Samples were quickly frozen in liquid nitrogen, then freeze-dried and grounded with a FastPrep-24 (MP biomedical).

qPCR-based estimation of pathogen content

Total DNA was extracted from 50 mg of lyophilized infected roots using a NucleoSpin Plant II kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany) following the manufacturer's instructions. The DNA quantity was measured with a Nanodrop 2 000 (Thermo Fischer Scientific, Waltham USA) and adjusted to 10 ng/μl. Quantitative PCR (qPCR) analysis was performed using a Light Cycler 480 thermocycler (Roche, Basel Switzerland) in a 12.5 μl volume with the following components: 2.5 ng of DNA, 6.25 μl of 2X Light Cycler 480 Syber Green I Master (Roche), 2.5 μl of forward and reverse primers (4 mM) and 1.25 μl of ultrapure water. Two primer sets were used to quantify *P. brassicae* and *B. napus* DNA: PbK1 (forward: TTGGGTAATTTGCGCGCCTG and reverse: CAGCGGCAGGTCATTCAACA, those two primers were designed starting from the *P. brassicae* genomic sequence of eH isolate, unpublished data) and CruA (forward: GGCCAGGGTTTCCGTGAT and reverse: CCGTCGTTGTAGAACCATTGG from Wu *et al.*, 2010), respectively. Reactions were performed over 50 cycles of denaturation at 95 °C (15 s) and annealing/extension at 61 °C for (30 s). Three technical replicates were performed for each sample. The results were expressed as the ratio between the DNA quantities of *P. brassicae* and the corresponding plant genotype DNA.

Metabolic profiling

Non-structural carbohydrates, polyols, organic acids and amino acids quantification

For non-structural carbohydrates, polyols, organic acids and amino acids profiling, 10 mg of the freeze-dried root powder per sample were used. A methanol–chloroform–water-based extraction was performed according to the following procedure: ground samples were suspended in 500 μL of methanol containing two internal standards: 200 μM 3-aminobutyric acid (BABA) (for amino acid quantification) and 400 μM adonitol (GC analysis). Suspensions were agitated for 15 min at room temperature. Then, 250 μL of chloroform were added, followed by a 10 min agitation step. Finally, 500 μL of water were added, and samples were vortexed and centrifuged at 12,000 g for 5 min to induce phase separation. The upper phase, which contained nonstructural carbohydrates, polyols, organic acids and amino acids, was transferred to a clean microtube and used for subsequent analysis.

For amino acid profiling, 50 μL of each methanol–water extract were dried under vacuum. Dry residues were suspended in 50 μL of ultrapure water and 10 μL were used for the derivatization employing the AccQ-Tag Ultra derivatization kit (Waters, Milford, MA, USA). Derivatized amino acids were analyzed using an Acquity UPLC-DAD system (Waters) according to (Albert *et al.*, 2012). BABA was used as internal standard.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

For non-structural carbohydrates, polyols and organic acids profiling, 50 µL of polar extract were dried under vacuum. The dry residue was dissolved in 50 µL of 20 mg ml⁻¹ methoxyaminehydrochloride in pyridine at 30 °C for 90 min under orbital shaking. Then, 50 µL of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide (BSTFA) was added and samples were incubated at 37 °C for 30 min, and then at room temperature overnight before injection in GC-flame ionization detection (FID) according to (Lugan *et al.*, 2009). Ribitol was used as internal standard.

Salicylic acid and jasmonate quantification

SA and JA were quantified starting from 20 mg per sample of the freeze-dried root powder. After addition of 1 ml of a methanol: water: formic acid (80:19:1 by vol.) mixture solvent, tubes were ultrasonicated and agitated at room temperature for 30 min. The tubes were then centrifuged at 12,000 g for 10 min and the supernatants were removed into new 1.5 mL tubes. The pellets were re-extracted with 1 ml of the extraction solvent and the supernatants were pooled and dried in a speed vacuum centrifuge. Dried residues were then resuspended in 100 µL of acidified methanol. Phytohormones were analyzed by injecting 5 µL of resuspended samples in an Acquity UPLC system (Waters) coupled to a triple quadrupole detector equipped with an electrospray ionization (ESI) source according to (Fan *et al.*, 2011). Authentic SA and JA (Sigma Aldrich and Olchemim Ltd.) were used as external standards.

RNaseq analysis

RNA isolation, cDNA Library Construction and Sequencing

RNA was extracted from 20 mg of freeze-dried root powder using TRIzol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, United States) according to the manufacturer's instructions. RNA purity was determined using a 2100 bioanalyzer (Agilent, Santa Clara, CA, United States). cDNA library preparation and sequencing were conducted by GenoScreen in Lille, France. mRNA was isolated and fragmented. These short fragments of mRNA were used as templates to synthesize cDNA with random primer. cDNA ends were repaired to permit Illumina sequencing adaptor. DNA libraries were generated by PCR amplification and controlled by fragment analyzer kit "DNF 474 High Sensitivity NGS Fragment". All the 80 libraries were paired-end sequenced (2 x 150 bp) using an Illumina HiSeqTM 4000.

Read mapping and counting

High quality paired reads were mapped against the *B. napus* genome cv 'Darmor-bzh' (Version 4.1) (Chalhoub *et al.*, 2014) combined with the *P. brassicae* isolate eH genome (unpublished data), using STAR, version 2.5.2a (Dobin *et al.*, 2013). The mapping parameters were adjusted according to the properties of the polyploid *B. napus* genome, maximum 6 multimapping, and the divergence between genotypes used for RNA-seq and reference genome, maximum 6

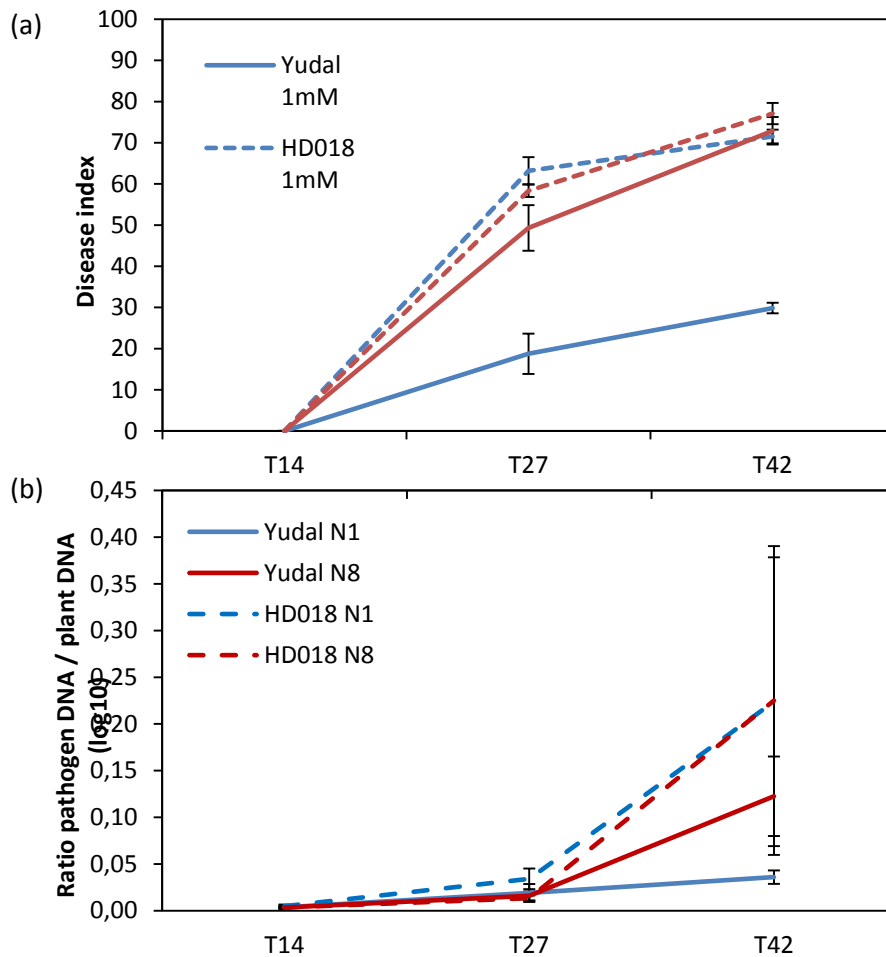


Figure 2: Impact of inoculation with eH isolate of *Plasmodiophora brassicae* on two *Brassica napus* genotypes, 'Yudal' and HD018, under two nitrogen supply, N1 and N8. (a) Disease index 14, 27 and 42 days post inoculation (dpi). (b) Ratio of pathogen DNA / plant DNA. For figure (a) and (b), 'Yudal' and HD018 are represented, respectively, as continuous and dotted lines. N8 and N1 supplies are represented, respectively, in red and blue.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

mismatch for 300 pb. The reads aligned to the *B. napus* genome were used to generate gene read counts based on *B. napus* annotation (Version 5) with FeatureCounts, version 1.5.0 (Liao *et al.*, 2014). For the counting, reads equally best mapped to more than one location in the reference genome, but below seven, were counted fractionally.

Differential expression

The R package EdgeR (Robinson *et al.*, 2010) was used to identify differential gene expression. The raw read counts, calculated with FeatureCount, were used as the input of EdgeR. Genes with an expression level below $0 \log^2$ CPM (Count Per Million) were removed. The signal for each gene was normalized using TMM (Trimmed Mean of M-values) and CPM normalization. Differential expression analyses were performed with EdgeR exact test, according to the evidence of (Schurch *et al.*, 2016).

III Results

Gall development was inhibited early under low-nitrogen in 'Yudal' with a delayed impact on relative pathogen content

Clubroot symptoms were undetectable at the first time-course point, 14 dpi, then increased between 27 dpi and 42 dpi (Figure 2a). Under high-nitrogen supply (N8 nutrient solution), 'Yudal' and HD018 displayed similar levels and kinetics of clubroot symptom development, reaching DI = 73 and DI = 77 at 42 dpi, respectively. Under low nitrogen supply (N1 nutrient solution) an early and significant reduction in macroscopic symptoms on 'Yudal' roots (DI = 19 at 27 dpi, then DI = 30 at 42 dpi), was observed relative to the N8. By contrast, in the HD018 genotype clubroot symptoms were identical regardless of fertilization treatment N1 (DI = 72 at 42 dpi) or N8 (DI = 77 at 42 dpi). Pathogen development in the earlier time-course point 14 dpi, *i.e.* before the actual development of gall symptoms, was checked by estimating the relative amount of pathogen and plant DNA by qPCR. Pathogen DNA was detected in all the samples from 14 dpi (Figure 2b), then the ratio between pathogen and plant DNA increased over time, reflecting the progressive multiplication of *P. brassicae* inside infected root cells up to 42 dpi. Relative amount of pathogen was not significantly different between genotypes or treatments at 14 dpi nor at 27 dpi. The relative amount of pathogen DNA was, however, significantly lower in 'Yudal' cultivated under N1 at 42 dpi. Collectively, these data indicated that the low-nitrogen triggered inhibition of gall development in 'Yudal' occurred during the early secondary infection, and actually preceded the break in pathogen multiplication that was finally observed during the latest stages of infection for this genotype under N1.

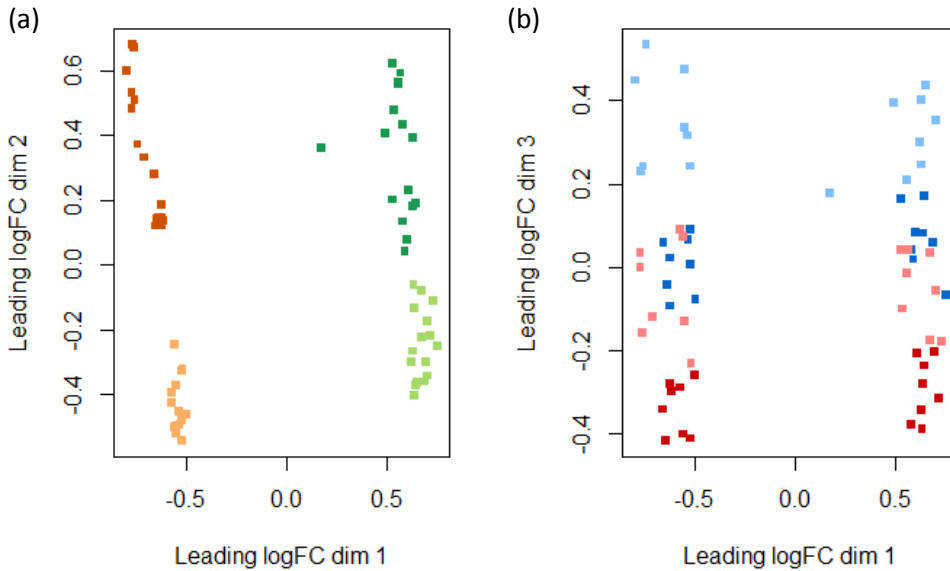


Figure 3: MultiDimensional Scaling (MDS) plot of RNA-seq data.

Distance between labels indicates similarity and dissimilarity between sample. (a) Representation of Genotype and inoculation factors in the first and the second dimension. HD018 non inoculated and inoculated are respectively represented in orange and dark orange. ‘Yudal’ non inoculated and inoculated are respectively represented in green and dark green. (b) Representation of fertilization and kinetic point factors in the first and the third dimension. N1 at 14 dpi and 27 dpi are respectively represented in dark red and red. N8 at 14 dpi and 27 dpi are respectively represented in dark blue and blue.

Supplementary Table 1: Number of reads paired-end sequenced for each sample.

Genotype	Inoculation	Nitrogen supply	Kinetic Point	Number of reads paired-end			
				A	B	C	D
HD018	Ni	N8	T14	47 155 273	53 074 195	40 699 389	56 852 848
HD018	Ni	N8	T27	46 592 747	47 449 264	50 886 569	33 204 068
HD018	Ni	N1	T14	51 202 714	50 411 263	51 452 969	57 457 922
HD018	Ni	N1	T27	47 317 771	51 393 224	55 666 226	37 456 286
HD018	eH	N8	T14	50 885 154	58 741 565	49 076 552	46 482 680
HD018	eH	N8	T27	40 169 305	53 505 943	49 473 241	42 161 914
HD018	eH	N8	T42	40 494 017	39 796 582	45 459 513	44 317 962
HD018	eH	N1	T14	75 344 527	46 994 860	44 527 696	42 693 999
HD018	eH	N1	T27	38 172 626	52 470 491	43 938 356	42 417 938
HD018	eH	N1	T42	36 850 764	38 268 888	39 243 324	49 215 506
Yudal	Ni	N8	T14	47 553 636	68 853 916	58 760 385	47 155 547
Yudal	Ni	N8	T27	47 453 623	47 886 867	54 212 081	36 885 045
Yudal	Ni	N1	T14	47 549 202	49 982 976	49 968 188	44 286 106
Yudal	Ni	N1	T27	33 998 436	46 366 391	47 225 324	37 522 289
Yudal	eH	N8	T14	50 628 672	62 761 854	44 752 212	43 704 267
Yudal	eH	N8	T27	48 648 281	38 785 529	43 561 191	42 928 895
Yudal	eH	N8	T42	36 124 629	34 631 399	40 428 502	44 833 327
Yudal	eH	N1	T14	34 146 898	46 936 534	43 862 697	38 158 890
Yudal	eH	N1	T27	44 514 521	44 003 548	41 841 272	35 188 049
Yudal	eH	N1	T42	42 275 490	25 255 846	39 880 075	42 118 689

Transcriptomic differences are mainly explained by the genotype, and to a lesser extent by the inoculation factor

The transcriptional regulation in 'Yudal' and HD018 was analyzed by RNA-seq at 14, 27 and 42 dpi according to inoculation factor (non-inoculation and inoculation) and fertilization factor (N1 and N8) (Supplementary Table 1). A total of 3 025 412 897 reads generated by 150-bp paired-end sequencing from the 64 samples (average of 47 272 076 reads per sample) were conserved after the quality control process ($Q > 30\%$ and read length > 50 bp). Approximately 92% of these reads (2.8 billion mapped reads) were aligned on the merged genomes of *B. napus* and *P. brassicae*. A similar distribution of the *B. napus* gene expression level was observed for the 64 samples, suggesting that no bias was introduced during the construction of cDNA libraries (Supplementary Figure 1). A total of 56,754 *B. napus* genes were considered as expressed ($\text{Log}_2\text{CPM} > 0$ in at least 4 samples).

The similarities and differences between RNA-seq samples were represented using MultiDimensional Scaling plot (Figure 3). This graphic representation method was used to control the homogeneity of biological replicates, and to discriminate the samples according to the tested factors (genotype, inoculation, and fertilization or time-course point). In our dataset, samples were clearly clustered according to the genotype factor along the first dimension of MDS, and according to the inoculation factor along the second one (Figure 3a). The first and second axis explained 49% and 11% of the total variance, respectively. The results of a differential analysis between HD018 and 'Yudal' samples at 14 dpi highlighted 3,599 genes expressed at a higher level in HD018 compared with 'Yudal' (mean logFC of 3.19) and 1,966 genes expressed at a higher level in 'Yudal' (mean logFC of 2.50) (Table I). At 27 dpi, 3,794 genes were expressed at a higher level in HD018 (mean logFC of 2.87) compared with 'Yudal', and 2,267 genes expressed at a higher level in 'Yudal' (mean logFC of 2.37). Inoculation was the second most influential factor on transcriptomic profiles, with 1,761 genes induced by inoculation at 14 dpi (mean logFC of 2.31) and 453 genes repressed (mean logFC of -1.46). At 27 dpi, 3,591 genes were up-regulated in eH-inoculated samples (mean logFC of 2.17) and 3,912 genes repressed (mean logFC of -1.48). Sample clustering along the third MDS axis reflected combinations of nitrate fertilization and time points (Figure 3b). This third dimension explained 7% of total variance observed.

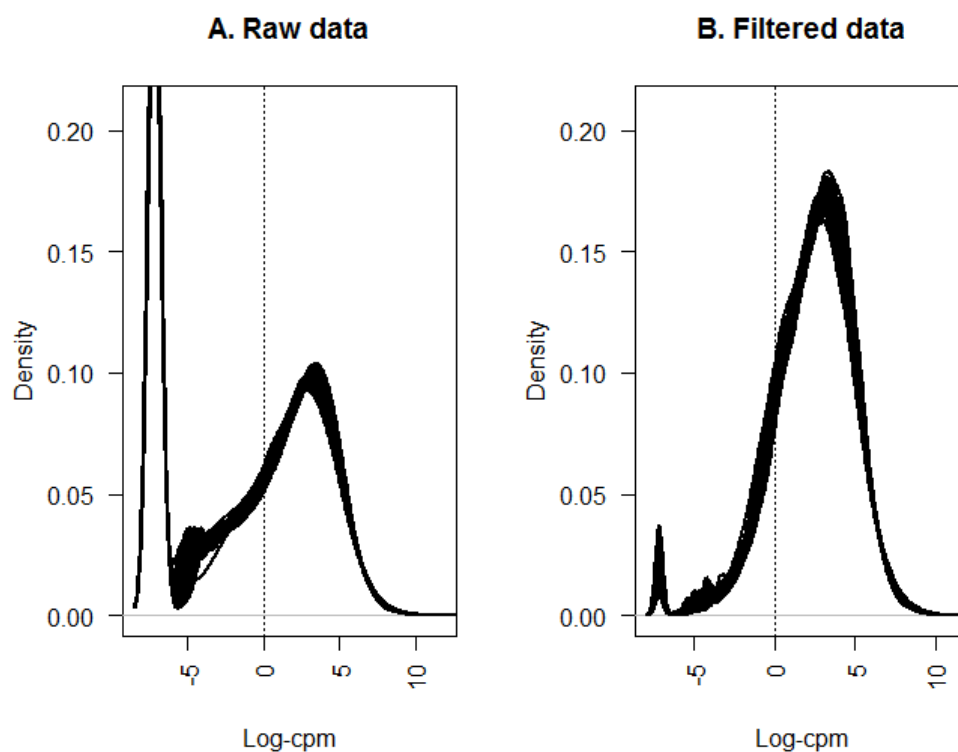
The pathogen induced similar salicylic acid-related responses in 'Yudal' and HD018, regardless of nitrogen supply

Under high nitrogen condition, clubroot infection in HD018 resulted in the transcriptional induction of 1,813 genes at 14 dpi, when 570 genes were repressed. At the same time point, 1,298

Table I: Summary of genes differentially expressed according to the three main factors studied, genotype, inoculation and nitrate supply.

The differential analyses were performed with all the samples of each condition.

	Up-regulated 14 dpi	Mean Log2FC	Down-regulated 14 dpi	Mean Log2FC	Up-regulated 27 dpi	Mean Log2FC	Down-regulated 27 dpi	Mean Log2FC
HD018 vs Yudal	3599	3.19	1966	2.5	3794	2.87	2267	2.37
eH vs Ni	1761	2.31	453	1.46	3591	2.17	3912	1.48
N1 vs N8	801	1.44	1409	1.62	578	1.37	1531	1.57



Supplementary Figure S1: Distribution of genes expression (a) before and (b) filtering of low expressed genes.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

genes were up-regulated and 208 were down regulated in 'Yudal' inoculated compared with 'Yudal' non-inoculated. An important proportion of these Differentially Expressed Genes (DEGs) was common to both genotypes (at 14 dpi, 1,125 and 147 genes were induced or repressed in both genotypes by the infection, respectively). This set of clubroot-triggered genes was found enriched in biological processes related to salicylic acid (SA) biosynthesis, systemic acquired resistance (SAR), protein phosphorylation/dephosphorylation, oxygen and reactive oxygen species metabolism, plant hypersensitive response and protein targeting to membrane. Among the genes repressed by the infection under the high-nitrogen condition, only a few biological processes were enriched; these biological processes were related to glucosinolate biosynthetic metabolism and cysteine biosynthetic metabolism.

At 27 dpi, 4,307 genes were induced and 5,346 were repressed by inoculation in HD018, versus 2,789 induced and 2,777 genes repressed by inoculation in 'Yudal'. A large proportion of the DEGs were common to both genotypes, 2,361 and 2,052 were up-regulated and down-regulated, respectively. Predicted functions of this set of clubroot-triggered genes were dominated by SA-related responses, with the addition of defense responses to fungi and bacteria, rRNA processing and cysteine biosynthesis. It should be highlighted, however, that about half of pathogen-induced genes with a fold change >10 did not have any homologue in the *Arabidopsis* genome. Clubroot-repressed gene patterns were related to root development, response to hormone and chemical stimuli, hormone biosynthesis and glucosinolate metabolism.

To get further validation regarding the importance of SA-related responses during plant response to clubroot infection, salicylic acid was quantified and the expression of a selection of classical SA-related marker genes was studied more specifically. SA content was increased in the inoculated roots in response to infection by *P. brassicae* under high-nitrogen condition (Figure 4). This accumulation was observed in both genotypes, for the two time points 14 dpi and 27 dpi. At 27 dpi for example, SA content in roots was 6.9 times higher following inoculation in HD018, and 4.5 times higher following inoculation in 'Yudal'. Accordingly, expression of typical SA-responsive gene markers was significantly higher in the inoculated root samples under high-nitrogen, compared with the non-inoculated root samples. Pathogen related (PR) genes, implicated in salicylic acid response, particularly the two gene copies of *PR1* and the gene *PR5*, were induced by infection under high-nitrogen condition with Log2FC values of 10.1, 10 and 5.5, respectively (Figure 4). Four copies of *NIMINI*, a NPR1-interacting protein involved in immune responses (Mohan *et al.*, 2016), were induced by pathogen infection (with a range of 2.04 to 4.71 of log2FC). Six *B. napus* orthologues of the *ISOCHORISMATE SYNTHASE (ICS)* from *A. thaliana*, coding a key enzyme of SA biosynthesis (Dempsey *et al.*, 2011), were induced by pathogen infection (with a range of 1.62 to 2.37 of log2FC). Two orthologs of the *ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY*

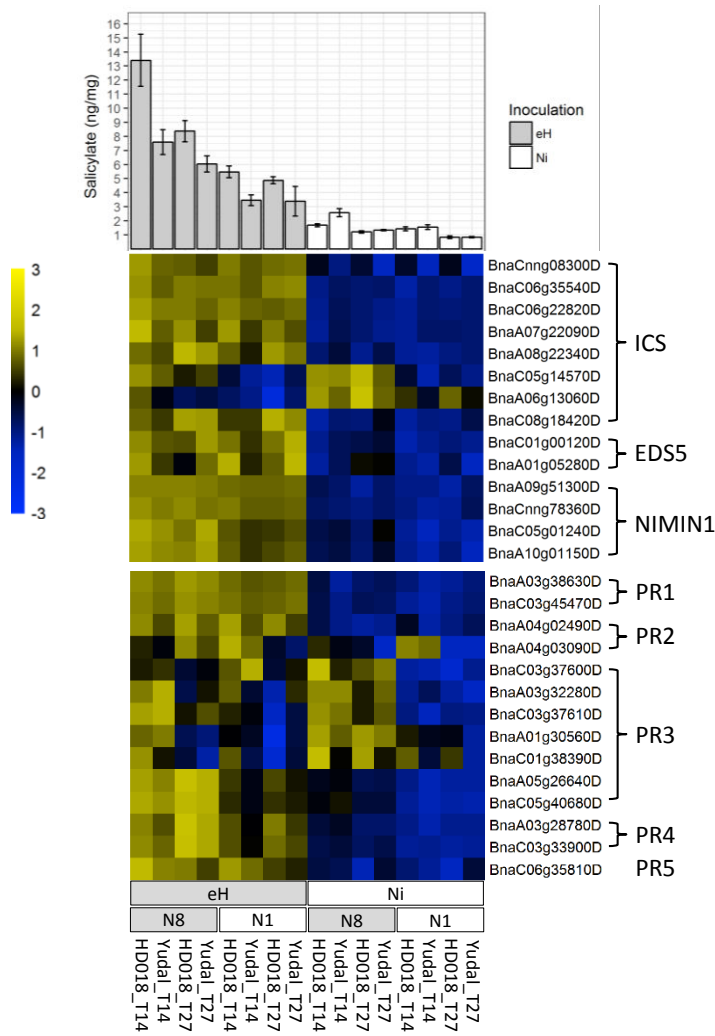


Figure 4: Salicylic acid (SA) response induced by *P. brassicae* inoculation. (a) SA content in root samples. (b) Expression of genes related to SA biosynthesis and SA resistance. The genes expression data (Log2CPM) were centered and reduced.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

5 (*EDS5*) gene from *A. thaliana* implicated in SA transport from chloroplast to cytoplasm were significantly up-regulated in inoculated roots (with a range from 1.47 and 0.72 of log₂FC).

SA-response was also observed in both genotypes under the low-nitrogen condition. In the N1 treatment, SA content was higher in inoculated root samples compared with non-inoculated root samples (3.8 and 5.8 times higher in HD018 at 14 dpi and 27 dpi, respectively, and 2.3 and 4.0 times higher in 'Yudal' at 14 dpi and 27 dpi respectively, than, in not-inoculated roots). Likewise, the gene copies of *ICS*, *EDS5* and *NIMIN*, implicated in SA biosynthesis, and the genes copies of *PRI* and *PR5*, implicated in SA response, were also up-regulated under N1 in inoculated root samples compared with non-inoculated root samples. However, as under the high-nitrogen condition, SA-response level was similar for both genotypes 'Yudal' and HD018. Thus, hormone profiling and transcriptomic data gave no support to the hypothesis that resistance to clubroot in 'Yudal' under low N could be related to the extent of SA-responses.

Variations in nitrate supply did not trigger defense and induced similar metabolic responses in 'Yudal' and HD018, when non-inoculated

About a half of gene regulations provoked by the variation of nitrate supply were common to the two genotypes, with an intersection set of 299 N1-upregulated genes and 660 N1-down-regulated genes. Among those sets of genes, *Arabidopsis* homologues and putative functions were identified for 243 and 483 genes, respectively. A singular enrichment analysis using AgriGo highlighted an enrichment of N1-upregulated genes for GO categories focused an ion transport. N1-downregulated genes were enriched for GO categories associated with wider range of processes related to primary metabolism: amino acids, nitrate transport, glucoside biosynthesis, response to hexose stimulus and response to nitrate. At 27 dpi, a large proportion of N1-regulated genes observed in HD018 were also observed in 'Yudal', with 419 (353 with known putative function) over 774 N1-induced genes, and 939 (229 with putative function) over 1,285 N1-repressed genes.

A surprisingly low number of genes connected to nitrogen homeostasis were induced by low nitrogen, most significantly being: BnaC07g36810D and BnaA03g44820D (encoding NRT1-8), BnaC03g56990D (encoding NRT1-5), and BnaC02g06830D (encoding an amino transporter homologue to At5G16740). N1 treatment also resulted in the induction of three cytosolic copper/zinc-SUPEROXIDE DISMUTASE 1 encoding genes (BnaA09g48720D, BnaC08g42970D and BnaC05g06430D), and two cupredoxin encoding genes BnaA06g32330D and BnaC07g24070D, to significant expression levels. Moreover, a remarkably high number of genes unambiguously related to photosynthetic processes were induced by low nitrogen condition in both genotypes. This included >100 genes encoding for a variety of photosystem I subunits, light harvesting complex proteins, small subunit 1 from RUBISCO, PSII oxygen evolving complex.

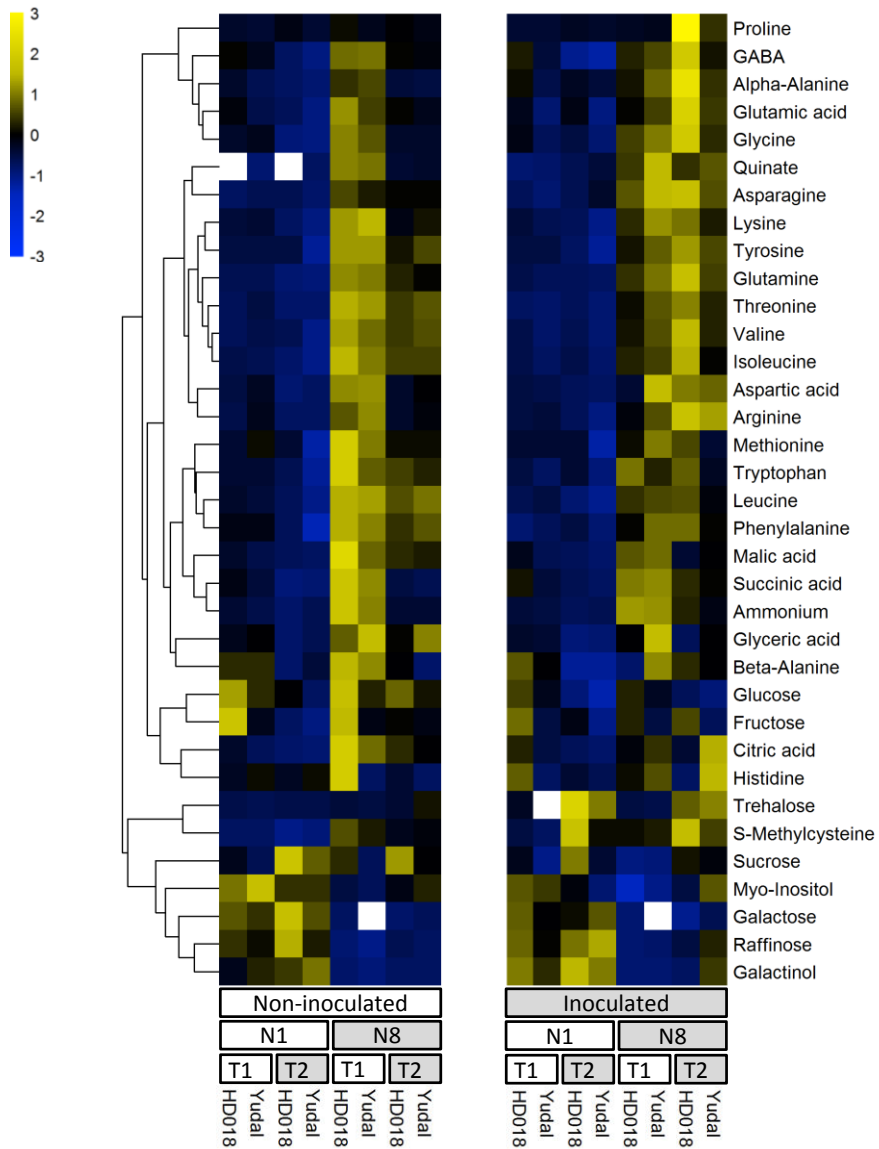


Figure 5: Primary metabolites (amino acids, non-structural carbohydrates, polyols and organic acids) regulation in response to nitrate fertilization and *P. brassicae* infection.

Data of metabolites content were centered and reduced.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

Despite, the induction of these genes under N1 being statistically significant, however absolute transcription levels remained low (cpm < 6). This phenomenon may be related to a marginal greening induced by N1-treatment at the root-hypocotyl junction.

Among the most noticeable N1-repressed genes in the two genotypes were the four *B. napus* copies encoding FSD1 (a chloroplastic Fe-superoxide dismutase), two out of the four copies encoding the iron-metalloreductase FRO5, and the two copies encoding the nicotianamine-metal transporter YSL2 in the *B. napus* genome. Two of the three *B. napus* genes encoding the glucosidase BGL1, involved in ABA-remobilization, were repressed. N1 also led the repression of the two LOX2 encoding genes BnaA07g38550D and BnaCnng38630D, the JAR1 encoding gene BnaA03g21360D (involved in the synthesis of jasmonoyl-isoleucine bioactive conjugate hormone), and two of the three 11/12-hydroxyjasmonate sulfotransferase 2A (ST2A) encoding genes, thus highlighting a possible regulation of some aspects of jasmonate signaling in long-term N1-deprived roots.

To expand further on the hypothesis that the two genotypes responded similarly to the variations in the nitrogen supply, primary metabolite profiling was analyzed in root samples. Very few metabolic differences were identified between the two non-inoculated genotypes (Figure 5). In both 'Yudal' and HD018, high nitrogen supply was associated with elevated root content of a series of 12 amino acids (β -alanine, asparagine, tryptophan, methionine, leucine, phenylalanine, glutamine, threonine, valine, isoleucine, lysine, tyrosine) and four other primary metabolites (glyceric acid, quinic acid, succinic acid and ammonium). Low nitrogen was associated with the accumulation of galactose, galactinol, raffinose and myo-inositol. Thus, from a metabolic point of view, both genotypes displayed very similar responses to nitrogen deficiency in the absence of pathogen infection.

Metabolic profiling also highlighted a clubroot-triggered accumulation of trehalose and S-methyl-cysteine in both genotypes, two marker metabolites of clubroot infection that have been previously reported (Wagner *et al.*, 2012). Both metabolites were accumulated to a lower extent in 'Yudal' under N1, compared with the three other inoculated modalities. Thus, the reduced development of clubroot symptoms in this condition was associated with a reduced infection-triggered accumulation of metabolic disease markers. However, we did not identify any pathogen-triggered modification of primary metabolite content that would have been specific to low-nitrogen induced resistance response in 'Yudal'.

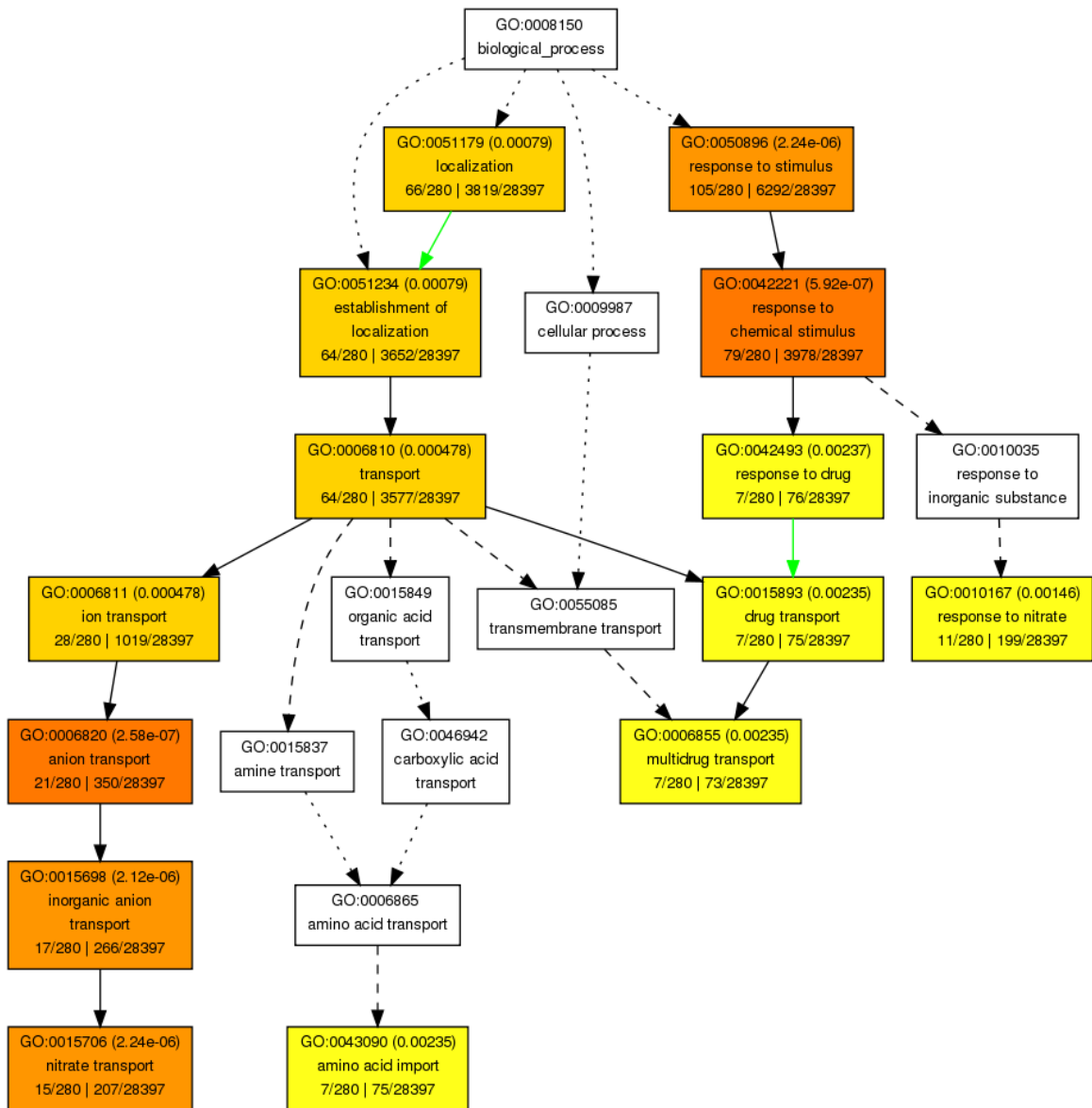


Figure 6: Singular enrichment analysis of the candidate genes differentially expressed in ‘Yudal’ N1 inoculated compared to the other inoculated samples at 27 dpi.
The threshold of significant biological process was FDR 0.01.

A set of genes associated with nitrate assimilation processes was specifically induced in 'Yudal' by the dual constraint N1 x inoculation

A set of DEGs associated with the resistance-induced in 'Yudal' under N1 was selected according to three differential comparisons, two by two: the significant differential expression between 'Yudal' N1 inoculated versus 'Yudal' N8 inoculated, HD018 N1 inoculated and HD018 N8 inoculated. To be selected, genes had to show the same regulation pattern for the three significant differential expressions and a log₂FC lower than -1 or higher than 1. At 14 dpi, 259 DEGs were selected: 88 were expressed at a higher level and 171 were expressed at lower level in 'Yudal' N1 inoculated compared with the other inoculated samples. At 27 dpi, 945 DEGs were selected: 451 were expressed at a higher level, and 494 at a lower level in 'Yudal' N1 compared to all other conditions. Among these genes, 24 were up-regulated and 42 were down-regulated at both time-course points in 'Yudal' N1. At 14 dpi, no biological processes were enriched in the set of genes specifically induced by infection in 'Yudal' N1. At this time point, genes specifically repressed by infection in 'Yudal' N1 were enriched in functions associated with defense and responses to pathogens. This specific inhibition of defense related function in 'Yudal' N1 was not observed any more at 27 dpi. At this time point, the set of 451 genes specifically induced in 'Yudal' was enriched in functions related to nitrate response and nitrate transport (Figure 6). This included a series of homeologues encoding for inducible high affinity nitrate transporters *NRT2.1*, *NRT2.2* and *NRT2.3* (9 copies), the interaction partner of NRT2 for nitrate assimilation, *NAR2.1* (5 copies), nitrate reductase encoding genes *NR* (2 copies), nitrate transporters *NRT1.1* and *NRT1.7* (2 copies), ammonium transporters *AMT1* (2 copies) and nitrite reductases *NIR* (3 copies) (Figure 7). Among these genes, the regulation pattern of *NRT2*, *NAR2.1* and *NR* copies was atypical. These genes were specifically induced in the 'Yudal' N1 inoculated condition at 27 dpi compared to all the other conditions (Figure 8). A similar pattern of regulation was also detected for a set of genes related to auxin response, among which an auxin efflux carrier family protein, *PILS7* (5 copies) and two genes encoding auxin response proteins, *SAUR30* (1 copy) and *SAUR59* (1 copy).

IV Discussion

Low-nitrogen conditional resistance in Yudal relies primarily on a reduction in gall development, before influencing pathogen growth-rate

A striking feature of N1-conditional resistance to isolate eH in 'Yudal' was the early reduction of symptoms at a time point (27 dpi) when relative pathogen DNA content was similar in the two genotypes. The work of Cao *et al.* (2014) had also previously confronted data from *P. brassicae* DNA quantification and clubroot disease index, similarly revealing that the two genotypes P2008-10 and ECD13 displayed contrasted DI (about 60 and 20, respectively), in spite

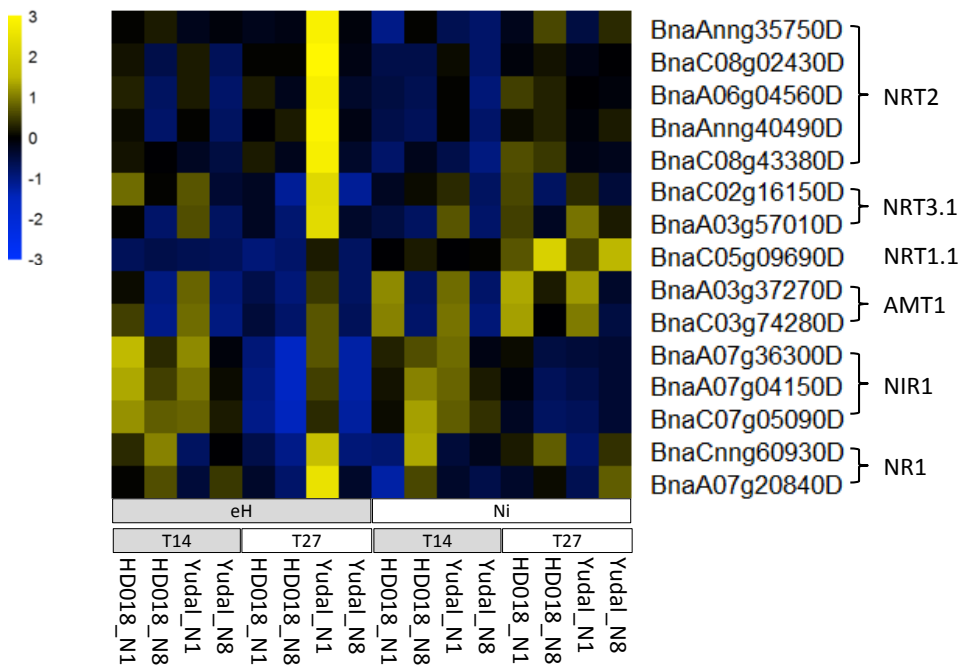


Figure 7: Genes up regulated in ‘Yudal’ N1 inoculated expression related to nitrate or auxin response compared to the other inoculated samples at 27 dpi.

(a) Nitrate response and transport. (b) auxin response. The genes expression data (Log2CPM) were centered and reduced.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

of similar amounts of pathogen DNA during the course of infection. In the context of post-invasive partial resistance to clubroot, assessing the causal relationships between pathogen development and symptom development is a complex issue, full of putative reciprocal feedbacks. From one side, as pathogen infection is the primary cause of club symptom development, defense responses devoted to direct inhibition of the pathogen would ultimately result in symptom reduction. However, on the other side, *P. brassicae* development depends on the niche of hypertrophied root cells. In this second perspective, any plant response that would reduce the development of symptoms may ultimately result in the reduction of pathogen development. In the present work, N1-triggered reduction of symptom development in inoculated roots of 'Yudal' was visible from 27 dpi and preceded the reduction of root pathogen content at 42 dpi, thus suggesting the second scenario. Low nitrogen conditional resistance of 'Yudal' could be a tolerance process, reducing the rate of symptoms that can trigger *P. brassicae*. The reduction of pathogen development would be a later consequence of this tolerance process. This conclusion can be put in line with the resistance to isolate eH in the *Arabidopsis* accession Bur-0. In this model, the resistance QTL *PbAt1* exerted a partial effect on symptoms at 21 dpi, without reduction of pathogen DNA-content. This contrasted with another QTL, *PbAt5.2*, exerting concomitant effects on symptoms and pathogen DNA content (Lemarié *et al.*, 2015). This may suggest that, in a given genotype, these can coexist a combination of genetic factors contributing to complex interlacements of mechanisms collectively leading to direct and indirect inhibition of pathogen and symptoms.

No specific response to low nitrogen in 'Yudal' seems to reduce nutritional value or induce defense priming

Low-nitrogen condition led a high modulation of primary metabolism, similar in both genotypes, when non-inoculated and inoculated. The reduction of many amino acids and few other primary metabolites (glyceric acid, quinic acid, succinic acid and ammonium) content under low-nitrogen was previously described in non-inoculated *B. napus* leaves and roots (Gerendas and Sattelmacher, 1999; Tilsner *et al.*, 2005). In addition to the global effect of nitrogen supply on the primary metabolite content, we observed two different evolutions of their content between non-inoculated and inoculated samples under high-nitrogen during the test. In fact, the global content of primary metabolites was higher in non-inoculated samples at 14 dpi, and higher in inoculated samples at 27 dpi. A higher content of primary metabolites was previously observed in a susceptible genotype inoculated with *P. brassicae* at 42 dpi (Wagner *et al.*, 2012). Due to the positive correlation between primary metabolites content and susceptibility level, this regulation was attributed to *P. brassicae* biotrophic life style. The transcriptional response to nitrate, observed in the present work, was more difficult to compare with previous studies. Many transcriptomic works are available about early responses to nitrate in *A. thaliana* (reviewed in Canales *et al.*, 2014). None

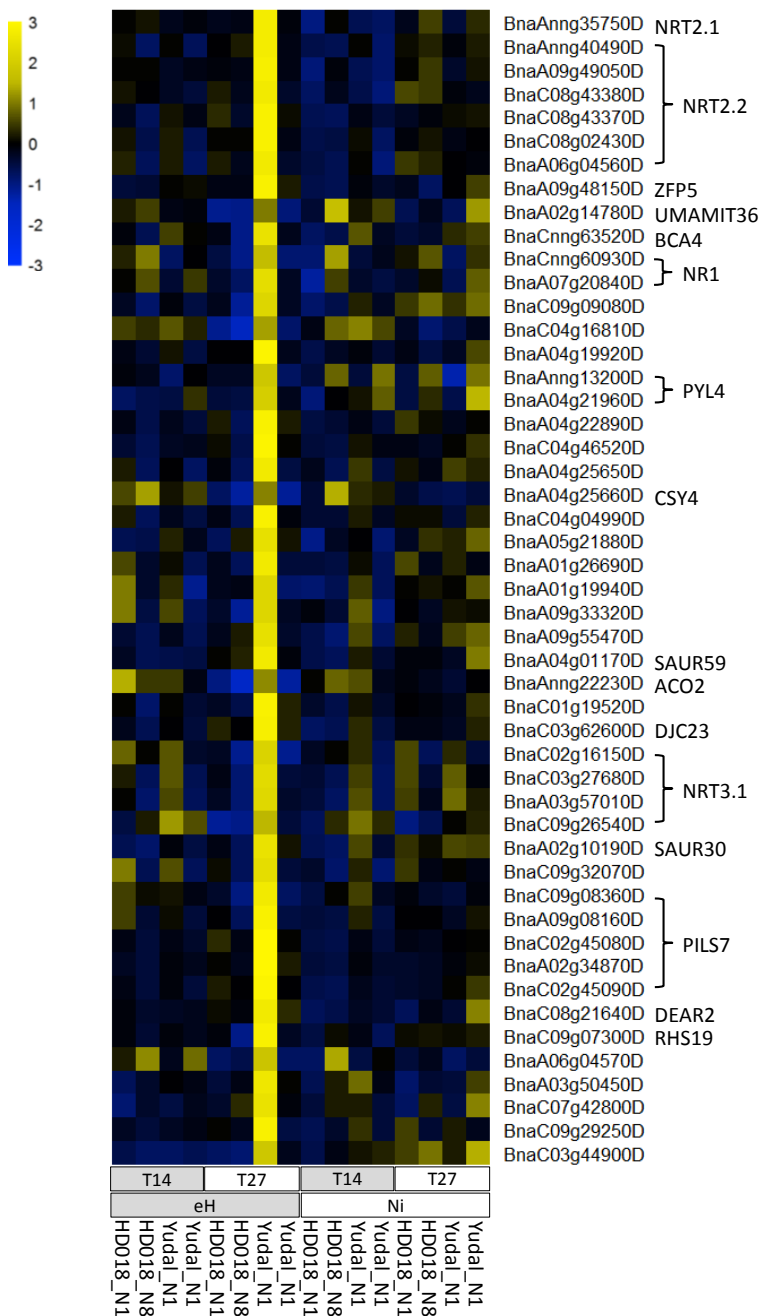


Figure 8: Top 50 of more induced genes in 'Yudal' N1 inoculated compared to the other samples at 27 dpi.
 The genes expression data (Log2CPM) were centered and reduced.

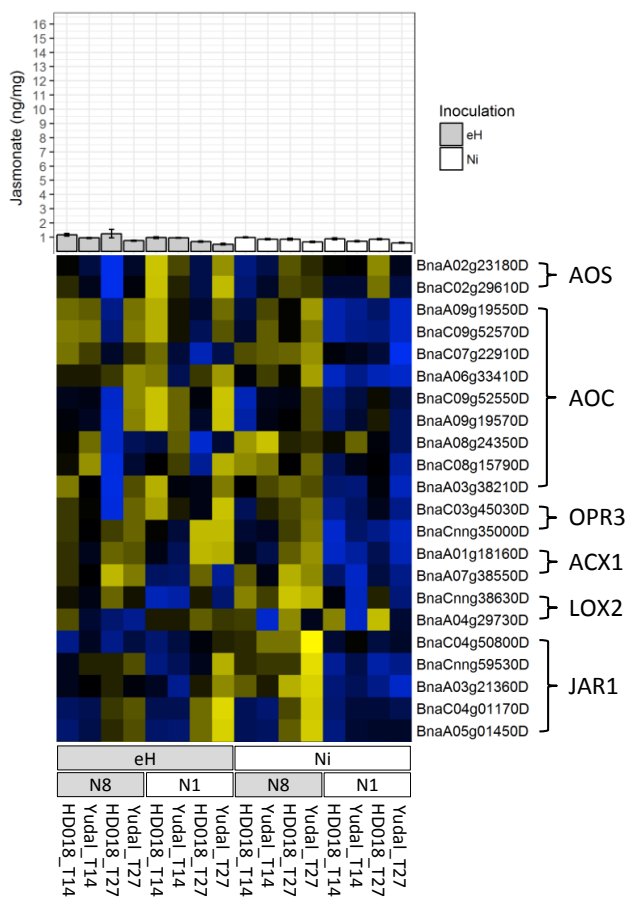
Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

out of the top 50 most consistent genes regulated in early response to nitrate highlighted by (Canales *et al.*, 2014), based on 11 *A. thaliana* studies, were observed in our study. By contrast, Krapp *et al.* (2011) investigated long-term transcriptional responses in roots and shoots of plants challenged with 2 or 10 days of nitrate deficiency. Interestingly, several genes identified as induced or repressed after a 10 day-stress, in this work, were similarly regulated in our dataset. Most striking was the large repression of Fe-Superoxide Dismutase encoding genes (At4g25100 in *Arabidopsis* and its four homologues in *B. napus*), and the repression of under nitrogen deficiency, and the induction of NRT2.5 encoding genes (At1g12940 and *B. napus* homologue genes) and of genes encoding a nodulin MtN21-EamA_like protein (At1g21890 and *B. napus* homologue genes). The similarities between *Arabidopsis* and rapeseed for long-term responses to nitrogen deficiency are of particular interest for future functional studies in this research field. Although NRT2.5 has been proposed to play roles in sieve loading and root-to-shoot translocation of nitrate (Lezhneva *et al.*, 2014), additional work is still needed to further understand how this set of transcriptional regulations may contribute to long-term acclimation to low nitrogen availability.

Although jasmonate responses have been previously shown to play roles in basal defense to clubroot in the *Arabidopsis* accession Col-0 (Gravot *et al.*, 2012, Lemarié *et al.*, 2015), clubroot infection in the *B. napus* genotypes studied here did not induce any of the classical JA-response markers (Supplementary Figure 2). This may reflect an antagonism caused by the large induction of SA-responses in these two accessions. The role of SA responses in partial resistance to clubroot has been reported previously (Jubault *et al.*, 2013; Lemarié *et al.*, 2015a). Moreover, several works have reported that SA treatment induces a significant reduction in clubroot symptoms (Agarwal *et al.*, 2011; Lovelock *et al.*, 2013; Lemarié *et al.*, 2015a). According to the previous results, and due to similar level of PR up-regulation in the inoculated samples, SA response could be associated with a non-negligible level of basal resistance in both 'Yudal' and HD018. Although we conclude that SA-responses do not seem to contribute to the low nitrogen-conditional resistance of 'Yudal', the present work still offers a comprehensive view on the *B. napus* repertoire of SA-driven genes involved during clubroot infection, shedding light on the sub-functionalization of homeologous copies in the *B. napus* genome.

Specific up-regulated genes in Yudal under low-nitrogen at 27 dpi were related to nitrate and auxin response

Our work led to the identification of a set of genes whose regulation pattern was highly connected with the resistance-triggered by low-nitrogen condition in 'Yudal'. This set of genes was composed of nitrate transporters (*NRT2.1*, *NRT2.2* and *NRT3.1*), nitrate reductase (*NRI*) and auxin related genes (*PILS7*, an auxin efflux carrier family protein, and SAUR30 and SAUR59, two small auxin up-regulated RNA). The NRT2 proteins have all been characterized as influx high



Supplementary Figure 2: Absence of jasmonate (JA) response induced by *P. brassicae* inoculation.

(a) JA content in root samples. (b) Expression of genes related to JA biosynthesis. The genes expression data (Log2CPM) were centered and reduced.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

affinity transport systems (HATS) and most of them interact with *NRT3.1* (O'Brien *et al.*, 2016). Two *NRT2* genes have been also identified as players in plant defense responses, *NRT2.1* and *NRT2.6*. A deletion in the high affinity nitrate transporter *NRT2.1* in *Arabidopsis* results in a reduced susceptibility to *Pseudomonas syringae* by two different mechanisms, 1/ SA priming and 2/ an interference with effector triggered susceptibility (Camañes *et al.*, 2012). Also in *Arabidopsis*, *NRT2.6* was found to be induced by the phytopathogenic bacterium *Erwinia amylovora* (Dechorgnat *et al.*, 2012). Interestingly, plants with a decreased *NRT2.6* expression showed a lower tolerance to pathogen attack. A correlation was found between *NRT2.6* expression and ROS species accumulation in response to infection by *E. amylovora* and treatment with the redox-active herbicide methyl violagen, suggesting a probable link between *NRT2.6* activity and the production of ROS in response to biotic and abiotic stress.

No study has yet highlighted the roles of the auxin-signaling related genes *PILS7*, *SAUR30* and *SAUR59* during plant-pathogen interactions. Moreover, the role of auxin has been consistently reported as a major feature of clubroot disease (Ludwig-Müller *et al.*, 1996; Siemens *et al.*, 2006; Jubault *et al.*, 2013), but only a paucity of works have reported that allelic variations affecting auxin signaling could influence clubroot development. Thus, these genes are interesting candidates for future functional studies.

Possible roles of NRT2 and auxin-related genes in mediating N1-triggered resistance to clubroot

NRT2 proteins were first described for their implication in the nitrate influx in low N concentration condition. In *A. thaliana*, *NRT2.1* appears to be by far the main component of the HATS for root uptake under most conditions, with exception of severe N starvation (Cerezo *et al.*, 2001; Filleur *et al.*, 2001). *NRT2* proteins are generally unable to transport nitrate on their own, but need to interact with the partner protein *NRT3.1* (Kotur *et al.*, 2012). In addition to the nitrate transport function, nitrate transporters have been evidenced to be involved in nitrate sensing (Ho *et al.*, 2009; Gojon *et al.*, 2011). *NRT2.1* has been shown to modify lateral root development independent of nitrate transport and thus act as a transceptor (Little *et al.*, 2005). Auxin, one of the most investigated classes of plant hormones, is involved in many aspects of plant growth and development. Many studies suggest a pivotal role of auxin in primary root, lateral root and root hair development (Osmont *et al.*, 2007; Benfey *et al.*, 2010; Overvoorde *et al.*, 2010). Auxin transporters, such as *PILS7*, were implicated in gradient formation or local accumulation to induced auxin response. Moreover, the auxin response during clubroot infection was highlighted by transcriptomic (Siemens *et al.*, 2006; Jubault *et al.*, 2013) and metabolomic studies (Raa, 1971; Butcher *et al.*, 1974; Kavanagh and Williams, 1981; Rausch *et al.*, 1983; Ludwig-Müller *et al.*, 1996; Grsic *et al.*, 1999; Ugajin *et al.*, 2003). These effects on root development were consistent with the effect of 'Yudal' resistance triggered by low-nitrogen on gall development.

The transcriptional up-regulation of nitrate transporter genes such as *NRT2.1* and *NRT2.2* is modulated by a systemic signal, the N-demand signal. Small secreted peptides, mediating the long-distance signaling to coordinate root response according to needs for N, were identified in *A. thaliana*, C-terminally encoded peptide (CEP) family (Ohyama *et al.*, 2008; Delay *et al.*, 2013; Roberts *et al.*, 2013; Tabata *et al.*, 2014) and CEP DOWNSTREAM (Ohkubo *et al.*, 2017). The *Arabidopsis* genome includes 11 genes (*CEP1* through *CEP11*) encoding secreted polypeptides containing well-conserved 15–amino acid CEP domains and an additional 4 genes that may encode CEP-like peptides (*CEP12* through *CEP15*). CEP were expressed in roots and shot, into the cells close to vascular tissue. These genes were up-regulated by N starvation and interact with C-terminal peptide receptor (CEPR1 and CEPR2). CEPR genes were expressed in shoot and roots and the knockout of these two genes in *A. thaliana* shoot cancelled the response to nitrogen starvation and CEP up-regulation. Interaction between CEP and CEPR regulated the CEPD gene expression in shoot. Two copies of *CEPD* were identified in the *A. thaliana* genome and they were highly expressed in shoots compared with roots. The knockout of *CEPR* and *CEPD* canceled the up-regulation of *NRT2.1* normally induced by N starvation and CEP up-regulation. Moreover, regulation induced by *CEP* and *CEPD* was dose-dependent. In our data, no relation between expression of *CEP*, *CEPR* and *CEPD* genes and *NRT2.1* and *NRT2.2* genes was observed in roots.

V Conclusion

To summarize: (1) our data suggest that low nitrogen conditional resistance in 'Yudal' relies at first on an early reduction of the rate of gall development, which ultimately causes a reduction of pathogen development during the latest stages of the infection; (2) nitrogen supply exerted a relatively weak influence on root transcriptional responses on the studied time points, compared with the influence of genotype and inoculation factors. About half of those nitrogen-driven transcriptional regulations were common between 'Yudal' and HD018, thus suggesting that the influence of nitrogen was similar in the two plant genotypes; (3) nitrogen constraint did not seem to exert any influence on constitutive defenses *per se*, with the exception of an inhibition of basal expression of a series of genes associated to the biosynthesis of jasmonate, in the two plant genotypes; (4) low-nitrogen conditional resistance in 'Yudal' was found associated with the induction of series of *NRT2.2* and genes related to inorganic nitrogen acquisition, and with auxin-related genes. Additional work is needed to further understand the possible roles of these regulations in inhibiting the development of galls.

VI References

Agarwal A., Kaul V., Faggian R., Rookes J.E., Ludwig-Müller J., Cahill D.M. (2011) Analysis of global host gene expression during the primary phase of the *Arabidopsis thaliana*–*Plasmodiophora brassicae* interaction. *Functional Plant Biology* 38:462–478.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

- Albert B., Le Cahérec F., Niogret M.-F., Faes P., Avice J.-C., Leport L., Bouchereau A. (2012) Nitrogen availability impacts oilseed rape (*Brassica napus* L.) plant water status and proline production efficiency under water-limited conditions. *Planta* 236:659–676.
- Ballini E., Nguyen T.T., Morel J.-B. (2013) Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. *Rice* 6:32.
- Benfey P.N., Bennett M., Schiefelbein J. (2010) Getting to the root of plant biology: impact of the *Arabidopsis* genome sequence on root research. *The Plant Journal* 61:992–1000.
- Bolton M.D., Thomma B.P.H.J. (2008) The complexity of nitrogen metabolism and nitrogen-regulated gene expression in plant pathogenic fungi. *Physiological and molecular plant pathology* 72:104–110.
- Buczacki S.T., Toxopeus H., Mattusch P., Johnston T.D., Dixon G.R., Hobolth L.A. (1975) Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach. *Transactions of the British Mycological Society* 65:295–303.
- Butcher D.N., El-Tigani S., Ingram D.S. (1974) The role of indole glucosinolates in the club root disease of the Cruciferae. *Physiological Plant Pathology* 4:127–140.
- Camañes G., Pastor V., Cerezo M., García-Agustín P., Flors Herrero V. (2012) A deletion in the nitrate high affinity transporter NRT2.1 alters metabolomic and transcriptomic responses to *Pseudomonas syringae*. *Plant signaling & behavior* 7:619–622.
- Canales J., Moyano T.C., Villarroel E., Gutiérrez R.A. (2014) Systems analysis of transcriptome data provides new hypotheses about *Arabidopsis* root response to nitrate treatments. *Frontiers in plant science* 5:22.
- Cao T., Rennie D.C., Manolii V.P., Hwang S.F., Falak I., Strelkov S.E. (2014) Quantifying resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Brassica hosts. *Plant pathology* 63:715–726.
- Cerezo M., Tillard P., Filleur S., Muñoz S., Daniel-Vedele F., Gojon A. (2001) Major alterations of the regulation of root NO₃- uptake are associated with the mutation of Nrt2.1 and Nrt2.2 genes in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 127:262–271.
- Chalhoub B., Denoeud F., Liu S., Parkin I.A.P., Tang H., Wang X., Chiquet J., Belcram H., Tong C., Samans B., Corrêa M., Da Silva C., Just J., Falentin C., Koh C.S., Le Clainche I., Bernard M., Bento P., Noel B., Labadie K., Alberti A., Charles M., Arnaud D., Guo H., Daviaud C., Alamery S., Jabbari K., Zhao M., Edger P.P., Chelaifa H., Tack D., Lassalle G., Mestiri I., Schnell N., Le Paslier M.-C., Fan G., Renault V., Bayer P.E., Golicz A.A., Manoli S., Lee T.-H., Thi V.H.D., Chalabi S., Hu Q., Fan C., Tollenaere R., Lu Y., Battail C., Shen J., Sidebottom C.H.D., Wang X., Canaguier A., Chauveau A., Bérard A., Deniot G., Guan M., Liu Z., Sun F., Lim Y.P., Lyons E., Town C.D., Bancroft I., Wang X., Meng J., Ma J., Pires J.C., King G.J., Brunel D., Delourme R., Renard M., Aury J.-M., Adams K.L., Batley J., Snowdon R.J., Tost J., Edwards D., Zhou Y., Hua W., Sharpe A.G., Paterson A.H., Guan C., Wincker P. (2014) Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345:950–953.
- Chen J., Pang W., Chen B., Zhang C., Piao Z. (2015) Transcriptome analysis of *Brassica rapa* near-isogenic lines carrying clubroot-resistant and -susceptible alleles in response to *Plasmodiophora brassicae* during early infection. *Frontiers in plant science* 6:1183.
- Dechorgnat J., Patrit O., Krapp A., Fagard M., Daniel-Vedele F. (2012) Characterization of the Nrt2.6 gene in *Arabidopsis thaliana*: a link with plant response to biotic and abiotic stress. *PLoS one* 7:e42491.
- Delay C., Imin N., Djordjevic M.A. (2013) CEP genes regulate root and shoot development in response to environmental cues and are specific to seed plants. *Journal of experimental botany* 64:5383–5394.
- Dempsey D.A., Vlot A.C., Wildermuth M.C., Klessig D.F. (2011) Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis book* 9:e0156.
- Devos S., Laukens K., Deckers P., Van Der Straeten D., Beeckman T., Inzé D., Van Onckelen H., Witters E., Prinsen E. (2006) A hormone and proteome approach to picturing the initial metabolic events

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

- during *Plasmodiophora brassicae* infection on *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions* 19:1431–1443.
- Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29:15–21.
- Dordas C. (2009) Role of nutrients in controlling plant diseases in sustainable agriculture: a review. *Sustainable Agriculture* 443–460.
- Fagard M., Launay A., Clément G., Courtial J., Dellagi A., Farjad M., Krapp A., Soulié M.-C., Masclaux-Daubresse C. (2014) Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of experimental botany* 65:5643–5656.
- Fähling M., Graf H., Siemens J. (2003) Pathotype Separation of *Plasmodiophora brassicae* by the Host Plant. *Journal of Phytopathology* 151:425–430.
- Fan S., Wang X., Li P., Zhang Q., Zhang W. (2011) Simultaneous determination of 13 phytohormones in oilseed rape tissues by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry and the evaluation of the matrix effect. *Journal of separation science* 34:640–650.
- Filleur S., Dorbe M.-F., Cerezo M., Orsel M., Granier F., Gojon A., Daniel-Vedele F. (2001) An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS letters* 489:220–224.
- Foisset N., Delourme R., Barret P., Hubert N., Landry B.S., Renard M. (1996) Molecular-mapping analysis in *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on a doubled-haploid progeny. *Theoretical and applied genetics* 93:1017–1025.
- Gerendas J., Sattelmacher B. (1999) Influence of Ni supply on growth and nitrogen metabolism of *Brassica napus* L. grown with NH₄ NO₃ or urea as N source. *Annals of botany* 83:65–71.
- Gojon A., Krouk G., Perrine-Walker F., Laugier E. (2011) Nitrate tranceptor(s) in plants. *Journal of experimental botany* 62:2299–2308.
- Gravot A., Deleu C., Wagner G., Lariagon C., Lugan R., Todd C., Wendehenne D., Delourme R., Bouchereau A., Manzanares-Dauleux M.J. (2012) Arginase induction represses gall development during clubroot infection in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology* 53:901–911.
- Grsic S., Kirchheim B., Pieper K., Fritsch M., Hilgenberg W., Ludwig-Müller J. (1999) Induction of auxin biosynthetic enzymes by jasmonic acid and in clubroot diseased Chinese cabbage plants. *Physiologia plantarum* 105:521–531.
- Hacquard S., Kracher B., Hiruma K., Münch P.C., Garrido-Oter R., Thon M.R., Weimann A., Damm U., Dallery J.-F., Hainaut M., Henrissat B., Lepinet O., Sacristán S., Ver Loren van Themaat E., Kemen E., McHardy A.C., Schulze-Lefert P., O'Connell R.J. (2016) Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nature communications* 7:11362.
- Hatakeyama K., Niwa T., Kato T., Ohara T., Kakizaki T., Matsumoto S. (2017) The tandem repeated organization of NB-LRR genes in the clubroot-resistant CRb locus in *Brassica rapa* L. *Molecular genetics and genomics* 292:397–405.
- Ho C.-H., Lin S.-H., Hu H.-C., Tsay Y.-F. (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138:1184–1194.
- Huber D.M., Watson R.D. (1974) Nitrogen form and plant disease. *Annual review of phytopathology* 12:139–165.
- Jubault M., Lariagon C., Simon M., Delourme R., Manzanares-Dauleux M.J. (2008) Identification of quantitative trait loci controlling partial clubroot resistance in new mapping populations of *Arabidopsis thaliana*. *Theoretical and applied genetics* 117:191–202.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

- Jubault M., Lariagon C., Taconnat L., Renou J.-P., Gravot A., Delourme R., Manzanares-Dauleux M.J. (2013) Partial resistance to clubroot in *Arabidopsis* is based on changes in the host primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity. *Functional & integrative genomics* 13:191–205.
- Kageyama K., Asano T. (2009) Life Cycle of *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of plant growth regulation* 28:203–211.
- Kavanagh J.A., Williams P.H. (1981) Indole auxins in *Plasmodiophora* infected cabbage roots and hypocotyls. *Transactions of the British Mycological Society* 77:125–129.
- Kotur Z., Mackenzie N., Ramesh S., Tyerman S.D., Kaiser B.N., Glass A.D.M. (2012) Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *The New phytologist* 194:724–731.
- Krapp A., Berthomé R., Orsel M., Mercey-Boutet S., Yu A., Castaings L., Elftieh S., Major H., Renou J.-P., Daniel-Vedele F. (2011) *Arabidopsis* roots and shoots show distinct temporal adaptation patterns toward nitrogen starvation. *Plant physiology* 157:1255–1282.
- Laperche A., Aigu Y., Jubault M., Ollier M., Guichard S., Glory P., Strelkov S.E., Gravot A., Manzanares-Dauleux M.J. (2017) Clubroot resistance QTL are modulated by nitrogen input in *Brassica napus*. *Theoretical and applied genetics* 130:669–684.
- Lee J., Izzah N.K., Choi B.-S., Joh H.J., Lee S.-C., Perumal S., Seo J., Ahn K., Jo E.J., Choi G.J., Nou I.-S., Yu Y., Yang T.-J. (2016) Genotyping-by-sequencing map permits identification of clubroot resistance QTLs and revision of the reference genome assembly in cabbage (*Brassica oleracea* L.). *DNA research* 23:29–41.
- Lemarié S., Robert-Seilaniantz A., Lariagon C., Lemoine J., Marnet N., Jubault M., Manzanares-Dauleux M.J., Gravot A. (2015) Both the jasmonic acid and the salicylic acid pathways contribute to resistance to the biotrophic clubroot agent *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology* 56:2158–2168.
- Liao Y., Smyth G.K., Shi W. (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30:923–930.
- Li L., Luo Y., Chen B., Xu K., Zhang F., Li H., Huang Q., Xiao X., Zhang T., Hu J., Li F., Wu X. (2016) A genome-wide association study reveals new loci for resistance to clubroot disease in *Brassica napus*. *Frontiers in plant science* 7:1483.
- Little D.Y., Rao H., Oliva S., Daniel-Vedele F., Krapp A., Malamy J.E. (2005) The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:13693–13698.
- López-Berges M.S., Rispaill N., Prados-Rosales R.C., Di Pietro A. (2010) A nitrogen response pathway regulates virulence functions in *Fusarium oxysporum* via the protein kinase TOR and the bZIP protein MeaB. *The Plant cell* 22:2459–2475.
- Lovelock D.A., Donald C.E., Conlan X.A., Cahill D.M. (2013) Salicylic acid suppression of clubroot in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) caused by the obligate biotroph *Plasmodiophora brassicae*. *Australasian plant pathology: APP* 42:141–153.
- Ludwig-Müller J., Epstein E., Hilgenberg W. (1996) Auxin-conjugate hydrolysis in Chinese cabbage: Characterization of an amidohydrolase and its role during infection with clubroot disease. *Physiologia plantarum* 97:627–634.
- Lugan R., Niogret M.-F., Kervazo L., Larher F.R., Kopka J., Bouchereau A. (2009) Metabolome and water status phenotyping of *Arabidopsis* under abiotic stress cues reveals new insight into ESK1 function. *Plant, cell & environment* 32:95–108.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Baron F., Thomas G. (2000) Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theoretical and applied genetics* 101:885–891.
- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Glory P., Giboulot A., Thomas G. (2003) Mapping QTLs and major resistance genes to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassica napus*. In: 13th Crucifer Genetics Workshop, UC Davis, California, March. pp 23–26.
- Manzanares-Dauleux M.J., Divaret I., Baron F., Thomas G. (2000) Evaluation of French *Brassica oleracea* landraces for resistance to *Plasmodiophora brassicae*. *Euphytica* 113:211.
- Mohan R., Tai T., Chen A., Arnoff T., Fu Z.-Q. (2016) Overexpression of *Arabidopsis* NIMIN1 results in salicylate intolerance. *Plant signaling & behavior* 11:e1211222.
- Mur L.A.J., Simpson C., Kumari A., Gupta A.K., Gupta K.J. (2017) Moving nitrogen to the centre of plant defence against pathogens. *Annals of botany* 119:703–709.
- O'Brien J.A., Vega A., Bouguyon E., Krouk G., Gojon A., Coruzzi G., Gutiérrez R.A. (2016) Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Molecular plant* 9:837–856.
- Ohkubo Y., Tanaka M., Tabata R., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y. (2017) Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nature plants* 3:17029.
- Ohyama K., Ogawa M., Matsubayashi Y. (2008) Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by in silico gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *The Plant journal* 55:152–160.
- Osmont K.S., Sibout R., Hardtke C.S. (2007) Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual review of plant biology* 58:93–113.
- Overvoorde P., Fukaki H., Beeckman T. (2010) Auxin control of root development. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* 2:a001537.
- Pedras M.S.C., Zheng Q.-A., Strelkov S. (2008) Metabolic changes in roots of the oilseed canola infected with the biotroph *Plasmodiophora brassicae*: phytoalexins and phytoanticipins. *Journal of agricultural and food chemistry* 56:9949–9961.
- Piao Z., Ramchiary N., Lim Y.P. (2009) Genetics of Clubroot Resistance in Brassica Species. *Journal of plant growth regulation* 28:252–264.
- Raa J. (1971) Indole-3-acetic Acid Levels and the Role of Indole-3-acetic Acid Oxidase in the Normal Root and Club-root of Cabbage. *Physiologia plantarum* 25:130–134.
- Rausch T., Butcher D.N., Hilgenberg W. (1983) Indole-3-methylglucosinolate biosynthesis and metabolism in clubroot diseased plants. *Physiologia plantarum* 58:93–100.
- Renault H., Roussel V., El Amrani A., Arzel M., Renault D., Bouchereau A., Deleu C. (2010) The *Arabidopsis* pop2-1 mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC plant biology* 10:20.
- Roberts I., Smith S., De Rybel B., Van Den Broeke J., Smet W., De Cokere S., Mispelaere M., De Smet I., Beeckman T. (2013) The CEP family in land plants: evolutionary analyses, expression studies, and role in *Arabidopsis* shoot development. *Journal of experimental botany* 64:5371–5381.
- Robinson M.D., McCarthy D.J., Smyth G.K. (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26:139–140.
- Schuller A., Kehr J., Ludwig-Müller J. (2014) Laser Microdissection Coupled to Transcriptional Profiling of *Arabidopsis* Roots Inoculated by *Plasmodiophora brassicae* Indicates a Role for Brassinosteroids in Clubroot Formation. *Plant & cell physiology* 55:392–411.
- Schurch N.J., Schofield P., Gierliński M., Cole C., Sherstnev A., Singh V., Wrobel N., Gharbi K., Simpson G.G., Owen-Hughes T., Blaxter M., Barton G.J. (2016) How many biological replicates are needed

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

- in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *RNA* 22:839–851.
- Siemens J., González M.-C., Wolf S., Hofmann C., Greiner S., Du Y., Rausch T., Roitsch T., Ludwig-Müller J. (2011) Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant pathology* 12:247–262.
- Siemens J., Keller I., Sarx J., Kunz S., Schuller A., Nagel W., Schmülling T., Parniske M., Ludwig-Müller J. (2006) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Molecular plant-microbe interactions* 19:480–494.
- Snoeiijers S.S., Pérez-García A., Joosten M.H.A.J., De Wit P.J.G.M. (2000) The effect of nitrogen on disease development and gene expression in bacterial and fungal plant pathogens. *European journal of plant pathology* 106:493–506.
- Somé A., Manzanares M.J., Laurens F., Baron F., Thomas G., Rouxel F. (1996) Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant pathology* 45:432–439.
- Tabata R., Sumida K., Yoshii T., Ohyama K., Shinohara H., Matsubayashi Y. (2014) Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* 346:343–346.
- Talbot N.J., McCafferty H.R.K., Ma M., Moore K., Hamer J.E. (1997) Nitrogen starvation of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* may act as an environmental cue for disease symptom expression. *Physiological and molecular plant pathology* 50:179–195.
- Thalineau E., Fournier C., Gravot A., Wendehenne D., Jeandroz S., Truong H.-N. (2017) Nitrogen modulation of *Medicago truncatula* resistance to *Aphanomyces euteiches* depends on plant genotype. *Molecular plant pathology*. <http://dx.doi.org/10.1111/mpp.12550>
- Tilsner J., Kassner N., Struck C., Lohaus G. (2005) Amino acid contents and transport in oilseed rape (*Brassica napus* L.) under different nitrogen conditions. *Planta* 221:328–338.
- Tommerup I.C., Ingram D.S. (1971) The life-cycle of *Plasmodiophora brassicae* Woron. In *Brassica* tissue cultures and in intact roots. *The New phytologist* 70:327–332.
- Ugajin T., Takita K., Takahashi H., Muraoka S., Tada T., Mitsui T., Hayakawa T., Ohyama T., Hori H. (2003) Increase in Indole-3-acetic Acid (IAA) level and Nitrilase Activity in Turnips Induced by *Plasmodiophora brassicae* Infection. *Plant biotechnology* 20:215–220.
- Wagner G., Charton S., Lariagon C., Laperche A., Lugan R., Hopkins J., Frendo P., Bouchereau A., Delourme R., Gravot A., Manzanares-Dauleux M.J. (2012) Metabotyping: a new approach to investigate rapeseed (*Brassica napus* L.) genetic diversity in the metabolic response to clubroot infection. *Molecular plant-microbe interactions* 25:1478–1491.
- Walters D.R., Bingham I.J. (2007) Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *The Annals of applied biology* 151:307–324.
- Wu G., Zhang L., Wu Y., Cao Y., Lu C. (2010) Comparison of five endogenous reference genes for specific PCR detection and quantification of *Brassica napus*. *Journal of agricultural and food chemistry* 58:2812–2817.
- Yu F., Zhang X., Peng G., Falk K.C., Strelkov S.E., Gossen B.D. (2017) Genotyping-by-sequencing reveals three QTL for clubroot resistance to six pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica rapa*. *Scientific reports* 7:4516.
- Zhao Y., Bi K., Gao Z., Chen T., Liu H., Xie J., Cheng J., Fu Y., Jiang D. (2017) Transcriptome Analysis of *Arabidopsis thaliana* in Response to *Plasmodiophora brassicae* during Early Infection. *Frontiers in microbiology*. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2017.00673> (accessed 24 April 2017).

ANALYSE METABOLOMIQUE DE LA MODULATION DE RESISTANCE A LA HERNIE DU GENOTYPE 'YUDAL' PAR LA FERTILISATION AZOTEE

I Matériel et méthode

Les analyses métabolomiques non-ciblées ont été réalisées sur les mêmes échantillons que ceux utilisés dans l'article IV. En plus des échantillons obtenus à 14 jours après inoculation et 27 jours après inoculation, nous avons également incorporé ceux obtenus 42 jours après inoculation, qui n'étaient pas étudiés dans l'analyse transcriptomique.

Préparation des échantillons

Deux méthodes d'extraction ont été utilisées, afin d'extraire d'une part les composés polaires et d'autre part les composés apolaires. L'extraction des composés polaires a été effectuée sur la base de 50 mg de poudre de racines lyophilisées, auxquels ont été ajoutés 50 µl de méthanol (MeOH) par mg d'échantillon. Le solvant a été homogénéisé par agitation au vortex, puis les tubes ont été placés dans un bain à ultrason pendant 10 min. Ensuite, les échantillons ont été chauffés à 60 °C pendant 30 min, puis centrifugés 3 min à 12 000 rpm à 4 °C. Le surnageant a été récupéré et conservé à -20 °C en attendant d'être analysé. L'extraction des composés apolaires a été effectuée sur la base de 50 mg de poudre de racines lyophilisées, auxquels ont été ajoutés 15 µl d'une solution contenant du chloroforme et du méthanol (CHCl₃/MeOH à 1:1) par mg d'échantillon. Le solvant a été homogénéisé par agitation au vortex, puis les tubes ont été placés dans un bain à ultrason pendant 15 min. Ensuite, les échantillons ont été chauffés à 60 °C pendant 30 min, puis centrifugés 3 min à 12 000 rpm à 4 °C. Le surnageant a été récupéré et conservé à -20°C en attendant d'être analysé.

Séparation et quantification des composés par HPLC/Orbitrap

La détection et la quantification des composés présents dans les deux surnageants issus de l'extraction des composés polaires et apolaires ont été effectuées à l'aide d'un système HPLC ou "High Pressure Liquid Chromatography" (Dionex Ultimate 3 000, Thermo Fisher Scientific, San Jose, CA, États-Unis) couplé à un spectromètre de masse de type Orbitrap (Thermo Fischer Scientific, San Jose, CA, États-Unis). Dans un premier temps, les composés sont séparés en fonction de leur affinité avec une phase fixe et une phase mobile. Pour les composés polaires, la phase fixe utilisée est une colonne Nucleodur PolarTec (150 × 2 mm, 1,8 µm particle size de Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) maintenue à 30 °C avec comme phase mobile un mélange de deux éluants (ACN/HCOOH et H₂O/HCOOH à 99,9/0,1 V/V). Pour les composés apolaires, nous

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

avons utilisé une colonne Nucleodur PolarTec (50 × 2 mm, 1,8 µm particle size de Macherey-Nagel, Düren, Allemagne) maintenue à 20 °C avec comme phase mobile, un mélange de deux éluants (MeOH/HCOOH et H₂O/HCOOH à 99,9/0,1 V/V). Dans un deuxième temps, la détection des composés est réalisée par deux techniques d'ionisations. Pour les composés polaires, l'ionisation a été réalisée par électronebulisation (ESI), en mode positif et négatif. Alors que pour les composés apolaires, elle a été effectuée par la méthode d'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI). Dans les deux cas, les masses mesurées sont enregistrées dans un fichier en fonction de leur temps de rétention.

Intégration des données de spectrométrie

La quantification des composés nécessite plusieurs étapes de traitement informatique. La première étape consiste à détecter les pics chromatographiques (peak picking) par fenêtres de masses (bins) à l'aide du package R XCMS (Smith *et al.*, 2006). Cependant, de par sa sensibilité, la technique de détection engendre beaucoup d'artefacts correspondant à du "bruit" de fond, des composés parasites ou instables. Il convient donc de définir un certain nombre de paramètres pour éliminer au maximum les signaux non pertinents. Afin de réduire le temps de traitement, ces paramètres ont été optimisés, pour chaque jeu de données, à l'aide du package R IPO (Libiseller *et al.*, 2015). La phase d'optimisation utilise le modèle de Box-Behnken afin de limiter au maximum le nombre de combinaisons de paramètre à tester et ainsi réduire les temps de calcul. Elle utilise un certain nombre d'indicateurs pour maximiser le nombre de "véritables" pics détectés. A savoir qu'un pic est considéré comme pertinent s'il est accompagné par au moins un de ces isotopes. Afin de réduire les temps de calcul, l'optimisation des paramètres a été effectuée sur un sous-set de 10 échantillons (sélectionnés de manière aléatoire), parmi les 96 échantillons. Les paramètres optimisés utilisés sont les suivants :

- APCI (positif) : méthode : centWave ; peak width : 10-22 ; ppm : 5 ; snth : 2,6 ; mzdif : -0,0065 ; prefilter : 6-2950)
- ESI (positif/négatif) : méthode : centWave ; peak width : 11-36 / 13-48 ; ppm : 1 / 5 ; snth : 12 / 9 ; mzdif : 0,0045 / 0,003 ; prefilter : 7-2201)

Une fois les pics détectés, l'annotation a été réalisée avec le package R CAMERA (Kuhl *et al.*, 2012) qui permet de regrouper les pics correspondant aux mêmes composés (isotopes, adduits et fragments) ensemble. Seuls les composés majoritaires avec une signature isotopique ont été conservés, un mass tag leur a été attribué.

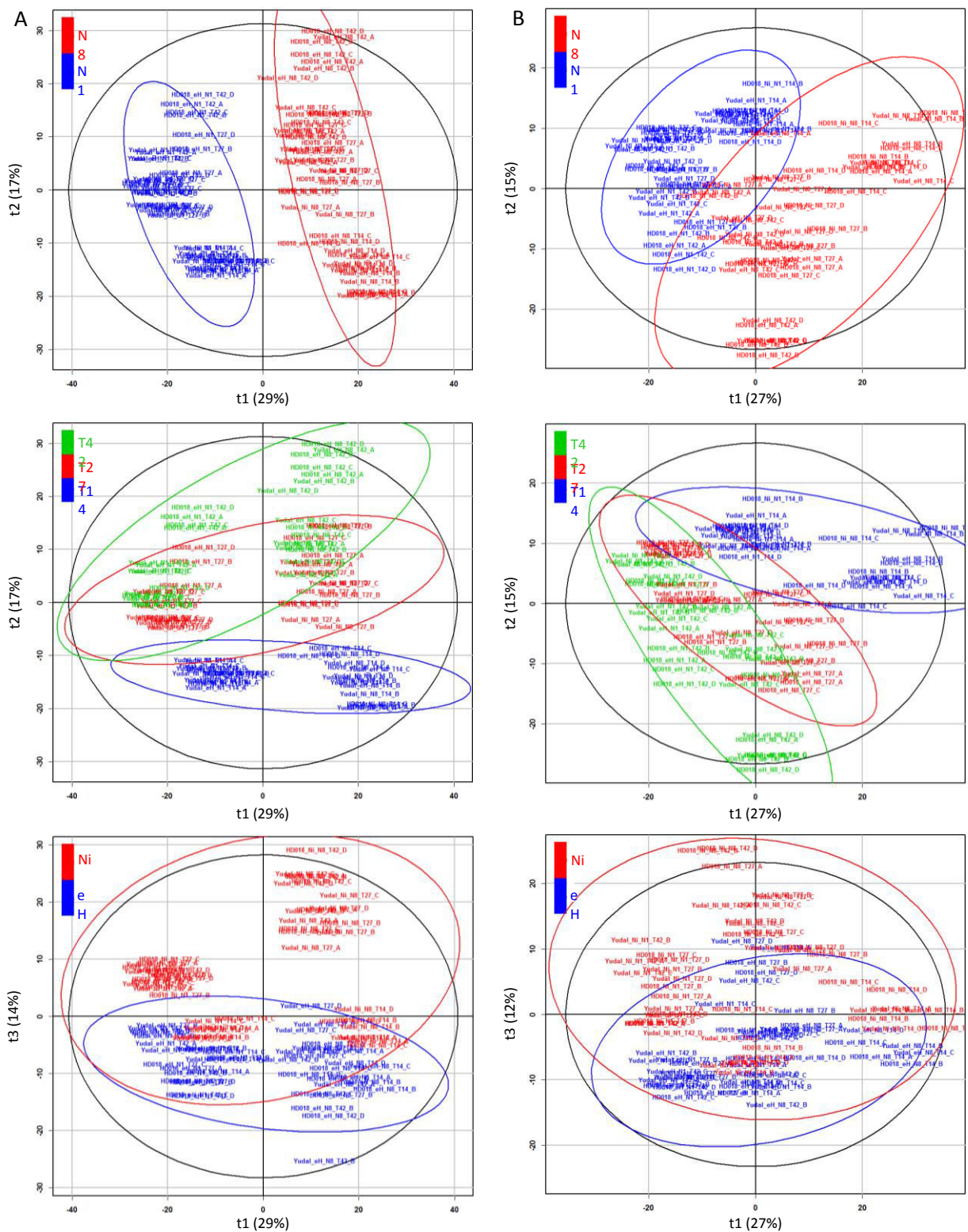


Figure 1: ACP des jeux de données obtenus en ESI, mode négatif (A) et positif (B).

Pour chaque jeu de données, trois graphiques mettant en avant l'effet des trois principaux facteurs discriminant les échantillons, l'inoculation, le temps cinétique et la fertilisation azotée, sont présentés. N1 et N8 correspondent respectivement à 1mM de nitrate et 8mM de nitrate. T14, T27 et T42 correspondent respectivement à 14, 27 et 42 jours après inoculation. Ni et eH correspondent respectivement à la non-inoculation et à l'inoculation avec l'isolat eH de *P. brassicae*.

Test statistique

Dans un premier temps, la structure des données a été observée à l'aide d'analyses en composantes principales (ACP). Les mass tags permettant de discriminer les modalités biologiques étudiées (fertilisation azotée et inoculation) ont été sélectionnés à l'aide de tests de Wilcoxon (non paramétrique). Les p-value obtenues à la suite de ces tests ont été corrigées par la méthode de "false discovery rate" (FDR) et seules les différences significatives supérieures à un facteur 2 (Log₂ de fold change < -1 ou > 1) ont été prises en compte.

II Résultats

L'analyse métabolomique non ciblée de la modulation de résistance à l'isolat eH de *P. brassicae*, induite par la réduction de fertilisation, observé chez le génotype 'Yudal' a été effectuée sur les échantillons utilisés pour l'analyse transcriptomique, présentés dans l'article IV. L'ensemble des échantillons ont été analysés en LC-MS à l'aide d'un Orbitrap à l'INRA de Colmar (Philippe Hugueney, équipe MSV). Cette technique permet la quantification relative de l'ensemble des composés ionisables, par la source utilisée, d'un échantillon à partir d'une seule injection. Dans notre cas, nous avons utilisé deux sources différentes d'ionisation, l'ionisation par électro-nébulisation (ESI) en mode positif et négatif, et l'ionisation chimique à pression atmosphérique (APCI) en mode positif. Ces deux méthodes sont respectivement plus adaptées à l'analyse des composés polaires et apolaires.

L'intégration des données, issue de l'orbitrap, a été effectuée, séparément pour chacun des jeux de données, à l'aide du package XCMS (Smith *et al.*, 2006), comme décrit dans le chapitre II: matériels et méthodes.

Analyses descriptives des données intégrées

Les intégrations des données obtenues en ESI (mode négatif), ESI (mode positif) et APCI (mode positif) ont permis de détecter respectivement un total de 10 082, 7 367 et 8 257 mass tags. Afin d'augmenter la fiabilité des données et de supprimer le bruit généré au cours de l'intégration, nous avons fait le choix de ne conserver que les composés pour lesquels nous détectons au moins deux isotopes (conservation uniquement de l'isotope principal), à l'aide du package CAMERA (Kuhl *et al.*, 2012). Cela a eu pour effet de réduire considérablement le nombre de mass tags restants, 920 pour l'ESI (mode négatif), 749 pour l'ESI (mode positif) et 1 042 pour l'APCI (mode positif).

Afin d'étudier la ressemblance entre les différents échantillons, une analyse en composante principale (ACP) a été effectuée pour chacun des jeux de données. Les résultats des ACP ne

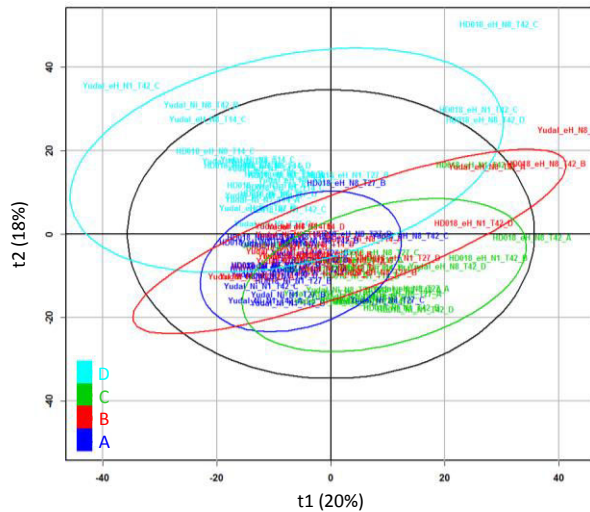


Figure 2: ACP du jeu de données obtenu en APCI mode positif.

Les échantillons randomisés des quatre différentes séries d'injections, A, B, C et D sont représentés.

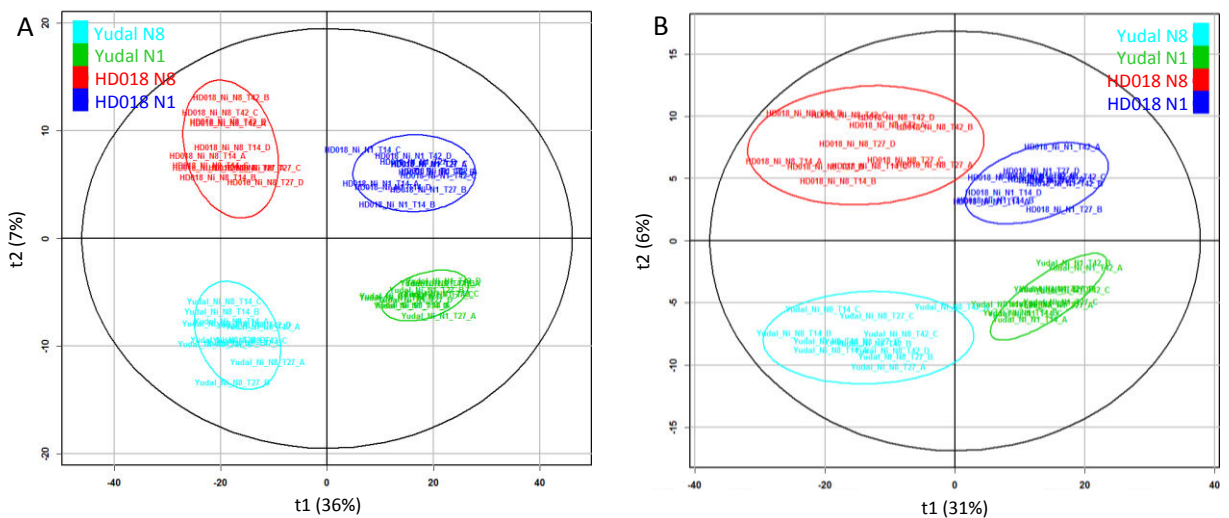


Figure 3: PLS-DA, sur la base des échantillons non inoculés, des jeux de données obtenus en ESI, mode négatif (A) et positif (B).

Les échantillons sont regroupés selon la combinaison des facteurs génotype et fertilisation azotée.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

permettent pas de relier directement les différents facteurs testés dans cette étude (la fertilisation azotée, l'inoculation, le génotype et les temps cinétiques) aux différentes dimensions de l'ACP, contrairement à ce qui avait pu être observé pour les données de RNA-seq. Cependant, pour les données obtenues en ESI (mode négatif et positif), on observe que la dimension 1 permet une assez bonne séparation des échantillons en fonction de la fertilisation azotée, même s'il existe une légère zone de recouvrement entre les échantillons des deux conditions de fertilisation pour les données obtenues en mode positif (Figure 1A et B). La seconde dimension permet quant à elle une séparation partielle des échantillons en fonction du temps cinétique, qui apparaît beaucoup plus nettement pour les échantillons en N8 que ceux en N1. Le facteur inoculation semble quant à lui être discriminé par la 3^{ème} dimension des ACP, malgré un recouvrement important entre les échantillons des temps les plus précoces (14 et 27 jours après inoculation). Le facteur génotype n'est quant à lui discriminé par aucune des dimensions des ACP. Il semblerait donc que contrairement aux résultats obtenus avec les données RNA-seq, le facteur le plus discriminant du métabolome soit la fertilisation azotée, suivi par le temps cinétique et enfin l'inoculation.

L'ACP réalisée sur les données obtenues en APCI, a mis en évidence un important problème de répétabilité des données parmi les réplicats biologiques. Ce problème n'ayant pas été observé pour les autres analyses réalisées sur ces échantillons, notre attention s'est rapidement portée sur les problèmes ayant pu survenir au cours de l'acquisition des données. Effectivement, il s'avère qu'il existe un biais entre les différentes séries d'injection des échantillons (Figure 2). N'ayant pas réussi pour le moment à corriger ce biais, les données d'APCI ne seront pas utilisées pour la suite de l'analyse.

La réponse à la carence azotée est très semblable chez les deux génotypes

Afin d'étudier la réponse à la carence azotée des génotypes 'Yudal' et HD018, les données obtenues en ESI des échantillons non-inoculés ont été comparées sur la base de la condition de fertilisation azotée, 1 mM et 8 mM. Les PLS-DA réalisées sur ces 4 groupes d'échantillons non inoculés ('Yudal' 1 mM, 'Yudal' 8 mM, HD018 1 mM et HD018 8 mM) permettent de mettre en évidence qu'une forte proportion de la variabilité entre ces échantillons est imputable au facteur fertilisation azotée, indépendamment du génotype, représenté par la dimension 1 des PLS-DA (Figure 3). Cette dimension 1 explique 36 % et 31 % de la variabilité, respectivement pour les données obtenues en ESI mode négatif et positif. Au contraire, la variabilité entre les génotypes, pour une même condition de fertilisation azotée, est-elle beaucoup plus faible (dimension 2: 7 % et 6 % pour ESI mode négatif et positif, respectivement). Ce résultat suppose que les deux génotypes possèdent une part importante de leur réponse métabolomique vis-à-vis du facteur fertilisation azotée qui est commune.

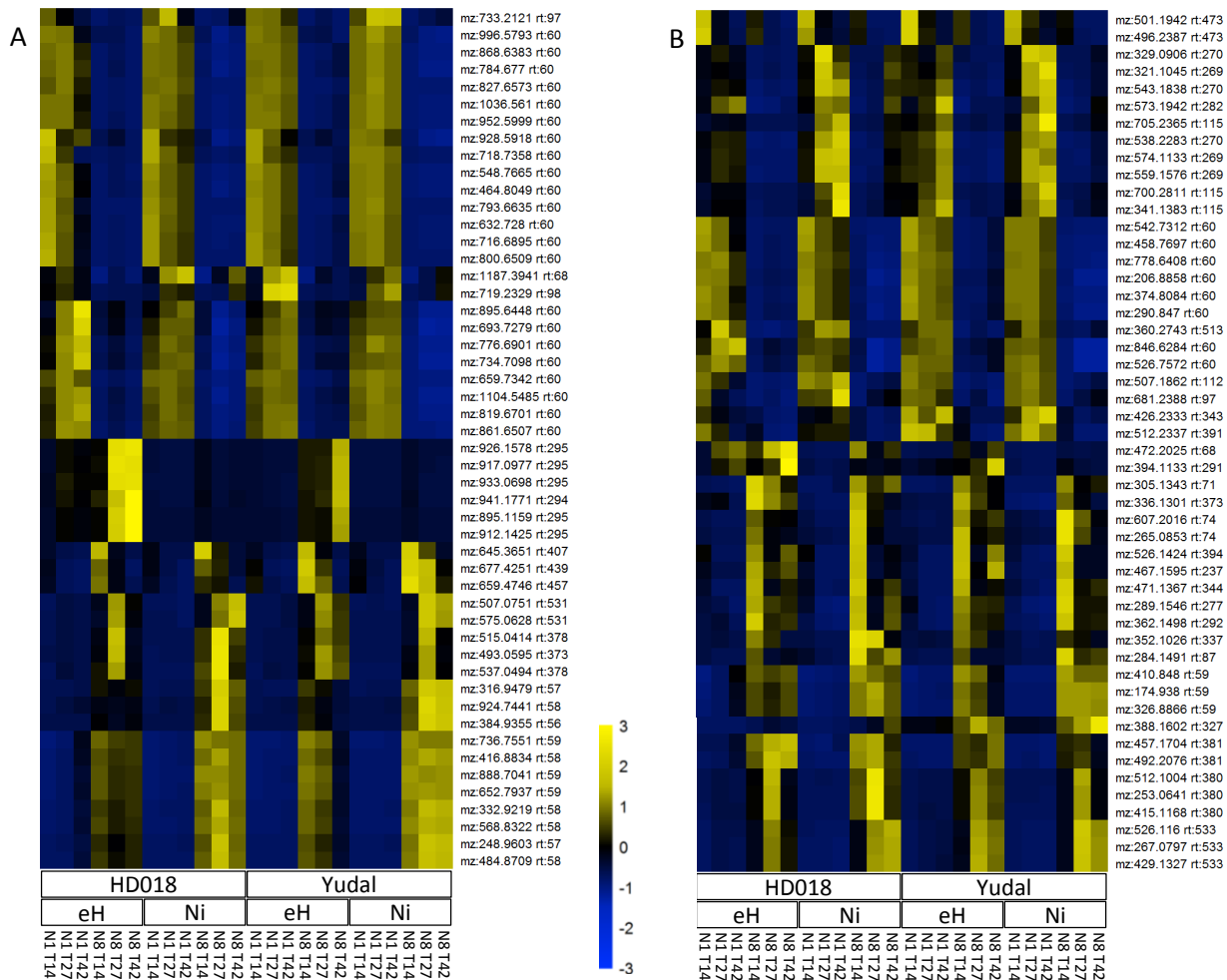


Figure 4: Heatmap des mass tags les plus représentatifs de la réponse à la carence azotée en condition de non inoculation dans les jeux de données obtenus en ESI, mode négatif (A) et positif (B).

Sur cette heatmap sont représentés les 25 mass tag les plus différenciellement accumulés en 1mM et en 8mM. Le mz correspond à la masse divisée par la charge du composé (respectivement obtenu en mode négatif et positif) et le rt au temps de rétention. Les données présentées sont centrées réduites.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

Afin de confirmer la similarité de réponse à la carence azotée chez les deux génotypes, des analyses différentielles de la quantité relative des différents mass tags présents dans les racines ont été réalisées pour chacun des génotypes (Test de Wilcoxon avec p -value < 0.05 et fold change > 2). En ESI mode négatif, la modification de fertilisation azotée entraîne une variation de la quantité relative de 449 mass tags chez le génotype 'Yudal' (144 sont sur-accumulés en 1 mM et 305 sont sur-accumulés en 8 mM) et 423 mass tags chez le génotype HD018 (124 sont sur-accumulés en 1 mM et 299 sont sur-accumulés en 8 mM). Parmi ces mass tags, 377 sont différentiellement accumulés chez les deux génotypes (120 sont sur-accumulés en 1 mM et 257 sont sur-accumulés en 8 mM). La même analyse a été effectuée sur le jeu de donnée obtenue en ESI mode positif, dans lequel la modification de fertilisation azotée entraîne une variation de la quantité relative de 305 mass tags chez le génotype 'Yudal' (50 sont sur-accumulés en 1 mM et 255 sont sur-accumulés en 8 mM) et 236 mass tags chez le génotype HD018 (48 sont sur-accumulés en 1 mM et 188 sont sur-accumulés en 8 mM). Parmi ces mass tags, 216 sont différentiellement accumulés chez les deux génotypes (44 sont sur-accumulés en 1 mM et 172 sont sur-accumulés en 8 mM). Parmi les mass tags dont la quantité est modulée par la fertilisation azotée, la proportion élevée de mass tags communs aux deux génotypes confirme la similarité de réponse des deux génotypes à la fertilisation azotée.

Pour chacun des mass tags modulés par la fertilisation azotée chez les deux génotypes, nous avons tenté d'identifier les composés correspondants en interrogeant les bases de données métabolomiques de plante disponibles (Aracyc, KEGG et une base de données des glucosinolates à disposition au laboratoire). Suite à l'analyse des bases de données, un nombre très restreint de correspondances ont été identifiées (177 sur 920 mass tags en ESI mode négatif et 241 sur 749 mass tags en ESI mode positif), du plus la correspondance entre les mass tags et les composés des bases de données ne s'effectuant que sur la valeur de m/z (masse du composé divisé par sa charge), il n'est pas rare d'obtenir plusieurs correspondances pour un même mass tags. Pour le moment, les résultats issus de l'analyse de la base de données KEGG n'ont pas été utilisés, car cette base de données contient des composés n'ayant jamais été détectés chez les plantes.

Les patterns de modulation de quantité des 50 mass tags les plus représentatifs de la réponse des deux génotypes à la fertilisation azotée en condition de non-inoculation (25 sur-accumulés en condition 1 mM et 25 sur-accumulés en condition 8 mM) ont été étudiés (Figure 4). Tout d'abord on remarque que même si ces mass tags ont été sélectionnés sur la base de leur comportement dans les échantillons non-inoculés, ils se comportent très souvent de la même manière dans ceux inoculés. De plus, on observe des variations de leur quantité en fonction des temps cinétiques, ce qui justifierait que l'étude des données soit approfondie, pour rechercher des marqueurs de la réponse à la carence azotée pour chacun des temps cinétiques (actuellement en cours).

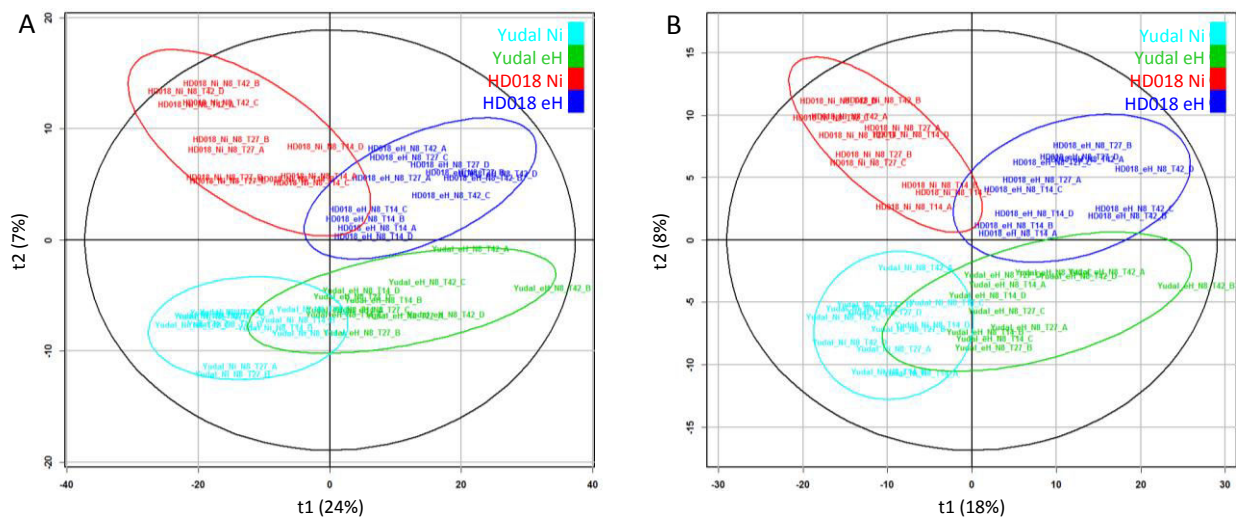


Figure 5: PLS-DA, sur la base des échantillons en fort apport azoté, des jeux de données obtenus en ESI, mode négatif (A) et positif (B).

Les échantillons sont regroupés selon la combinaison des facteurs génotype et inoculation.

La réponse à l'infection est semblable chez les deux génotypes en condition de fort apport azoté

Suite à l'identification des mass tags marqueurs de la réponse au facteur fertilisation azotée, nous nous sommes intéressé à l'étude de la réponse à l'infection par *P. brassicae*. Pour cela, les données obtenues en ESI sur les échantillons de 'Yudal et HD018, fertilisés à 8 mM d'azote, ont été comparées sur la base de la condition inoculation, non-inoculé et inoculé avec l'isolat eH. Les PLS-DA réalisées sur ces 4 groupes d'échantillons fertilisés avec la solution 8 mM d'azote ('Yudal' Ni, 'Yudal' eH, HD018 Ni et HD018 eH) permettent de mettre qu'une proportion importante de la variabilité entre ces échantillons est imputable au facteur inoculation, indépendamment du génotype, représenté par la dimension 1 des PLS-DA (Figure 5). Cette dimension 1 explique 24 % et 18 % de la variabilité, respectivement pour les données obtenues en ESI mode négatif et positif. La variabilité entre les génotypes, pour une même condition d'inoculation, est-elle plus faible (dimension 2: 7 % et 8 % pour ESI mode négatif et positif, respectivement). Tout comme pour l'analyse du facteur fertilisation azotée, ce résultat suppose que les deux génotypes possèdent une part importante de leur réponse métabolomique vis-à-vis du facteur inoculation qui est commune.

Afin de confirmer la similarité de réponse à l'inoculation chez les deux génotypes, des analyses différentielles de la quantité relative des différents mass tags présent dans les racines ont été réalisées pour chacun des génotypes (Test de Wilcoxon avec p-value < 0.05 et fold change > 2). En ESI mode négatif, la modification du facteur inoculation entraîne une variation de la quantité relative de 194 mass tags chez le génotype 'Yudal' (79 sont sur-accumulés en condition inoculée et 115 sont sur-accumulés en condition non-inoculée) et 201 mass tags chez le génotype HD018 (95 sont sur-accumulés en condition inoculée et 106 sont sur-accumulés en condition non-inoculée). Parmi ces mass tags, 154 sont différentiellement accumulés chez les deux génotypes (59 sont sur-accumulés en condition inoculée et 95 sont sur-accumulés en condition non-inoculée). La même analyse a été effectuée sur le jeu de données obtenu en ESI mode positif, dans lequel le facteur inoculation entraîne une variation de la quantité relative de 87 mass tags chez le génotype 'Yudal' (42 sont sur-accumulés en condition inoculée et 45 sont sur-accumulés en condition non-inoculée) et 134 mass tags chez le génotype HD018 (78 sont sur-accumulés en 1 mM et 56 sont sur-accumulés en 8 mM). Parmi ces composés, 78 sont différentiellement accumulés chez les deux génotypes (37 sont sur-accumulés en condition inoculée et 41 sont sur-accumulés en condition non-inoculée). Parmi les mass tags dont la quantité est modulée par l'inoculation, la forte proportion de mass tags communs aux deux génotypes confirme qu'il existe une partie importante de la réponse à l'inoculation qui est commune aux deux génotypes en condition de fort apport azotée. Tout

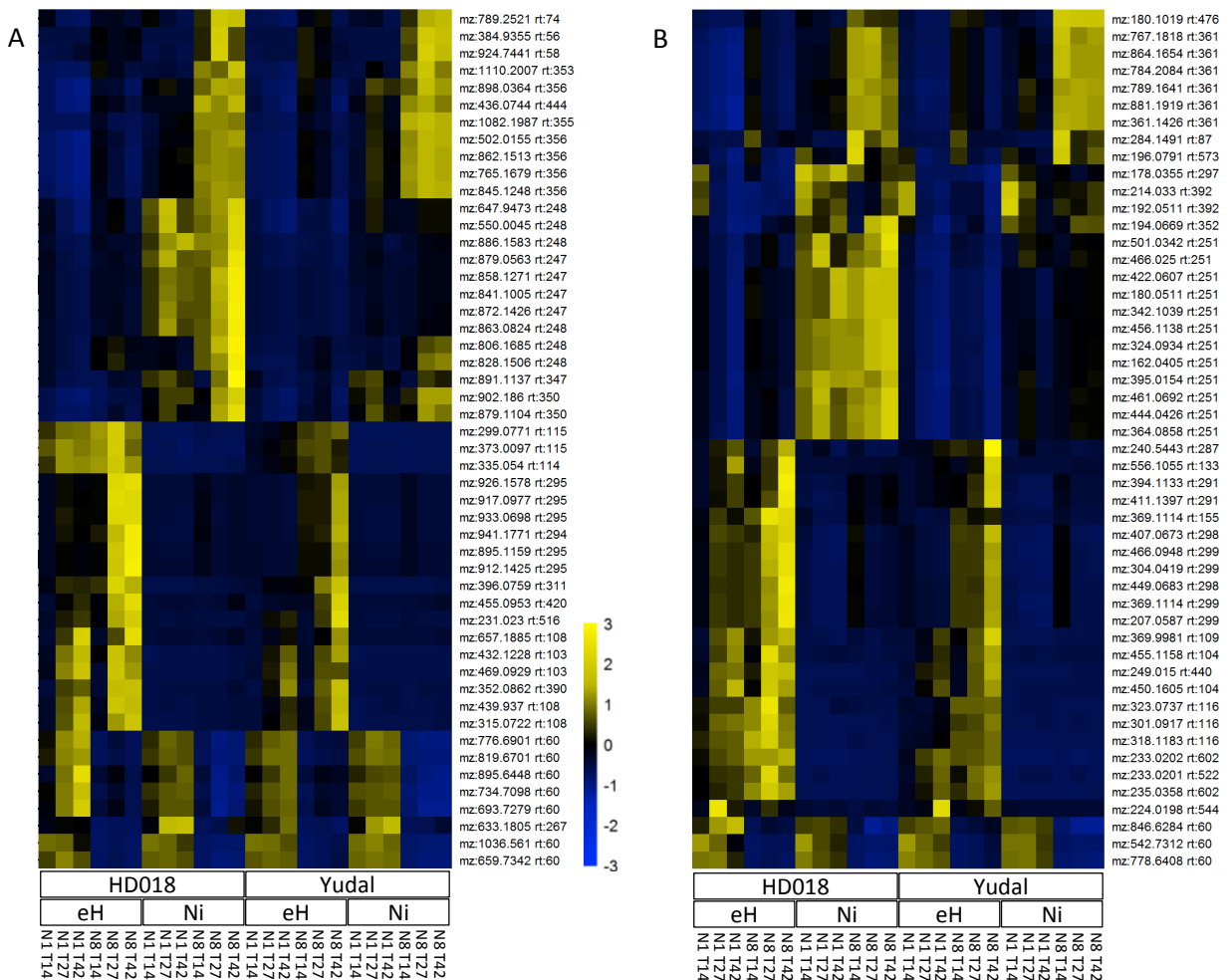


Figure 6: Heatmap des mass tags les plus représentatifs de la réponse à la l'inoculation, en condition de fort apport azoté dans les jeux de données obtenus en ESI, mode négatif (A) et positif (B).

Sur cette heatmap sont représentés les 25 mass tags les plus différenciellement accumulés en condition d'inoculation et de non inoculation. Le mz correspond à la masse divisée par la charge du composé (respectivement obtenu en mode négatif et positif) et le rt au temps de rétention. Les données présentées sont centrées réduites.

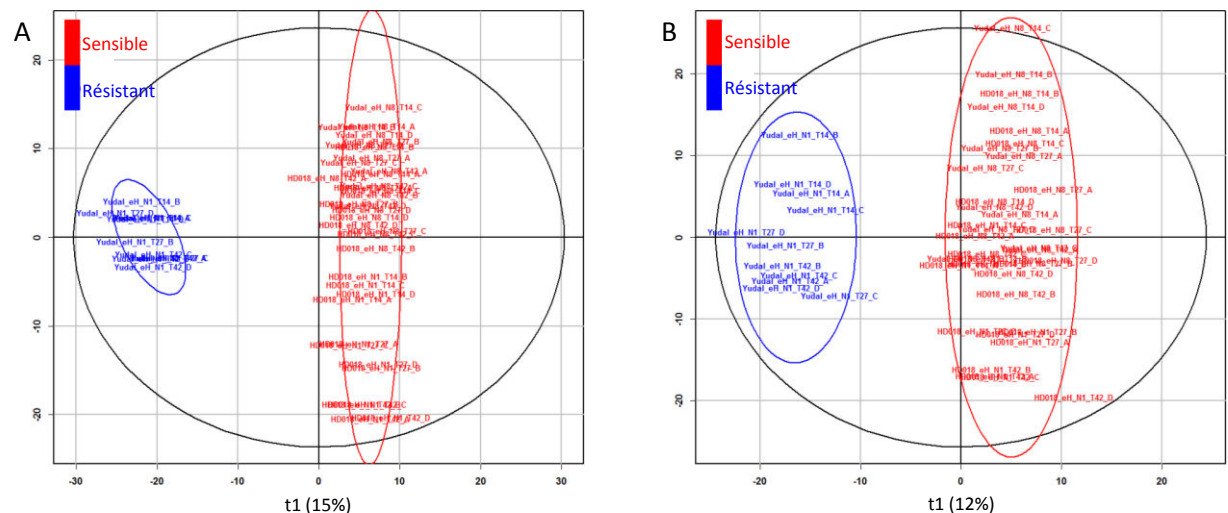


Figure 7: OPLS-DA, sur la base des échantillons décrits comme résistants ou sensibles en réponse à l'inoculation par l'isolat eH, des jeux de données obtenus en ESI, mode négatif (A) et positif (B). Les échantillons sont regroupés selon leur caractère résistant ou sensible à l'isolat eH.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

comme pour les mass tags marqueurs de la réponse à la fertilisation azotée, l'interrogation des bases de données ne permet d'identifier qu'un très faible nombre de mass tags marqueur de la réponse au facteur inoculation.

Les patterns de modulation de quantité des 50 mass tags les plus représentatifs de la réponse des deux génotypes à l'inoculation en condition de fort apport azoté (25 sur-accumulés en condition non-inoculée et 25 sur-accumulés en condition inoculée) ont été étudiés (Figure 6). Tout d'abord, on remarque qu'il existe différents patterns de modulation chez les mass tags marqueurs de la réponse à l'inoculation en 8 mM. En effet, certains sont spécifiquement sur-accumulés dans les échantillons inoculés ou non-inoculés fertilisés à 8 mM d'azote, alors que d'autres sont sur-accumulés dans les échantillons inoculés ou non-inoculés indépendamment de la fertilisation azotée. De plus, on observe également des variations de quantité entre les génotypes, ainsi qu'en fonction des temps cinétiques. Pour cette dernière raison, une étude des marqueurs de la réponse à l'inoculation pour chacun des temps cinétiques serait intéressante (actuellement en cours).

Analyse des marqueurs de la réponse spécifique du génotype 'Yudal' à l'inoculation en condition de faible fertilisation azotée

L'identification de composés métaboliques responsable de la résistance induite chez le génotype 'Yudal' en condition de faible apport azoté ('Yudal' en 1 mM), a été effectuée à partir de la comparaison des échantillons 'Yudal' en 1 mM (défini comme étant résistants) avec les échantillons de 'Yudal' en 8 mM et HD018 en 1 mM et 8 mM (défini comme étant sensibles) en condition inoculée. Dans un premier temps, des OPLS-DA, réalisées avec les données obtenues en ESI mode négatif et positif, ont été effectuées afin de déterminer s'il était possible de discriminer le groupe d'échantillon résistant du groupe d'échantillon sensible indépendamment du temps cinétique (Figure 7). Les résultats de ces analyses discriminantes mettent en évidence une séparation complète de ces deux groupes d'échantillons, expliquant respectivement 15 % et 12 % de la variabilité totale entre ces échantillons pour les données en mode négatif et positif.

Afin de déterminer les mass tags impliqués de la discrimination de ces deux groupes d'échantillons, des analyses différentielles ont été réalisées (Test de Wilcoxon avec p-value < 0.05 et fold change > 2). En ESI mode négatif, un total de 332 mass tags dont la quantité est modulée ont été identifiés (125 sont sur-accumulés chez les échantillons résistants et 207 sont sur-accumulés chez les échantillons sensibles). En ESI mode positif, un total de 183 mass tags dont la quantité est modulée ont été identifiés (71 sont sur-accumulés chez les échantillons résistants et 112 sont sur-accumulés chez les échantillons sensibles).

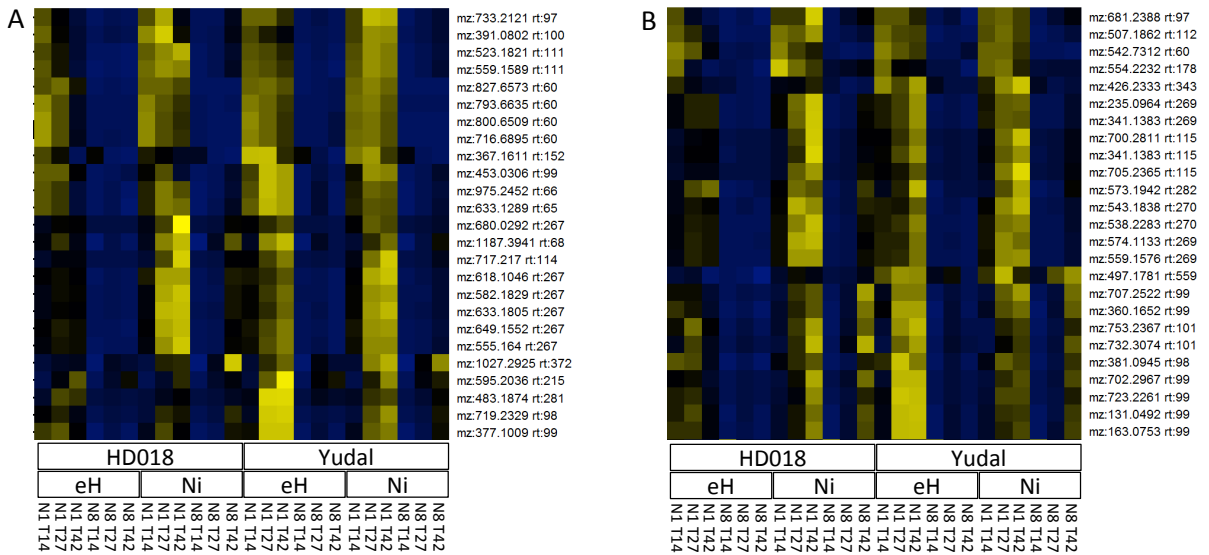


Figure 8: Heatmap des mass tags les plus différenciellement accumulés chez ‘Yudal’ 1mM par rapport à ‘Yudal’ 8mM, HD018 1mM et 8mM, en condition d’inoculation dans les jeux de données obtenus en ESI, mode négatif (A) et positif (B).

Le mz correspond à la masse divisée par la charge du composé (respectivement obtenu en mode négatif et positif) et le rt au temps de rétention. Les données présentées sont centrées réduites.

Chapitre III : Caractérisation de la réponse transcriptomique et métabolomique lié à l'augmentation de résistance du génotype 'Yudal' vis-à-vis de l'isolat eH en condition de faible apport azoté

Afin d'identifier des mass tags potentiellement impliqués dans l'augmentation de résistance chez le génotype 'Yudal' en condition de faible apport azoté, les patterns de modulation de quantité des 25 mass tags les plus fortement sur-accumulés chez le résistant ont été étudiés (Figure 8). Tout d'abord, on remarque que l'ensemble de ces mass tags sont sur-accumulés en condition de faible fertilisation azotée, indépendamment du génotype et du facteur inoculation, même si les quantités sont plus faibles pour le génotype HD018. Cela indique, que contrairement aux résultats obtenus en RNA-seq, on n'observe pas de mass tags dont l'accumulation est spécifique de la combinaison faible fertilisation azotée/inoculation/génotype 'Yudal'. D'autre part, on observe toujours des variations de la quantité des mass tags en fonction des temps cinétiques. Ce qui, une fois encore, rend essentiel une étude par temps cinétique des marqueurs de l'augmentation de la résistance de 'Yudal' en condition de faible apport azoté (actuellement en cours).

CONCLUSION PARTIELLE

L'objectif des travaux présentés dans ce chapitre était d'identifier les réponses transcriptomiques et métabolomiques sous-jacentes à l'augmentation du niveau de résistance du génotype 'Yudal' en condition de faible fertilisation azotée. Les résultats obtenus nous ont permis d'établir les conclusions suivantes :

1. L'impact des 4 facteurs étudiés, i.e. l'inoculation, le niveau de fertilisation azotée, le génotype et le point cinétique d'étude, est différent sur le transcriptome et le métabolome. Le transcriptome est principalement impacté par le facteur génotype, puis par le facteur inoculation, alors que le métabolome est essentiellement modulé par la fertilisation azotée et le temps cinétique.
2. Les deux génotypes, 'Yudal' et HD018, en condition non inoculée ont des réponses transcriptomiques et métabolomiques similaires à la carence azotée.
3. 'Yudal' et HD018 mettent en place une forte réponse salicylate vis-à-vis de l'infection par l'isolat eH de *P. brassicae* et cela indépendamment du niveau de fertilisation azotée.
4. L'augmentation de résistance de 'Yudal' en condition de faible apport azoté semble liée à une limitation du développement des symptômes plutôt qu'à une réduction du développement de l'agent pathogène dans les racines. En effet, d'un point de vue chronologique, le développement des symptômes est freiné bien avant d'observer une diminution de la présence de *P. brassicae* mesurée par le ratio ADN agent pathogène/ADN plante.
5. La réduction du développement des symptômes chez 'Yudal' en faible apport azoté est associée avec l'induction de nombreux gènes liés à l'acquisition d'azote inorganique, notamment NRT2.2, et également à l'auxine.

CHAPITRE IV

DISCUSSION GENERALE

CHAPITRE IV : DISCUSSION GENERALE

Parmi les différents moyens de lutte mis en œuvre contre la hernie des crucifères tels que la rotation des cultures, le chaulage ou encore le recours à des fongicides ou de biofongicides, l'utilisation de variétés résistantes reste à ce jour la stratégie la plus viable, tant d'un point de l'efficacité que de la rentabilité (Dixon, 2009 ; Gossen *et al.*, 2014). De nombreux facteurs génétiques de résistance à la hernie ont été identifiés chez les principales Brassica cultivées, que ce soit *B. napus* (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000, 2003 ; Werner *et al.*, 2008 ; Zhang *et al.*, 2015 ; Hasan and Rahman, 2016), *B. rapa* (Suwabe *et al.*, 2003 ; Saito *et al.*, 2006 ; Sakamoto *et al.*, 2008) ou *B. oleracea* (Rocherieux *et al.*, 2004 ; Nagaoka *et al.*, 2010 ; Lee *et al.*, 2016). L'introgession de facteurs de résistance issus de *B. oleracea* et *B. rapa* chez le colza, au travers la création de colzas semi-synthétiques (Diederichsen *et al.*, 1996), a permis le développement de cultivars de colza résistants à la hernie. Les tout premiers furent 'Mendel' (un hybride restauré développé par NPZ et inscrit en UK à partir de 2000) et 'Tosca' (colza de printemps créé par SW Seeds), tous deux porteurs de résistances sous contrôle monogénique et isolat-spécifiques (Werner *et al.*, 2008). D'autres variétés de colza résistantes à la hernie sont proposées actuellement ('Cracker', 'sy Alister', 'Andromeda'..), mais avec une très faible diversification des facteurs génétiques de résistance (résistances issues de Mendel ou directement des mêmes accessions de *B. rapa* utilisées pour la construction de 'Mendel'). Cependant, peu de temps après leur mise sur le marché, la plupart des sources de résistance ont été contournées aussi bien en Europe (notamment la résistance portée par 'Mendel', contournée en Allemagne et en France (Zamani-Noor *et al.*, 2017) que par exemple au Canada (Strelkov *et al.*, 2016). Par ailleurs, LeBoldus *et al.* (2012) ont montré en conditions contrôlées, que le contournement de la résistance peut être extrêmement rapide, soulignant ainsi le fort potentiel évolutif de *P. brassicae*.

Aujourd'hui, dans une logique de gestion durable des résistances à la hernie, l'un des objectifs en sélection est d'identifier de nouvelles sources de résistance pour la hernie et de combiner les différents facteurs génétiques (notamment par pyramidage) pour la création de variétés résistantes. L'utilisation de la résistance quantitative partielle est envisagée de plus en plus, du fait que ce type de résistance soit réputée plus difficile à éroder, mais aussi car elle peut contribuer à renforcer la durabilité des gènes majeurs de résistance comme cela a été démontré chez différents pathosystèmes (Rousseau *et al.*, 2014 ; Delourme *et al.*, 2014).

La résistance quantitative est toutefois difficile à intégrer en création variétale du fait de la complexité de son contrôle génétique (contrôle polygénique), de l'effet souvent faible de chacun des facteurs génétiques (QTL) sur l'expression du caractère de résistance et de son interaction avec l'environnement aussi bien biotique (diversité des populations pathogènes) qu'abiotique

(contraintes nutritionnelles, climatiques...). Ainsi, il devient essentiel d'intégrer des éléments de conduite culturale dans la réflexion de la mise en place de stratégies pour la recherche, l'utilisation et le déploiement des facteurs génétiques de résistance.

Le développement de pratiques culturales à bas-intrants est aujourd'hui un enjeu majeur. Afin de lutter contre les problèmes environnementaux entraînés par les modes de culture intensifs actuels, les nouvelles directives environnementales impliquent notamment une réduction de la fertilisation azotée. Le colza étant une culture très demandeuse en azote, des programmes scientifiques ambitieux ont été engagés avec une collaboration étroite entre le secteur privé et public, afin de faire évoluer les itinéraires de fertilisation et de développer des cultivars de colza capables d'une meilleure efficacité d'utilisation de l'azote.

L'effet de la fertilisation sur l'incidence de la hernie des crucifères a fait l'objet de quelques travaux, réalisés avec du matériel biologique très divers, qui ont pu mettre en évidence une influence plus ou moins importante, positive ou négative selon les cas, de la fertilisation sur le développement des symptômes de hernie. Cependant, au début de ma thèse très peu d'informations étaient disponibles sur un possible contrôle génétique de la modulation de la réponse du colza à la hernie (et plus largement des *Brassicaceae*) en fonction de l'apport azoté, ou sur les mécanismes cellulaires putativement mis en jeu. Au-delà du pathosystème *Brassica/P. brassicae*, la question de l'influence de la fertilisation azotée sur l'incidence des maladies est une problématique récurrente, bénéficiant de plus en plus des apports de la génomique fonctionnelle. Malgré cela, la compréhension biologique de ces phénomènes reste encore assez préliminaire la plupart des études se situant dans une dimension assez descriptive. Enfin, cette question n'a été jusqu'à présent que très rarement abordée sous l'hypothèse que l'influence de l'environnement pourrait être différente en fonction des facteurs génétiques et des isolats impliqués dans les interactions.

Mes travaux de thèse abordent ces thèmes, avec l'objectif de déterminer l'influence du niveau de fertilisation azotée sur les déterminismes génétiques et physiologiques de résistance à la hernie chez le colza. Au sein de l'équipe d'accueil, je me suis attaché d'abord à étudier l'impact de la fertilisation azotée sur l'architecture génétique de la résistance à la hernie. Des criblages de la résistance à la hernie chez de nombreuses combinaisons génotype de la plante hôte / isolat de l'agent pathogène, ainsi que des analyses génétiques de la résistance à la hernie en conditions différentielles de fertilisation ont été réalisés. Dans un deuxième temps, j'ai étudié les mécanismes moléculaires responsables de la réduction des symptômes du génotype 'Yudal' en condition de faible apport azoté. Une analyse transcriptomique et métabolomique de la réponse de ce génotype a été comparée à celle d'un second génotype, pour lequel la quantité de symptômes n'est pas modulée par le différentiel de fertilisation azotée.

Les résultats majeurs de ces travaux de thèse sont les suivants:

1. •La quantité de symptômes (nombre et taille de galles sur les racines) et la production de spores de repos sont deux variables impactées par le niveau de fertilisation azotée. La modulation de ces deux variables est dépendante de la combinaison génotype de la plante /isolat de l'agent pathogène étudiée, et d'une façon générale elle va dans le sens d'une diminution (des symptômes et du nombre de spores de repos) lorsque l'apport en nitrate est réduit.
2. •La modulation de la quantité de symptômes et de la production de spores de repos, induite par la fertilisation azotée, est liée à la modulation, dans certains cas très importante, de l'effet (R2) de certains des facteurs génétiques impliqués dans la résistance. Dans les populations étudiées, et pour l'isolat eH, la fertilisation affecte principalement l'expression des QTL C09 et C02.
3. •L'augmentation de résistance observée chez le génotype 'Yudal' en condition de faible apport azoté, vis-à-vis de l'isolat eH, semble liée à la surexpression de gènes impliqués dans l'assimilation des nitrates, tels que les gènes de la famille NRT2 et dans le transport de l'auxine. Ces protéines semblent impliquées dans la modulation du développement des racines, ayant pour rôle de limiter la formation des galles.

Je discuterai tout d'abord de la pertinence des approches génétiques utilisées pour étudier l'interaction entre fertilisation, maladie et résistance, et de la portée des résultats pour la sélection et les stratégies agronomiques de gestion de la hernie. Ensuite j'aborderai l'intérêt de la multiplication des méthodes de phénotypage développées dans la thèse, qui nous ont permis d'ouvrir le travail vers différents traits d'histoire de vie de l'agent pathogène et d'apporter un éclairage important sur les questions mécanistiques. Enfin j'évoquerai les difficultés et les éclairages permis par les approches omiques, et nous verrons dans quelle mesure les résultats obtenus ont contribué à faire évoluer notre regard sur l'effet de la contrainte azotée sur le processus d'infection par la hernie.

I Fertilisation et résistance : apports des approches génétiques

Doit-on prendre en compte la fertilisation azotée dans l'étude du pathosystème colza hernie ?

De nombreuses études ont abordé avant nous l'impact de la fertilisation azotée sur la résistance aux maladies (Fagard *et al.*, 2014). Cependant, très peu d'études ont réalisé des criblages à large échelle, en termes de diversité génétique de la plante hôte et/ou de l'agent pathogène, qui permettent véritablement de conclure sur l'importance de la fertilisation azotée sur l'issue de l'interaction plante/pathogène chez un pathosystème. En effet, ces études portaient sur un nombre restreint de génotypes de la plante et/ou d'isolats de l'agent pathogène. Un aspect important de mon travail a été d'étudier cette question, pour le pathosystème *B. napus/P. brassicae*, à l'aide d'un nombre relativement important de génotypes de plante et d'isolats. Les données obtenues lors de ce travail permettent d'évaluer dans quelle mesure ce phénomène de modulation de la résistance par la fertilisation doit être considéré comme un caractère générique, ou au contraire anecdotique. Sur cette conclusion reposera l'intérêt de la prise en compte ou pas, du paramètre fertilisation azotée dans les méthodes de lutte contre la hernie.

Les résultats obtenus ont permis de mettre en évidence que dans le cas de la hernie, même si la modulation du développement des symptômes en fonction de la fertilisation n'est pas systématique, c'est un phénomène fréquent. Des modulations ont été observées avec des isolats européens mais aussi canadiens. Lorsque le développement des symptômes est modulé, cela conduit exclusivement à une réduction en condition de faible apport azoté. Cependant, l'intensité des modulations est variable, pouvant aller jusqu'à entraîner une absence de développement de symptômes. Au vu de ces résultats, on peut conclure que la fertilisation azotée n'a ni un effet systématique sur ce caractère, ni un effet anecdotique, mais un effet dont il faut tenir compte et que l'on ne peut prédire à l'avance du fait de sa dépendance de la combinaison génotype / isolat.

La réduction des apports azotés impacte-t-elle l'architecture génétique de la résistance du colza à la hernie ?

Les résultats des analyses génétiques réalisées pendant ma thèse, que ce soit en utilisant la variable indice pathologique ou la variable production de spores de repos, montrent que la fertilisation azotée entraîne une modulation de l'effet (pourcentage de la variabilité expliquée, R^2) des QTL détectés, mais n'impacte que très légèrement l'architecture génétique. En effet, malgré la présence de génotypes dont l'indice pathologique est fortement modulé par la fertilisation azotée (en réponse à l'infection par l'isolat eH) au sein de la population d'haploïdes doublés issus du croisement entre 'Darmor-bzh' et 'Yudal', la majorité des QTL contrôlant cette variable sont détectés dans les deux conditions de fertilisation. Le même constat est effectué sur la base de la variable production de spores de repos. Par ailleurs, les QTL détectés uniquement dans l'une ou l'autre des conditions de fertilisation azotée expliquent une très faible part de la variabilité observée. Ces résultats diffèrent de ceux obtenus par (Talukder *et al.*, 2005) lors de l'étude de

l'architecture génétique contrôlant la résistance du riz à *M. grisea*. Près de la moitié des QTL détectés par les auteurs sont spécifiques à une condition de fertilisation azotée et ont des effets relativement importants (R^2 supérieur à 10). De façon similaire, les travaux récents d'Aoun *et al.*, (2017) ont montré que l'analyse génétique de la résistance à *R. solanacearum* chez *Arabidopsis* conduit à la détection de QTL de résistance différents en fonction des températures appliquées (ici : standard ou élevées) (Aoun *et al.*, 2017).

En symétrique de l'intérêt que l'on peut porter à la modulation de l'effet des QTL de résistance mise en évidence dans ce travail, il est intéressant de souligner que certains QTL se comportent de façon robuste, indépendamment de la fertilisation. Cet aspect, ainsi que le fait que la modulation se fasse toujours dans le sens « moins de symptômes dans des conditions à faible intrant » sont encourageants dans une perspective de création de variétés résistantes pour des systèmes faibles intrants.

Les résultats montrant la diminution de l'effet du QTL C09 sont à prendre avec précaution. En effet, il est envisageable que cette diminution apparente soit liée au mode de calcul du R^2 : quand l'effet d'un QTL augmente sous l'effet de la contrainte azotée, le R^2 des autres QTL diminue nécessairement. Le caractère artéfactuel de la diminution du QTL C09 serait cohérent avec le fait que les symptômes du génotype Darmor-bzh, très faibles en condition N8, ne sont pas augmentés en condition N1.

De l'intérêt de choisir l'échelle du locus pour étudier les réponses des plantes aux combinaisons de stress

Dans leur milieu naturel, tout comme en conditions agronomiques de culture, les plantes sont soumises à de nombreux stress simultanés. L'effet de la combinaison de facteurs de stress, qu'ils soient biotiques ou abiotiques, ne conduit pas toujours à une réponse additive chez la plante, mais parfois plutôt à une réponse adaptée. Un nombre croissant d'études publiées cherchent à déterminer dans quelle mesure des combinaisons de stress peuvent conduire à des effets positifs ou négatifs, par rapport à l'application des stress indépendamment. Plusieurs articles de synthèse ont été publiés récemment, visant à dégager des tendances générales pour différentes combinaisons de stress (Atkinson and Urwin, 2012 ; Pandey *et al.*, 2017). Dans le cas des combinaisons de stress biotique avec un stress abiotique, cet effort de synthèse vient cependant butter sur la diversité et les contradictions évidentes entre les résultats des travaux publiés, que ce soit entre espèces végétales, mais également au sein d'une même espèce. A la suite de quelques travaux récents menés dans d'autres groupes (Ballini *et al.*, 2013), nos travaux permettent d'apporter un éclairage sur ces contradictions. Nos résultats suggèrent en effet que, d'une façon générale, l'échelle du pathosystème n'est peut-être pas assez fine pour permettre de raisonner sur la modulation des

résistances induites par une contrainte abiotique. La variabilité génétique intraspécifique sur la réponse aux contraintes multiples est peut-être beaucoup plus fréquente que ne le laissent penser les articles de synthèse publiés à ce sujet. Cette variabilité est peut-être d'autant plus fréquente dans le cas d'interactions biotique x abiotique, puisqu'elle prend en compte la variabilité des deux organismes, plante et agent pathogène. Les approches génétiques pour l'étude des réponses aux combinaisons de contraintes supposent bien sûr des dispositifs expérimentaux conséquents, mais nos résultats suggèrent que ces efforts seront nécessaires pour faire avancer toutes ces questions émergentes.

II Diversification des variables de phénotypage

L'importance de la quantification des spores de repos dans le contrôle de la hernie

La hernie est un agent pathogène tellurique ayant une capacité de survie dans le sol pendant de nombreuses années à l'état de spores de repos (Wallenhammar, 1996), ce qui complexifie son contrôle. Les variétés résistantes actuelles, créées par introgression de facteurs de résistance limitant le développement des symptômes, doivent permettre de limiter, voir supprimer, l'impact de la maladie sur le rendement. L'utilisation de ces variétés résistantes doit également permettre la réduction de la quantité d'inoculum dans le sol. Différentes études ont montré que la quantité de spores de repos produites, suite à l'infection par *P. brassicae*, était plus faible chez les génotypes résistants que chez les génotypes sensibles (Siemens *et al.*, 2002 ; Hwang *et al.*, 2013). Cependant, la quantité de spores de repos chez les cultivars résistants reste conséquente et a pour effet de ne réduire que faiblement la quantité d'inoculum dans le sol à chaque cycle cultural (Hwang *et al.*, 2013). La persistance d'une forte concentration de spores de repos dans le sol fait partie des facteurs favorisant le contournement des résistances génétiques par l'agent pathogène par augmentation de la pression d'inoculum.

Partant de cette problématique, nous avons étudié l'architecture génétique de la production de spores de repos chez le colza. Dans ce but, nous avons utilisé une méthode développée au laboratoire de quantification des spores de repos produites dans les racines de la plante hôte, afin de pouvoir quantifier rapidement un grand nombre d'échantillons. Cette technique robuste avait dans un premier temps été utilisée pour réaliser la quantification de spores de repos dans un nombre restreint d'écotypes d'*A. thaliana* (Gravot *et al.*, 2016). Les modifications réalisées sur cette méthode, visant à permettre son utilisation sur le colza et à augmenter le débit d'échantillons, ont permis de réaliser une analyse génétique sur la variable 'production de spores de repos'. Les résultats n'ont pas permis de découpler l'architecture génétique impliquée dans le développement des symptômes et celle impliquée dans la production des spores de repos. En effet, dans notre cas,

nous avons identifié les mêmes QTL principaux pour les deux variables (QTL C02 et QTL C09a). Cependant, l'efficacité de ces QTL varie fortement selon la variable étudiée en condition de faible apport azoté. De ce fait, la prise en compte de cette variable peut permettre de déterminer les QTL de résistance les plus pertinents pour une utilisation en amélioration des plantes. Nos travaux comparatifs ne portent que sur une population issue du croisement entre deux génotypes, il est donc possible qu'une analyse plus large de diversité génétique permette l'identification de QTL spécifiquement impliqués dans le contrôle de la production de spores de repos.

Au-delà de la prise en compte de l'effet des QTL sur le nombre de spores, et de la modulation parfois spectaculaire de leur effet par la fertilisation (exemple du QTL C02 avec l'isolat eH), nos résultats soulignent que la baisse de fertilisation azotée induit une forte réduction (près d'un facteur 10 dans nos conditions) du nombre de spores produites par les plantes malades. D'une manière générale, l'effet du niveau de fertilisation azotée sur le contenu en spores de repos des galles est globalement plus important que son effet sur l'indice pathologique. Autrement dit la prise en compte de la fertilisation azotée est non seulement importante pour la lutte contre les dégâts provoqués par la hernie, mais également pour raisonner la lutte contre les épidémies de hernie sur des échelles pluriannuelles. Par ailleurs, dans un contexte où les niveaux de résistance à la hernie sont en passe d'être pris en compte pour l'inscription variétale (Orgeur *et al.*, 2015), nos résultats suggèrent qu'une note de résistance basée sur l'indice pathologique pourrait avantageusement être associée à une seconde note basée sur le nombre de spores générées par plante infectée.

L'utilisation de la quantification de l'ADN de l'agent pathogène pour comprendre la résistance

La quantification de l'ADN de l'agent pathogène, présent dans les racines de la plante hôte, est une méthode qui a été utilisée dans des travaux précédents avec l'objectif de prédire le niveau de résistance des plantes hôtes sans nécessiter d'attendre la fin du cycle d'infection pour quantifier les symptômes. A la suite des travaux de Lemarié *et al.*, (2015), nous avons ici quantifié l'ADN de *P. brassicae* pour chercher à comprendre comment s'articulent le développement des symptômes et de l'agent pathogène durant le cycle d'infection, pour mieux comprendre les processus en jeu. Notre étude a permis ainsi de montrer que la résistance 1mM dépendante du génotype 'Yudal' est liée à une réduction de la vitesse de croissance de la galle, avec un feedback tardif sur les dernières étapes de développement de *P. brassicae*. Ces résultats permettent donc de réaliser une distinction entre les processus de résistance 'actifs' associés à la mise en place de défenses biochimiques (protéines PR, métabolisme de défense...), et les réponses développementales, mettant en jeu des réponses impactant le développement pathologique (hyperplasie et hypertrophie) des cellules racinaires dans les racines infectées. Dans ce pathosystème pour lequel le symptôme, la galle,

constitue une niche écologique nécessaire pour le développement de l'agent pathogène (Malinowski, 2012), il existe des rapports de causalité réciproques entre prolifération de l'agent pathogène et développement des symptômes. L'étude cinétique DNA/symptômes a permis de montrer que l'augmentation de la résistance du génotype 'Yudal' en condition 1 mM de nitrate, était dans un premier temps une réponse développementale. En effet, la réduction à 27 dpi de la réponse développementale à l'infection (réduction de la formation de galle à quantité d'agent pathogène identique) est un évènement qui précède la réduction de la prolifération du pathogène au stade final 42 dpi, et la formation de spores de repos. Ce résultat prend tout son sens à la lumière des analyses omiques qui soulignent que les réponses de défense mises en place chez 'Yudal' et HD018 sous contrainte azotée sont globalement similaires : la différence, au moins pour les temps précoces du développement de la galle, ne se joue apparemment donc pas sur le plan de la capacité à déclencher les batteries de réponses 'conventionnelles' de défense.

III Utilisation d'approches omiques pour identifier les réponses moléculaires impliquées dans la résistance à la hernie

Les complexités liées à l'utilisation d'approches omiques chez le pathosystème colza – *P. brassicae*

Les analyses omiques sont des outils puissants pour caractériser les réponses moléculaires d'un organisme à des facteurs biotiques et abiotiques. Cependant, selon l'organisme étudié, ou les organismes étudiés dans le cas des pathosystèmes, ces analyses peuvent être plus ou moins complexes. Dans le cas du colza, les études transcriptomiques sont nettement facilitées depuis le séquençage et l'assemblage du génome de Darmor-bzh (Chalhoub *et al.*, 2014). En effet, la disponibilité d'un génome de référence de bonne qualité n'entraîne plus l'obligation d'avoir recours à des méthodes d'alignement *de novo*, qui sont hautement consommatrices en temps et en puissance de calcul. Cependant, du fait du caractère allotétraploïde de *B. napus*, une réflexion méthodologique importante en amont de l'analyse a été nécessaire. En effet, la présence de copies multiples de gènes au sein du génome nécessite un séquençage de fragments de taille suffisante pour parvenir à maximiser l'alignement unique des reads et ainsi limiter les biais introduits par les alignements multiples sur le génome. En effet, un alignement multiple implique que l'on ne peut pas différencier l'expression des copies d'un gène. Pour cette raison, nous avons choisi de séquencer des fragments de 2 x 150 paires de bases en paired-end. Le second point essentiel à prendre en compte lors d'une analyse RNA-seq chez *B. napus* est la taille de son génome (849,7 Mb) et le nombre de gènes qu'il comporte (101 040 gènes annotés) (Chalhoub *et al.*, 2014). En effet, ce paramètre détermine la profondeur de séquençage nécessaire afin de pouvoir détecter et exploiter l'expression des gènes faiblement exprimés lors des analyses statistiques. Dans le cas

de cette étude, l'utilisation d'une profondeur de séquençage élevée était d'autant plus cruciale que la moitié des échantillons étaient infectés par *P. brassicae*, et que les données transcriptomiques issues de cet organisme devaient être analysés dans le cadre d'autres projets menés au sein du laboratoire. Pour cette raison nous avons utilisé la technologie Illumina Hiseq 4 000, qui nous a permis d'augmenter notre profondeur de séquençage (47 millions de reads par échantillons) pour un coût semblable en comparaison des technologies Illumina Hiseq plus anciennes.

Outre les questions techniques liées à l'utilisation de méthodes omiques sur le colza, les interprétations issues de ces jeux de données transcriptomiques et métabolomiques sont dépendantes de la capacité à relier un gène à une fonction et un mass tag à un composé identifié. Dans le cadre des analyses transcriptomiques sur le colza, la fonction du gène est établie à partir de son homologie de séquence avec les gènes d'*A. thaliana*. Cependant, de nombreux gènes du colza ne possèdent pas d'homologue chez *A. thaliana*. Dans ce cas de figure, il est possible d'obtenir des informations sur ce gène, à l'aide de blast nucléotidiques ou protéiques sur des bases de données (NCBI) ou encore par identification de motifs connus dans la séquence protéique correspondante à ce gène. Cependant, ces approches permettent rarement d'aboutir à une fonction précise du gène. De ce fait, on tente d'expliquer le fonctionnement d'une réponse chez le colza au travers des connaissances fonctionnelles d'*A. thaliana*, qui aussi proche soit elle phylogénétiquement, présente des spécificités de réponse qu'il est difficile de mettre en évidence. Ce problème a été particulièrement visible lors de l'étude de la réponse de 'Yudal' et HD018 à l'infection en condition 8 mM, mettant en évidence un grand nombre de gènes sans homologue chez *A. thaliana* parmi les gènes les plus différentiellement exprimés. Dans le cadre des analyses métabolomiques, le constat est encore plus cruel. En effet, actuellement les bases de données plantes sont très loin d'être exhaustives. Ce manque d'exhaustivité peut s'expliquer par l'importante complexité du métabolome. Cependant, à cela s'ajoute le problème des correspondances multiples lié à la discrimination des composés sur la base de leur m/z. Le m/z est spécifique à la formule chimique du composé, même si deux composés ayant une formule chimique très différente, peuvent avoir un m/z très proche. Cependant, la précision des spectromètres de masse n'est pas toujours suffisante pour discriminer deux composés au m/z proche. Les méthodes de MS/MS qui consiste à mesurer le m/z d'un composé avant de le fragmenter pour mesurer le m/z des fragments produits est une méthode efficace pour pallier ce problème.

Les scénarios pour expliquer la résistance de 'Yudal'

Nous avons abordé initialement le chapitre mécanistique avec une hypothèse duale : d'une part la résistance induite par la carence azotée chez 'Yudal' pourrait être liée à la qualité nutritionnelle des tissus racinaires, qualité qui influencerait la capacité de prolifération de l'agent

pathogène. La seconde hypothèse initialement posée était que la contrainte azotée pouvait influencer différenciellement la mise en place des défenses en fonction des génotypes.

Selon la première hypothèse, que nous appellerons hypothèse trophique, l'augmentation de la résistance pourrait être expliquée par la différence de tolérance des génotypes à la carence azotée. Le postulat de départ de cette hypothèse est que les génotypes les moins tolérants à la carence azotée sont ceux dont la résistance est la plus augmentée par la carence, du fait de leur capacité d'assimilation d'azote minéral plus faible. Cette plus faible capacité d'assimilation de l'azote minéral entraînant une réduction de la synthèse d'acides aminés, devenant alors le facteur limitant du développement de *P. brassicae*. Cependant, plusieurs éléments contredisent cette hypothèse.

Premièrement, nous avons mis en évidence que la quantité d'azote présent dans les parties aériennes, ainsi que la biomasse aérienne produite (fortement lié à la quantité d'azote), de plantes non inoculées de deux génotypes, 'Darmor-bzh' et 'Yudal', aux comportements contrastés vis-à-vis de la modulation de la résistance à la hernie, était semblable. De ce point de vue, il est donc possible que deux génotypes ayant une tolérance similaire à la carence azotée, ne présentent pas le même niveau de modulation de résistance. Afin d'étayer cette observation, nous avons étudié la biomasse totale produite en condition 1 mM d'azote et le delta d'indice pathologique entre les conditions 1 mM et 8 mM d'azote, pour un nombre plus large de génotypes, de la population d'haploïdes doublés issus du croisement entre Darmor-bzh et 'Yudal'. Ces résultats ont confirmé l'absence de relation entre la tolérance à la carence azotée et la modulation de la résistance. Pour autant, l'ensemble de ces analyses se basant uniquement sur le génome de deux génotypes, Darmor-bzh et 'Yudal', il aurait pu s'agir d'un cas particulier. Cependant, le caractère génotype / isolat dépendant de la modulation de la résistance par la fertilisation azotée apporte un autre argument contradictoire à l'explication de la modulation de la résistance par la tolérance à la carence azotée des génotypes. En effet, malgré un niveau de tolérance à la carence azotée unique, la résistance des génotypes n'est pas uniformément modulée lors de l'infection par l'ensemble des isolats de *P. brassicae* testés. L'impact de la fertilisation azotée sur la résistance à la hernie est donc plus complexe qu'une simple relation trophique entre la plante hôte et l'agent pathogène, mais semblerait plus s'expliquer par une induction de nouveaux mécanismes ou une amplification de ceux déjà mis en œuvre par la plante.

De façon intéressante, les résultats obtenus n'appuient pas vraiment non plus le second scénario, puisque la multiplication des approches (profilages métaboliques, hormonaux transcriptionnels) converge vers l'idée qu'en situation de double contrainte, les deux génotypes développent - en apparence tout du moins - des réponses de défense très semblables. Les résultats des analyses transcriptomiques présentés dans le second chapitre de cette thèse nous engagent

finalement aujourd'hui sur une troisième piste, qui est une piste associée aux réponses développementales. 'Yudal' se distingue de HD018 par sa capacité à induire, sous la double contrainte, un set de gènes impliqués dans l'assimilation de l'azote inorganique. La mise en évidence de telles fonctions peut sembler étonnante au regard de la discussion qui précède sur l'apparente similarité de réponses métaboliques à la contrainte azotée. Ce paradoxe pourrait s'expliquer par la possible signification signalétique de cette réponse transcriptionnelle, puisque la régulation de ces gènes a été décrite comme associée à des phénomènes d'induction de racines secondaires. Cette analyse rejoint de façon surprenante les résultats obtenus dans d'autres travaux réalisés au sein du laboratoire, qui ont récemment montré qu'une série de mutants d'*Arabidopsis* affectés pour la mise en place des racines secondaires, développent davantage de symptômes de hernie. Ces résultats suggèrent que les processus signalétiques sous-jacents à l'induction des racines secondaires pourraient être antagonistes à ceux associés au développement des galles. Cette nouvelle hypothèse ouvre de nouvelles perspectives stimulantes : la variabilité génétique des réponses de développement des racines sous contraintes minérales, au sens large, pourrait être pour partie liée à la variabilité du développement des symptômes de galles.

IV Perspectives

Détection de facteurs génétiques de résistance à la hernie adaptés à l'agriculture extensive canadienne

Les criblages de la réponse à l'infection par 5 isolats canadiens de *P. brassicae* chez 9 géotypes de colza ont permis de mettre en évidence des sources de résistances partielles pour l'ensemble des isolats. Parmi ces résistances partielles, certaines sont stables dans les deux conditions de fertilisation azotée et d'autres sont plus efficaces en condition de faible apport azoté. L'ensemble de ces sources de résistance à la hernie sont par conséquent potentiellement intéressantes afin de contrôler la hernie dans un système d'agriculture extensive, tel qu'il est pratiqué au Canada. Les géotypes utilisés pour réaliser ces criblages étant tous des parents d'une population NAM (Nested Association Mapping) disponible au sein de l'UMR, il sera donc possible de réaliser des analyses génétiques de liaisons afin de déterminer les facteurs génétiques contrôlant ces résistances partielles.

Au vu des résultats des criblages, il semble possible d'identifier deux types de facteurs génétiques de résistance : i) des facteurs génétiques de résistance dont l'effet reste stable indépendamment de la fertilisation azotée et ii) des facteurs génétiques de résistance particulièrement efficace en condition de faible apport azoté. La stratégie optimale de détection de ces deux types de facteurs génétiques consisterait à sélectionner deux parents au niveau de résistance le plus contrasté possible afin de maximiser les chances que ces deux géotypes

possèdent des QTL différents, afin de maximiser leur détection. Pour ce faire, il serait donc nécessaire de sélectionner la population d'HD issue du croisement entre le géotype le plus sensible, indépendamment de la fertilisation azote, et le géotype le plus résistant ou le plus modulé, et ce pour l'ensemble des isolats testés.

Quel est l'impact du QTL C02 dans la modulation de la résistance ?

Confirmer l'importance du QTL C02 dans la réduction de symptôme observée chez 'Yudal' en condition de faible apport azoté

L'analyse génétique par liaison réalisée sur la population d'haploïdes doublés, issus du croisement entre 'Darmor-*bzh*' et 'Yudal', a permis de mettre en évidence des QTL de résistance à l'isolat eH dont l'effet (R^2) est augmenté en 1mM. Parmi ces QTL, celui présent sur le chromosome C02 correspond au QTL dont l'effet est le plus fortement augmenté. Cependant, son effet reste modéré et semblerait par conséquent trop faible pour expliquer, à lui seul, la réduction de symptôme observée chez un géotype tel que 'Yudal'. Cela étant, nous avons émis l'hypothèse que la présence du QTL majeur sur le chromosome C09 entraîne une minimisation de l'effet du QTL C02 de par la présence de l'allèle de résistance à ce QTL chez de nombreux géotypes possédant l'allèle de résistance au QTL C02.

Pour cette raison, nous avons initié un criblage de deux sets de géotypes possédant les mêmes profils que les géotypes 'Yudal' et HD018 au principaux QTL détectés (sur les chromosomes C09, C02 et C03) lors de l'analyse de liaison. Les 9 HD du premier set possèdent l'allèle de résistance au QTL C02 et C03, mais l'allèle de sensibilité au QTL C09, tout comme 'Yudal'. Les 9 HD du second set possèdent quant à eux l'allèle de résistance au QTL C03 et l'allèle de sensibilité au QTL C02 et C09, tout comme le géotype HD018. Ces géotypes ont également été sélectionnés afin d'obtenir une proportion homogène entre l'allèle 'Darmor-*bzh*' et l'allèle 'Yudal' au niveau des autres SNP de l'analyse. Les premiers résultats d'indice pathologiques montrent un delta important, en moyenne 25 points d'IP, chez les géotypes de type 'Yudal', alors que l'on n'observe pas de delta chez les géotypes de type HD018. Le delta des géotypes de type 'Yudal' étant très proche de celui de 'Yudal' lui-même, cela laisse penser que le QTL C02 joue un rôle majeur dans la réduction des symptômes en condition 1mM observée chez ce géotype.

Si ces résultats préliminaires se confirment, nous étudierons la possibilité de réaliser une nouvelle analyse de génétique de liaison sur cette même population d'haploïdes doublés issue du croisement entre 'Darmor-*bzh*' et 'Yudal', en utilisant uniquement des géotypes possédant l'allèle de sensibilité au QTL C09. Cela aurait pour conséquence d'éliminer le biais potentiel dans l'estimation de l'effet des autres QTL détectés. De plus, du fait des résultats précédemment

obtenus, nous sommes actuellement en capacité d'homogénéiser les combinaisons de QTL au sein des génotypes sélectionnés.

Identification du/des gènes causaux de l'effet du QTL C02

Les analyses transcriptomiques ont permis de mettre en évidence des gènes candidats afin d'expliquer la réduction de symptômes observée chez le génotype 'Yudal' en condition 1mM. Cependant, aucun de ces gènes ne se trouve dans l'intervalle de confiance du QTL C02, qui semble pourtant être le principal responsable du phénotype de 'Yudal'. Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat :

i) la variation entre l'allèle 'Yudal' et 'Darmor-*bzh*' correspond à une variation de séquence du/des gènes causaux entraînant une modification de sa fonction. Afin de déterminer les variations de séquences (SNP ou absence/présence du gène) des gènes présents dans l'intervalle de confiance du QTL C02, nous étudions la possibilité de réaliser un séquençage complet de la région du QTL C02 chez les génotypes 'Yudal' et HD018. Ce séquençage serait réalisé à l'aide de banque BAC et nous permettrait de comparer les séquences de l'ensemble des gènes de ce QTL en fonction de leur version allélique ('Yudal' ou 'Darmor-*bzh*').

ii) la variation entre l'allèle 'Yudal' et 'Darmor-*bzh*' se traduit par une modification du niveau de transcription du/des gènes causaux dans les parties aériennes de la plante. L'étude de l'expression des gènes du QTL C02 dans les parties aériennes est également envisageable. Cependant, nous privilégierons l'analyse de gènes candidats par PCRq, sur la base de leur relation avec les gènes mis en évidence lors de l'analyse transcriptomique (transporteur de nitrate et de l'auxine).

Validation fonctionnelle de l'effet des gènes identifié lors de l'analyse transcriptomique

L'une des méthodes les plus rapides et efficaces, afin d'étudier la fonction d'un gène de *B. napus*, est de tester la mutation de ce gène chez une autre plante de la famille des brassica, la plante modèle *A. thaliana*. En effet, il existe d'ores et déjà des mutants chez l'écotype Col-0 pour un très grand nombre de gènes. Cependant, dans notre cas, les réponses à l'infection chez 'Yudal' et 'Darmor-*bzh*' portent une forte composante de réponses de la voie du salicylate, et à ce titre sont beaucoup plus proches des réponses physiologiques à l'infection que l'on peut observer chez Bur-0 que chez Col-0. Malheureusement, le nombre de mutants réalisés chez cet écotype est beaucoup plus restreint et il n'existe par exemple pas de mutant du gène NRT2.2 (l'un de nos principaux gènes candidat), il sera donc nécessaire de le créer. Mais avant cela, il sera également essentiel de tester l'impact de la réduction de fertilisation azotée sur le niveau de résistance de Bur-0 (sachant déjà que celui de Col-0 n'est pas affecté par la réduction de fertilisation azotée) ainsi que de vérifier le niveau d'expression des gènes candidats.

Dans le cas où Bur-0 ne permettrait pas de tester nos gènes candidats, il faudrait alors envisager de muter ces gènes chez le génotype 'Yudal' par CRISPR. Cependant, la technique de CRISPR est complexe chez les espèces polyploïdes de par la présence de nombreuses copies de chaque gène dans le génome (6 en moyenne chez le colza).

Utilisation des données de métabolomique et de transcriptomique afin de répondre à d'autres questions

Les jeux de données métabolomique et transcriptomique, générés afin de déterminer les réponses moléculaires impliquées dans la réduction des symptômes du génotype 'Yudal' en condition 1mM, comportent une quantité importante d'informations, ne se limitant pas seulement à cet objectif. En effet, le design expérimental utilisé pour réaliser ces deux jeux de données comporte un facteur abiotique et un facteur biotique qui peuvent être étudiés indépendamment l'un de l'autre, et cela sur une cinétique. Nous avons ainsi prévu d'analyser l'impact de la carence azotée sur de jeunes plantes de colza, comme cela a pu être fait sur *A. thaliana* (Krapp *et al.*, 2011). Il est également à l'étude de réaliser une analyse de la réponse du génotype 'Yudal', partiellement sensible en condition 8mM de nitrate, à l'infection par *P. brassicae* afin de caractériser la réponse salicylate et de la comparer avec celle observée chez *A. thaliana* (Jubault *et al.*, 2013). De plus, la disponibilité de jeux de données transcriptomiques et métabolomiques obtenus sur les mêmes échantillons offre des possibilités d'études fines de voies de synthèse de composés comportant encore des inconnues, tel que celle des glucosinolates.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbes Z., Kharrat M., Delavault P., Chaïbi W., Simier P. (2009) Nitrogen and carbon relationships between the parasitic weed *Orobanche foetida* and susceptible and tolerant faba bean lines. *Plant physiology and biochemistry* 47:153–159.
- Achuo E.A., Prinsen E., Höfte M. (2006) Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. *Plant pathology* 55:178–186.
- Agarwal A., Kaul V., Faggian R., Rookes J.E., Ludwig-Müller J., Cahill D.M. (2011) Analysis of global host gene expression during the primary phase of the *Arabidopsis thaliana*–*Plasmodiophora brassicae* interaction. *Functional plant biology* 38:462–478.
- Ahmed H.U., Hwang S.F., Strelkov S.E., Gossen B.D., Peng G., Howard R.J., Turnbull G.D. (2011) Assessment of bait crops to reduce inoculum of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) of canola. *Canadian journal of plant science* 91:545–551.
- Alix K., Lariagon C., Delourme R., Manzanares-Dauleux M.J. (2007) Exploiting natural genetic diversity and mutant resources of *Arabidopsis thaliana* to study the *A. thaliana*–*Plasmodiophora brassicae* interaction. *Plant breeding* 126:218–221.
- Amtmann A., Troufflard S., Armengaud P. (2008) The effect of potassium nutrition on pest and disease resistance in plants. *Physiologia plantarum* 133:682–691.
- Aoun N., Tauleigne L., Lonjon F., Deslandes L., Vaillau F., Roux F., Berthomé R. (2017) Quantitative Disease Resistance under Elevated Temperature: Genetic Basis of New Resistance Mechanisms to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in plant science* 8:1387.
- Arabidopsis* Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408:796–815.
- Atkinson N.J., Urwin P.E. (2012) The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of experimental botany* 63:3523–3543.
- Auer S., Ludwig-Müller J. (2014) Effects of the endophyte *Acremonium alternatum* on oilseed rape (*Brassica napus*) development and clubroot progression. *Albanian Journal of Agricultural Sciences*:15.
- Ayers G.W. (1944) Studies on the life history of the club root organism, *Plasmodiophora brassicae*. *Canadian journal of research* 22c:143–149.
- Ballini E., Nguyen T.T., Morel J.-B. (2013) Diversity and genetics of nitrogen-induced susceptibility to the blast fungus in rice and wheat. *Rice* 6:32.
- Baxter L., Tripathy S., Ishaque N., Boot N., Cabral A., Kemen E., Thines M., Ah-Fong A., Anderson R., Badejoko W., Bittner-Eddy P., Boore J.L., Chibucos M.C., Coates M., Dehal P., Delehaunty K., Dong S., Downton P., Dumas B., Fabro G., Fronick C., Fuerstenberg S.I., Fulton L., Gaulin E., Govers F., Hughes L., Humphray S., Jiang R.H.Y., Judelson H., Kamoun S., Kyung K., Meijer H., Minx P., Morris P., Nelson J., Phuntumart V., Qutob D., Rehmany A., Rougon-Cardoso A., Ryden P., Torto-Alalibo T., Studholme D., Wang Y., Win J., Wood J., Clifton S.W., Rogers J., Van den Ackerveken G., Jones J.D.G., McDowell J.M., Beynon J., Tyler B.M. (2010) Signatures of adaptation to obligate biotrophy in the *Hyaloperonospora arabidopsidis* genome. *Science* 330:1549–1551.
- Bayles R., Flath K., Hovmøller M., de Vallavieille-Pope C. (2000) Breakdown of the Yr17 resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. *Agronomie* 20:805–811.
- Bernard S.M., Habash D.Z. (2009) The importance of cytosolic glutamine synthetase in nitrogen assimilation and recycling. *The New phytologist* 182:608–620.

Références Bibliographiques

- Bittel P., Robatzek S. (2007) Microbe-associated molecular patterns (MAMPs) probe plant immunity. *Current opinion in plant biology* 10:335–341.
- Blazquez M.A., Santos E., Flores C.-L., Martínez-Zapater J.M., Salinas J., Gancedo C. (1998) Isolation and molecular characterization of the *Arabidopsis* TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *The Plant journal* 13:685–689.
- Bohnsack C.W., Albert L.S. (1977) Early effects of boron deficiency on indoleacetic Acid oxidase levels of squash root tips. *Plant physiology* 59:1047–1050.
- Braselton J.P. (1982) Karyotypic analysis of *Plasmodiophora brassicae* based on serial thin sections of pachytene nuclei. *Canadian journal of botany* 60:403–408.
- Brodmann A., Schuller A., Ludwig-Müller J., Aeschbacher R.A., Wiemken A., Boller T., Wingler A. (2002) Induction of trehalase in *Arabidopsis* plants infected with the trehalose-producing pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Molecular plant-microbe interactions* 15:693–700.
- Brooks D.M., Bender C.L., Kunkel B.N. (2005) The *Pseudomonas syringae* phytotoxin coronatine promotes virulence by overcoming salicylic acid-dependent defences in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant pathology* 6:629–639.
- Bryan R.J., Trese A.T., Braselton J.P. (1996) Molecular karyotypes for the obligate, intracellular, plant pathogens, *Plasmodiophora brassicae* and *Spongospora subterranea*. *Mycologia* 88:358–360
- Buczacki S.T., Cadd S.E. (1976) Size distribution of the clubroot organism, *Plasmodiophora brassicae*. *Transactions of the British Mycological Society* 67:133–136.
- Buczacki S.T., Ockendon J.G. (1979) Preliminary observations on variation in susceptibility to clubroot among collections of some wild crucifers. *The Annals of applied biology* 92:113–118.
- Buczacki S.T., Toxopeus H., Mattusch P., Johnston T.D., Dixon G.R., Hobolth L.A. (1975) Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach. *Transactions of the British Mycological Society* 65:295–303.
- Burki F., Kudryavtsev A., Matz M.V., Aglyamova G.V., Bulman S., Fiers M., Keeling P.J., Pawlowski J. (2010) Evolution of *Rhizaria*: new insights from phylogenomic analysis of uncultivated protists. *BMC evolutionary biology* 10:377.
- Butcher D.N., El-Tigani S., Ingram D.S. (1974) The role of indole glucosinolates in the club root disease of the *Cruciferae*. *Physiological Plant Pathology* 4:127–140.
- Camañes G., Pastor V., Cerezo M., García-Agustín P., Flors Herrero V. (2012) A deletion in the nitrate high affinity transporter NRT2.1 alters metabolomic and transcriptomic responses to *Pseudomonas syringae*. *Plant signaling & behavior* 7:619–622.
- Camanes G., Pastor V., Cerezo M., García-Andrade J., Vicedo B., García-Agustín P., Flors V. (2012) A deletion in NRT2.1 attenuates *Pseudomonas syringae*-induced hormonal perturbation, resulting in primed plant defenses. *Plant physiology* 158:1054–1066.
- Canales J., Moyano T.C., Villarroel E., Gutiérrez R.A. (2014) Systems analysis of transcriptome data provides new hypotheses about *Arabidopsis* root response to nitrate treatments. *Frontiers in plant science* 5:22.
- Cantu D., Vicente A.R., Labavitch J.M., Bennett A.B., Powell A.L.T. (2008) Strangers in the matrix: plant cell walls and pathogen susceptibility. *Trends in plant science* 13:610–617.
- Cao Y., Liang Y., Tanaka K., Nguyen C.T., Jedrzejczak R.P., Joachimiak A., Stacey G. (2014) The kinase LYK5 is a major chitin receptor in *Arabidopsis* and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *Elife* 3:e03766
- Cao T., Srivastava S., Rahman M.H., Kav N.N.V., Hotte N., Deyholos M.K., Strelkov S.E. (2008) Proteome-level changes in the roots of *Brassica napus* as a result of *Plasmodiophora brassicae* infection. *Plant science* 174:97–115.

Références Bibliographiques

- Cassman K.G., Dobermann A., Walters D.T. (2002) Agroecosystems, nitrogen-use efficiency, and nitrogen management. *Ambio* 31:132–140.
- Catanzariti A.-M., Dodds P.N., Lawrence G.J., Ayliffe M.A., Ellis J.G. (2006) Haustorially expressed secreted proteins from flax rust are highly enriched for avirulence elicitors. *The Plant cell* 18:243–256.
- Cerezo M., Tillard P., Filleur S., Muñoz S., Daniel-Vedele F., Gojon A. (2001) Major alterations of the regulation of root NO₃- uptake are associated with the mutation of Nrt2. 1 and Nrt2. 2 genes in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 127:262–271.
- Chai A.L., Xie X.W., Shi Y.X., Li B.J. (2014) Research status of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on cruciferous crops in China. *Canadian journal of plant pathology* 36:142–153.
- Chalhoub B., Denoeud F., Liu S., Parkin I.A.P., Tang H., Wang X., Chiquet J., Belcram H., Tong C., Samans B., Corrêa M., Da Silva C., Just J., Falentin C., Koh C.S., Le Clainche I., Bernard M., Bento P., Noel B., Labadie K., Alberti A., Charles M., Arnaud D., Guo H., Daviaud C., Alamery S., Jabbari K., Zhao M., Edger P.P., Chelaifa H., Tack D., Lassalle G., Mestiri I., Schnel N., Le Paslier M.-C., Fan G., Renault V., Bayer P.E., Golicz A.A., Manoli S., Lee T.-H., Thi V.H.D., Chalabi S., Hu Q., Fan C., Tollenaere R., Lu Y., Battail C., Shen J., Sidebottom C.H.D., Wang X., Canaguier A., Chauveau A., Bérard A., Deniot G., Guan M., Liu Z., Sun F., Lim Y.P., Lyons E., Town C.D., Bancroft I., Wang X., Meng J., Ma J., Pires J.C., King G.J., Brunel D., Delourme R., Renard M., Aury J.-M., Adams K.L., Batley J., Snowdon R.J., Tost J., Edwards D., Zhou Y., Hua W., Sharpe A.G., Paterson A.H., Guan C., Wincker P. (2014) Plant genetics. Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345:950–953.
- Chen X.M. (2005) Epidemiology and control of stripe rust [*Puccinia striiformis* f. sp. tritici] on wheat. *Canadian journal of plant pathology* 27:314–337.
- Chiang, M. S., Chiang, B. Y., Grant, W. F. (1977). Transfer of resistance to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* from *Brassica napus* to cabbage (*B. oleracea* var. *capitata*). I. Interspecific hybridization between *B. napus* and *B. oleracea* var. *capitata*. *Euphytica* 26(2):319-336.
- Chiang M.S., Crête R. (1985) Acadie: clubroot resistant cabbage cultivar. *Canadian journal of plant science* 65:233–235.
- Chiang M.S., Crete R. (1989) Richerlain: a clubroot-resistant cabbage cultivar. *Canadian journal of plant science* 69:337–340.
- Chiba Y., Shimizu T., Miyakawa S., Kanno Y., Koshiba T., Kamiya Y., Seo M. (2015) Identification of *Arabidopsis thaliana* NRT1/PTR FAMILY (NPF) proteins capable of transporting plant hormones. *Journal of plant research* 128:679–686.
- Chong C., Chiang M.S., Crete R. (oct1981) Thiocyanate ion content in relation to clubroot disease severity in cabbages [by *Plasmodiophora brassicae*]. *HortScience* 16.
- Chong C., Chiang M.S., Crete R. (1985) Studies on glucosinolates in clubroot resistant selections and susceptible commercial cultivars of cabbages. *Euphytica* 34:65–73.
- Chopin F., Orsel M., Dorbe M.-F., Chardon F., Truong H.-N., Miller A.J., Krapp A., Daniel-Vedele F. (2007) The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. *The Plant cell* 19:1590–1602.
- Chung E.-H., El-Kasmi F., He Y., Loehr A., Dangl J.L. (2014) A plant phosphoswitch platform repeatedly targeted by type III effector proteins regulates the output of both tiers of plant immune receptors. *Cell host & microbe* 16:484–494.
- Clark B.J. (2012) The mammalian START domain protein family in lipid transport in health and disease. *The Journal of endocrinology* 212:257–275.

Références Bibliographiques

- Cook D.E., Lee T.G., Guo X., Melito S., Wang K., Bayless A.M., Wang J., Hughes T.J., Willis D.K., Clemente T.E., Diers B.W., Jiang J., Hudson M.E., Bent A.F. (2012) Copy number variation of multiple genes at *Rhg1* mediates nematode resistance in soybean. *Science* 338:1206–1209.
- Crawford N.M., Glass A.D.M. (1998) Molecular and physiological aspects of nitrate uptake in plants. *Trends in plant science* 3:389–395.
- Crute I.R., Gray A.R., Crisp P., Buczacki S.T. (1980) Variation in *Plasmodiophora brassicae* and resistance to clubroot disease in brassicas and allied crops—a critical review. *Plant Breeding* 50:91–104.
- Dangl J.L., Jones J.D. (2001) Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature* 411:826–833.
- Das A.K., Mitra D.K. (1993) The effect of little leaf disease on nitrogen metabolism in brinjal. *Int J Trop Plant Dis* 11:196.
- Debieu M., Huard-Chauveau C., Genissel A., Roux F., Roby D. (2016) Quantitative disease resistance to the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* involves an *Arabidopsis* immune receptor pair and a gene of unknown function. *Molecular plant pathology* 17:510–520.
- Dechorgnat J., Patrit O., Krapp A., Fagard M., Daniel-Vedele F. (2012) Characterization of the *Nrt2.6* gene in *Arabidopsis thaliana*: a link with plant response to biotic and abiotic stress. *PLoS one* 7:e42491.
- Dekhuijzen H.M. (1981) The occurrence of free and bound cytokinins in plasmodia of *Plasmodiophora brassicae* isolated from tissue cultures of clubroots. *Plant cell reports* 1:18–20.
- Dekhuijzen H.M., Overeem J.C. (1971) The role of cytokinins in clubroot formation. *Physiological Plant Pathology* 1:151–161.
- Delay C., Imin N., Djordjevic M.A. (2013) CEP genes regulate root and shoot development in response to environmental cues and are specific to seed plants. *Journal of experimental botany* 64:5383–5394.
- Delhon P., Gojon A., Tillard P., Passama L. (1995) Diurnal regulation of NO₃⁻ uptake in soybean plants I. Changes in NO₃⁻ influx, efflux, and N utilization in the plant during the day/night cycle. *Journal of experimental botany* 46:1585–1594.
- Delourme R., Bousset L., Ermel M., Duffé P., Besnard A.L., Marquer B., Fudal I., Linglin J., Chadœuf J., Brun H. (2014) Quantitative resistance affects the speed of frequency increase but not the diversity of the virulence alleles overcoming a major resistance gene to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Infection, genetics and evolution* 27:490–499.
- Devos S., Laukens K., Deckers P., Van Der Straeten D., Beeckman T., Inzé D., Van Onckelen H., Witters E., Prinsen E. (2006) A hormone and proteome approach to picturing the initial metabolic events during *Plasmodiophora brassicae* infection on *Arabidopsis*. *Molecular plant-microbe interactions* 19:1431–1443.
- Diederichsen E., Frauen M., Linders E.G.A., Hatakeyama K., Hirai M. (2009) Status and Perspectives of Clubroot Resistance Breeding in Crucifer Crops. *Journal of plant growth regulation* 28:265–281.
- Diederichsen E., Sacristan M.D. (1996) Disease response of resynthesized *Brassica napus* L. lines carrying different combinations of resistance to *Plasmodiophora brassicae* Wor. *Plant breeding* 115:5–10.
- Dixon G.R. (2009a) The Occurrence and Economic Impact of *Plasmodiophora brassicae* and Clubroot Disease. *Journal of plant growth regulation* 28:194–202.
- Dixon G.R. (2009b) *Plasmodiophora brassicae* in its Environment. *Journal of plant growth regulation* 28:212–228.
- Dixon G.R., Page L.V. (1997) Calcium and nitrogen eliciting alterations to growth and reproduction of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). *International Symposium Brassica 97, Xth Crucifer Genetics Workshop* 459:343–350.

Références Bibliographiques

- Doan T.T., Jäschke D., Ludwig-Müller J. (2008) An endophytic fungus induces tolerance against the clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis thaliana* and *Brassica rapa* roots. *Acta horticulturae* 867:173–180.
- Dodds P.N., Rathjen J.P. (2010) Plant immunity: towards an integrated view of plant-pathogen interactions. *Nature reviews Genetics* 11:539–548.
- Donald E.C., Cross S.J., Lawrence J.M., Porter I.J. (2006) Pathotypes of *Plasmodiophora brassicae*, the cause of clubroot, in Australia. *The Annals of applied biology* 148:239–244.
- Donald C., Porter I. (2009) Integrated Control of Clubroot. *Journal of plant growth regulation* 28:289.
- Dordas C. (2009) Role of Nutrients in Controlling Plant Diseases in Sustainable Agriculture. *Sustainable Agriculture*:443–460.
- Dreyer I., Horeau C., Lemaillet G., Zimmermann S., Bush D.R., Rodríguez-Navarro A., Schachtman D.P., Spalding E.P., Sentenac H., Gaber R.F. (1999) Identification and characterization of plant transporters using heterologous expression systems. *Journal of experimental botany* 50:1073–1087.
- Duniway J.M. (1977) Predisposing effect of water stress on the severity of *Phytophthora* [cryptogea] root rot in safflower. *Phytopathology*.
- Epstein E., Bloom A.J. (2005) *Mineral nutrition of plants: principles and perspectives*, 2nd edn. Sinauer Assoc. Inc , Sunderland, UK
- Evans J.L., Scholes J.D. (1995) How does clubroot alter the regulation of carbon metabolism in its host? *Aspects of applied biology* 42:125–132.
- Fagard M., Launay A., Clément G., Courtial J., Dellagi A., Farjad M., Krapp A., Soulié M.-C., Masclaux-Daubresse C. (2014) Nitrogen metabolism meets phytopathology. *Journal of experimental botany* 65:5643–5656.
- Fähling M., Graf H., Siemens J. (2003) Pathotype Separation of *Plasmodiophora brassicae* by the Host Plant. *Journal of Phytopathology* 151:425–430.
- Fähling M., Graf H., Siemens J. (2004) Characterization of a Single-Spore Isolate Population of *Plasmodiophora brassicae* Resulting from a Single Club. *Journal of Phytopathology* 152:438–444.
- Faris J.D., Zhang Z., Lu H., Lu S., Reddy L., Cloutier S., Fellers J.P., Meinhardt S.W., Rasmussen J.B., Xu S.S., Oliver R.P., Simons K.J., Friesen T.L. (2010) A unique wheat disease resistance-like gene governs effector-triggered susceptibility to necrotrophic pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:13544–13549.
- Figdore S.S., Ferreira M.E., Slocum M.K., Williams P.H. (1993) Association of RFLP markers with trait loci affecting clubroot resistance and morphological characters in *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 69:33–44.
- Filleur S., Daniel-Vedele F. (1999) Expression analysis of a high-affinity nitrate transporter isolated from *Arabidopsis thaliana* by differential display. *Planta* 207:461–469.
- Filleur S., Dorbe M.-F., Cerezo M., Orsel M., Granier F., Gojon A., Daniel-Vedele F. (2001) An *Arabidopsis* T-DNA mutant affected in *Nrt2* genes is impaired in nitrate uptake. *FEBS letters* 489:220–224.
- Flor H.H. (1971) Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual review of phytopathology* 9:275–296.
- Forde B.G. (2002) Local and long-range signaling pathways regulating plant responses to nitrate. *Annual review of plant biology* 53:203–224.
- Forde B.G. (2014) Nitrogen signalling pathways shaping root system architecture: an update. *Current opinion in plant biology* 21:30–36.
- Fox J.T., Stover P.J. (2008) Chapter 1 Folate-Mediated One-Carbon Metabolism. *Vitamins & Hormones* 79:1–44.

Références Bibliographiques

- Foyer C.H., Parry M., Noctor G. (2003) Markers and signals associated with nitrogen assimilation in higher plants. *Journal of experimental botany* 54:585–593.
- French E., Kim B.-S., Iyer-Pascuzzi A.S. (2016) Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Seminars in cell & developmental biology* 56:201–208.
- Friberg H., Lagerlöf J., Rämert B. (2006) Usefulness of nonhost plants in managing *Plasmodiophora brassicae*. *Plant pathology* 55:690–695.
- Fritz C., Palacios-Rojas N., Feil R., Stitt M. (2006) Regulation of secondary metabolism by the carbon–nitrogen status in tobacco: nitrate inhibits large sectors of phenylpropanoid metabolism. *The Plant journal* 46:533–548.
- Fuchs H., Sacristán M.D. (1996) Identification of a gene in *Arabidopsis thaliana* controlling resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) and characterization of the resistance response. *Molecular plant-microbe interactions* 9:91–97.
- Fukuoka S., Saka N., Koga H., Ono K., Shimizu T., Ebana K., Hayashi N., Takahashi A., Hirochika H., Okuno K., Yano M. (2009) Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* 325:998–1001.
- Fukuoka S., Yamamoto S.-I., Mizobuchi R., Yamanouchi U., Ono K., Kitazawa N., Yasuda N., Fujita Y., Nguyen T.T.T., Koizumi S. (2014) Multiple functional polymorphisms in a single disease resistance gene in rice enhance durable resistance to blast. *Scientific reports* 4:4550.
- Fu D., Uauy C., Distelfeld A., Blechl A., Epstein L., Chen X., Sela H., Fahima T., Dubcovsky J. (2009) A kinase-START gene confers temperature-dependent resistance to wheat stripe rust. *Science* 323:1357–1360.
- Gamir J., Pastor V., Kaeffer A., Cerezo M., Flors V. (2014) Targeting novel chemical and constitutive primed metabolites against *Plectosphaerella cucumerina*. *The Plant journal* 78:227–240.
- Gansel X., Muñoz S., Tillard P., Gojon A. (2001) Differential regulation of the NO₃⁻ and NH₄⁺ transporter genes AtNrt2.1 and AtAmt1.1 in *Arabidopsis*: relation with long-distance and local controls by N. *The Plant journal* 26:143–155
- Garber R.C., Aist J.R. (1979) The ultrastructure of mitosis in *Plasmodiophora brassicae* (Plasmodiophorales). *Journal of cell science* 40:89–110.
- Goel A.K., Lundberg D., Torres M.A., Matthews R., Akimoto-Tomiyama C., Farmer L., Dangl J.L., Grant S.R. (2008) The *Pseudomonas syringae* type III effector HopAM1 enhances virulence on water-stressed plants. *Molecular plant-microbe interactions* 21:361–370.
- Göhre V., Robatzek S. (2008) Breaking the barriers: microbial effector molecules subvert plant immunity. *Annual review of phytopathology* 46:189–215.
- Gojon A., Krouk G., Perrine-Walker F., Laugier E. (2011) Nitrate transceptor (s) in plants. *Journal of experimental botany* 62:2299–2308.
- Gossen B.D., Deora A., Peng G., Hwang S.-F., McDonald M.R. (2014) Effect of environmental parameters on clubroot development and the risk of pathogen spread. *Canadian journal of plant pathology* 36:37–48.
- Gossen B.D., Kasinathan H., Cao T., Manolii V.P., Strelkov S.E., Hwang S.F., McDonald M.R. (2013) Influence of pH and temperature on infection and symptom development of clubroot in canola. *Canadian journal of plant pathology* 35:294–303.
- Graf H., Fählng M., Siemens J. (2004) Chromosome Polymorphism of the Obligate Biotrophic Parasite *Plasmodiophora brassicae*. *Journal of Phytopathology* 152:86–91.
- Graf H., Sokolowski F., Klewer A., Diederichsen E., Luerßen H., Siemens J. (2001) Electrophoretic Karyotype of the Obligate Biotrophic Parasite *Plasmodiophora brassicae* Wor. *Journal of Phytopathology* 149:313–318.

Références Bibliographiques

- Grandclément C., Thomas G. (1996) Detection and analysis of QTLs based on RAPD markers for polygenic resistance to *Plasmodiophora brassicae* Woron in *Brassica oleracea* L. Theoretical and applied genetics 93:86–90.
- Gravot A., Deleu C., Wagner G., Lariagon C., Luga R., Todd C., Wendehenne D., Delourme R., Bouchereau A., Manzanares-Dauleux M.J. (2012) Arginase induction represses gall development during clubroot infection in *Arabidopsis*. Plant & cell physiology 53:901–911.
- Gravot A., Grillet L., Wagner G., Jubault M., Lariagon C., Baron C., Deleu C., Delourme R., Bouchereau A., Manzanares-Dauleux M.J. (2011) Genetic and physiological analysis of the relationship between partial resistance to clubroot and tolerance to trehalose in *Arabidopsis thaliana*. The New phytologist 191:1083–1094.
- Gravot A., Lemarié S., Richard G., Lime T., Lariagon C., Manzanares-Dauleux M.J. (2016) Flooding affects the development of *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis* roots during the secondary phase of infection. Plant pathology 65:1153–1160.
- Grsic S., Kirchheim B., Pieper K., Fritsch M., Hilgenberg W., Ludwig-Müller J. (1999) Induction of auxin biosynthetic enzymes by jasmonic acid and in clubroot diseased Chinese cabbage plants. Physiologia plantarum 105:521–531.
- Grubb C.D., Abel S. (2006) Glucosinolate metabolism and its control. Trends in plant science 11:89–100.
- Gururani M.A., Venkatesh J., Upadhyaya C.P., Nookaraju A., Pandey S.K., Park S.W. (2012) Plant disease resistance genes: Current status and future directions. Physiological and molecular plant pathology 78:51–65.
- Gust A.A., Pruitt R., Nürnberger T. (2017) Sensing Danger: Key to Activating Plant Immunity. Trends in plant science 22:779–791.
- Halkier B.A., Gershenzon J. (2006) Biology and biochemistry of glucosinolates. Annual review of plant biology 57:303–333.
- Hanson J.B. (1978) Application of the chemiosmotic hypothesis to ion transport across the root. Plant physiology 62:402–405.
- Hasan M.J., Rahman H. (2016) Genetics and molecular mapping of resistance to *Plasmodiophora brassicae* pathotypes 2, 3, 5, 6, and 8 in rutabaga (*Brassica napus* var. napobrassica). Genome / National Research Council Canada 59:805–815.
- Hatakeyama K., Suwabe K., Tomita R.N., Kato T., Nunome T., Fukuoka H., Matsumoto S. (2013) Identification and characterization of Crr1a, a gene for resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. PloS one 8:e54745.
- Haughn G.W., Davin L., Giblin M., Underhill E.W. (1991) Biochemical Genetics of Plant Secondary Metabolites in *Arabidopsis thaliana*: The Glucosinolates. Plant physiology 97:217–226.
- Hayashida N., Takabatake Y., Nakazawa N., Aruga D., Nakanishi H., Taguchi G., Sakamoto K., Matsumoto E. (2008) Construction of a Practical SCAR Marker Linked to Clubroot Resistance in Chinese Cabbage, with Intensive Analysis of HC352b Genes. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 77:150–154.
- Hebinger H. (2013) Le colza. Paris: Editions France Agricoles
- He D., Fiz-Palacios O., Fu C.-J., Fehling J., Tsai C.-C., Baldauf S.L. (2014) An alternative root for the eukaryote tree of life. Current biology 24:465–470.
- Hirai M. (2006) Genetic analysis of clubroot resistance in Brassica crops. Breeding science 56:223–229.
- Hirai M., Harada T., Kubo N., Tsukada M., Suwabe K., Matsumoto S. (2004) A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers. Theoretical and applied genetics 108:639–643.
- Hirel B., Tétu T., Lea P.J., Dubois F. (2011) Improving Nitrogen Use Efficiency in Crops for Sustainable Agriculture. Sustainability 3:1452–1485.

Références Bibliographiques

- Hoffland E., Jeger M.J., van Beusichem M.L. (2000) Effect of nitrogen supply rate on disease resistance in tomato depends on the pathogen. *Plant and soil* 218:239–247.
- Hole D.J., Emran A.M., Fares Y., Drew M.C. (1990) Induction of nitrate transport in maize roots, and kinetics of influx, measured with nitrogen-13. *Plant physiology* 93:642–647.
- Ho C.-H., Lin S.-H., Hu H.-C., Tsay Y.-F. (2009) CHL1 functions as a nitrate sensor in plants. *Cell* 138:1184–1194.
- Honig F. (1931) The pathogene of club root (*Plasmodiophora brassicae* Wor.). A monograph *Gartenbauwissenschaft* 5:116–225.
- van der Hoorn R.A.L., Kamoun S. (2008) From Guard to Decoy: A New Model for Perception of Plant Pathogen Effectors. *The Plant Cell Online* 20:2009–2017.
- Howard R.J., Strelkov S.E., Harding M.W. (2010) Clubroot of cruciferous crops-new perspectives on an old disease. *Canadian journal of plant pathology* 32:43–57.
- Huang N.C., Liu K.H., Lo H.J., Tsay Y.F. (1999) Cloning and functional characterization of an *Arabidopsis* nitrate transporter gene that encodes a constitutive component of low-affinity uptake. *The Plant cell* 11:1381–1392.
- Huard-Chauveau C., Perchepied L., Debieu M., Rivas S., Kroj T., Kars I., Bergelson J., Roux F., Roby D. (2013) An atypical kinase under balancing selection confers broad-spectrum disease resistance in *Arabidopsis*. *PLoS genetics* 9:e1003766.
- Huber D.M., Watson R.D. (1974) Nitrogen form and plant disease. *Annual review of phytopathology* 12:139–165.
- Humphry M., Consonni C. (2006) mlo-based powdery mildew immunity: silver bullet or simply non-host resistance? *Molecular Plant Pathology* 7:605–610.
- Hwang S.F., Ahmed H.U., Zhou Q., Rashid A., Strelkov S.E., Gossen B.D., Peng G., Turnbull G.D. (2013) Effect of susceptible and resistant canola plants on *Plasmodiophora brassicae* resting spore populations in the soil. *Plant pathology* 62:404–412.
- Hwang S.-F., Howard R.J., Strelkov S.E., Gossen B.D., Peng G. (2014) Management of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola (*Brassica napus*) in western Canada. *Canadian journal of plant pathology* 36:49–65.
- Hwang S.-F., Strelkov S.E., Feng J., Gossen B.D., Howard R.J. (2012) *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop. *Molecular plant pathology* 13:105–113.
- Hwang S.F., Strelkov S.E., Gossen B.D., Turnbull G.D., Ahmed H.U., Manolii V.P. (2011) Soil treatments and amendments for amelioration of clubroot of canola. *Canadian journal of plant science* 91:999–1010.
- Ikegami H. (1985) Decrease of Clubroot Fungus by Cultivation of Different Crops in Heavily Infested Soil (Studies on the Clubroot of Cruciferous Plants VII). *Research Bulletin of the Faculty College of Agriculture Gifu University* 50:19–32.
- Ikegami H., Ito T., Imuro Y., Naiki T. (1981) Growth of *Plasmodiophora brassicae* in the root and callus of Chinese cabbage. In: *Chinese cabbage: proceedings of the... International Symposium*.
- Ikegami H., Mukobata H., Naiki T. (1978) Scanning electron microscopy of *Plasmodiophora brassicae* in diseased root cells of turnip and Chinese cabbage. *Japanese Journal of Phytopathology* 44:456–464.
- Ikegami H., Naiki T., Ito T., Imuro Y. (1982) Ultrastructural growth process of *Plasmodiophora brassicae* in infected cells of Chinese cabbage and turnip. *Research Bulletin of the Faculty College of Agriculture Gifu University* 46:9–19.
- Imsande J., Touraine B. (1994) N Demand and the Regulation of Nitrate Uptake. *Plant physiology* 105:3–7.

Références Bibliographiques

- Ingram D.S., Tommerup I.C. (1972) The life history of *Plasmodiophora brassicae* Woron. Proceedings of the Royal Society of London B 180:103-112.
- Ito S.I., Yano S., Tanaka S., Kameya-Iwaki M. (1994) The Use of Resting Spore Spheroplasts in the DNA Analysis of *Plasmodiophora brassicae*. Ann Phytopathol Soc Jpn 60:491-495.
- Jackson W.A., Flesher D., Hageman R.H. (1973) Nitrate uptake by dark-grown corn seedlings. Plant physiology 51:120-127.
- Jäschke D., Dugassa-Gobena D., Karlovsky P., Vidal S., Ludwig-Müller J. (2010) Suppression of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) development in *Arabidopsis thaliana* by the endophytic fungus *Acremonium alternatum*. Plant pathology 59:100-111.
- Johnson R., Allen D.J. (1975) Induced resistance to rust diseases and its possible role in the resistance of multiline varieties. The Annals of applied biology 80:359-363.
- Johnson R. (1981) Durable resistance: definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. Phytopathology 71:567-568.
- Jo K.-R., Kim C.-J., Kim S.-J., Kim T.-Y., Bergervoet M., Jongsma M.A., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen J.H. (2014) Development of late blight resistant potatoes by cisgene stacking. BMC biotechnology 14:50.
- Jones J.D. (2001) Putting knowledge of plant disease resistance genes to work. Current opinion in plant biology 4:281-287.
- Jones J.D.G., Dangl J.L. (2006) The plant immune system. Nature 444:323-329.
- Jones D.R., Ingram D.S., Dixon G.R. (1982a) Characterization of isolates derived from single resting spores of *Plasmodiophora brassicae* and studies of their interaction. Plant pathology 31:239-246.
- Jones D.R., Ingram D.S., Dixon G.R. (1982b) Factors affecting tests for differential pathogenicity in populations of *Plasmodiophora brassicae*. Plant pathology 31:229-238.
- Jubault M., Hamon C., Gravot A., Lariagon C. (2008) Differential regulation of root arginine catabolism and polyamine metabolism in clubroot-susceptible and partially resistant *Arabidopsis* genotypes. Plant Physiology 146.
- Jubault M., Lariagon C., Simon M., Delourme R., Manzanares-Dauleux M.J. (2008) Identification of quantitative trait loci controlling partial clubroot resistance in new mapping populations of *Arabidopsis thaliana*. Theoretical and applied genetics 117:191-202.
- Jubault M., Lariagon C., Taconnat L., Renou J.-P., Gravot A., Delourme R., Manzanares-Dauleux M.J. (2013) Partial resistance to clubroot in *Arabidopsis* is based on changes in the host primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity. Functional & integrative genomics 13:191-205.
- Kanno Y., Hanada A., Chiba Y., Ichikawa T., Nakazawa M., Matsui M., Koshiha T., Kamiya Y., Seo M. (2012) Identification of an abscisic acid transporter by functional screening using the receptor complex as a sensor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109:9653-9658.
- Karling J.S. (1968) The Plasmodiophorales. The Plasmodiophorales 2nd edition.
- Kato T., Hatakeyama K., Fukino N., Matsumoto S. (2012) Identification of a clubroot resistance locus conferring resistance to a *Plasmodiophora brassicae* classified into pathotype group 3 in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.). Breeding science 62:282-287.
- Kato T., Hatakeyama K., Fukino N., Matsumoto S. (2013) Fine mapping of the clubroot resistance gene CRb and development of a useful selectable marker in *Brassica rapa*. Breeding science 63:116-124.
- Kato Y., Yamamoto Y., Murakami S., Sato F. (2005) Post-translational regulation of CND41 protease activity in senescent tobacco leaves. Planta 222:643-651.

Références Bibliographiques

- Kavanagh J.A., Williams P.H. (1981) Indole auxins in *Plasmodiophora* infected cabbage roots and hypocotyls. *Transactions of the British Mycological Society* 77:125–129.
- Kay S., Hahn S., Marois E., Hause G., Bonas U. (2007) A bacterial effector acts as a plant transcription factor and induces a cell size regulator. *Science* 318:648–651.
- Keen N.T., Williams P.H. (1969) Translocation of sugars into infected cabbage tissues during clubroot development. *Plant physiology* 44:748–754.
- Kemen E., Gardiner A., Schultz-Larsen T., Kemen A.C., Balmuth A.L., Robert-Seilaniantz A., Bailey K., Holub E., Studholme D.J., Maclean D., Jones J.D.G. (2011) Gene gain and loss during evolution of obligate parasitism in the white rust pathogen of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS biology* 9:e1001094.
- Kiba T., Feria-Bourrellier A.-B., Lafouge F., Lezhneva L., Boutet-Mercey S., Orsel M., Bréhaut V., Miller A., Daniel-Vedele F., Sakakibara H., Krapp A. (2012) The *Arabidopsis* nitrate transporter NRT2.4 plays a double role in roots and shoots of nitrogen-starved plants. *The Plant cell* 24:245–258.
- Kiers E.T., Duhamel M., Beesetty Y., Mensah J.A., Franken O., Verbruggen E., Fellbaum C.R., Kowalchuk G.A., Hart M.M., Bago A., Palmer T.M., West S.A., Vandenkoornhuyse P., Jansa J., Bücking H. (2011) Reciprocal rewards stabilize cooperation in the mycorrhizal symbiosis. *Science* 333:880–882.
- Kim H.-J., Lee H.-R., Jo K.-R., Mortazavian S.M.M., Huigen D.J., Evenhuis B., Kessel G., Visser R.G.F., Jacobsen E., Vossen J.H. (2012) Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants MaR8 and MaR9 is conferred by multiple stacked R genes. *Theoretical and applied genetics* 124:923–935.
- Király L., Hafez Y.M., Fodor J., Király Z. (2008) Suppression of tobacco mosaic virus-induced hypersensitive-type necrotization in tobacco at high temperature is associated with downregulation of NADPH oxidase and superoxide and stimulation of dehydroascorbate reductase. *The Journal of general virology* 89:799–808.
- Kobelt P. (2000) Die Verbreitung von sekundären Plasmodien von *Plasmodiophora brassicae* (Wor.) im Wurzelgewebe von *Arabidopsis thaliana* nach immunhistologischer Markierung des plasmodialen Zytoskeletts: Inaugural-Dissertation. P. Kobelt.
- Komarova N.Y., Thor K., Gubler A., Meier S., Dietrich D., Weichert A., Suter Grottemeyer M., Tegeder M., Rentsch D. (2008) AtPTR1 and AtPTR5 transport dipeptides in planta. *Plant physiology* 148:856–869.
- Kotur Z., Glass A.D.M. (2015) A 150 kDa plasma membrane complex of AtNRT2. 5 and AtNAR2. 1 is the major contributor to constitutive high-affinity nitrate influx in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, cell & environment* 38:1490–1502.
- Kotur Z., Mackenzie N., Ramesh S., Tyerman S.D., Kaiser B.N., Glass A.D.M. (2012) Nitrate transport capacity of the *Arabidopsis thaliana* NRT2 family members and their interactions with AtNAR2.1. *The New phytologist* 194:724–731.
- Kou Y., Wang S. (2010) Broad-spectrum and durability: understanding of quantitative disease resistance. *Current opinion in plant biology* 13:181–185.
- Krapp A., David L.C., Chardin C., Girin T., Marmagne A., Leprince A.-S., Chaillou S., Ferrario-Méry S., Meyer C., Daniel-Vedele F. (2014) Nitrate transport and signalling in *Arabidopsis*. *Journal of experimental botany* 65:789–798.
- Krattinger S.G., Lagudah E.S., Spielmeyer W., Singh R.P., Huerta-Espino J., McFadden H., Bossolini E., Selter L.L., Keller B. (2009) A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science* 323:1360–1363.
- Krouk G., Lacombe B., Bielach A., Perrine-Walker F., Malinska K., Mounier E., Hoyerova K., Tillard P., Leon S., Ljung K., Zazimalova E., Benkova E., Nacry P., Gojon A. (2010) Nitrate-regulated auxin

Références Bibliographiques

- transport by NRT1.1 defines a mechanism for nutrient sensing in plants. *Developmental cell* 18:927–937.
- Kuhl C., Tautenhahn R., Böttcher C., Larson T.R., Neumann S. (2012) CAMERA: an integrated strategy for compound spectra extraction and annotation of liquid chromatography/mass spectrometry data sets. *Analytical chemistry* 84:283–289.
- Lacombe S., Rougon-Cardoso A., Sherwood E., Peeters N., Dahlbeck D., van Esse H.P., Smoker M., Rallapalli G., Thomma B.P.H.J., Staskawicz B., Jones J.D.G., Zipfel C. (2010) Interfamily transfer of a plant pattern-recognition receptor confers broad-spectrum bacterial resistance. *Nature biotechnology* 28:365–369.
- Lagercrantz U., Lydiate D.J. (1996) Comparative genome mapping in Brassica. *Genetics* 144:1903–1910.
- Lahlali R., Peng G., Gossen B.D., McGregor L., Yu F.Q., Hynes R.K., Hwang S.F., McDonald M.R., Boyetchko S.M. (2013) Evidence that the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis*) suppresses clubroot on canola via antibiosis and induced host resistance. *Phytopathology* 103:245–254.
- Lahlali R., Peng G., McGregor L., Gossen B.D., Hwang S.F., McDonald M. (2011) Mechanisms of the biofungicide Serenade (*Bacillus subtilis* QST713) in suppressing clubroot. *Biocontrol science and technology* 21:1351–1362.
- Lam H.-M., Wong P., Chan H.-K., Yam K.-M., Chen L., Chow C.-M., Coruzzi G.M. (2003) Overexpression of the ASN1 gene enhances nitrogen status in seeds of *Arabidopsis*. *Plant physiology* 132:926–935.
- Landry B.S., Hubert N., Crete R., Chang M.S., Lincoln S.E., Etoh T. (1992) A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (Woronin). *Genome / National Research Council Canada* 35:409–420.
- Lea P.J., Forde B.G. (1994) The use of mutants and transgenic plants to study amino acid metabolism. *Plant, cell & environment* 17:541–556.
- Lea, J P. (1980) Transport and metabolism of asparagine and other nitrogen compounds within the plant. *The Biochemistry of Plants* 5:569–607.
- Lea P.J., Mifflin B.J. (1974) Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251:614–616.
- LeBoldus J.M., Manolii V.P., Turkington T.K., Strelkov S.E. (2011) Adaptation to Brassica Host Genotypes by a Single-Spore Isolate and Population of *Plasmodiophora brassicae* (Clubroot). *Plant disease* 96:833–838.
- Lecompte F., Abro M.A., Nicot P.C. (2010) Contrasted responses of *Botrytis cinerea* isolates developing on tomato plants grown under different nitrogen nutrition regimes. *Plant pathology* 59:891–899.
- Lee R.B. (1993) Control of Net Uptake of Nutrients by Regulation of Influx in Barley Plants Recovering from Nutrient Deficiency. *Annals of botany* 72:223–230.
- Lee M.-L., Hsieh W.-H. (1992) Influence of pH, sodium and potassium salts on viability of resting spores of *Plasmodiophora brassicae*. *Plant pathology* 1:1.
- Lee J., Izzah N.K., Choi B.-S., Joh H.J., Lee S.-C., Perumal S., Seo J., Ahn K., Jo E.J., Choi G.J., Nou I.-S., Yu Y., Yang T.-J. (2016) Genotyping-by-sequencing map permits identification of clubroot resistance QTLs and revision of the reference genome assembly in cabbage (*Brassica oleracea* L.). *DNA research* 23:29–41.
- Lee J., Kim J. (2010) Variation of glucosinolate content in the root of susceptible and resistant Chinese cabbage cultivars during development of clubroot disease. *Korean Journal of Horticultural Science & Technology* 28:200–208.
- Lemarié S., Robert-Seilaniantz A., Lariagon C., Lemoine J., Marnet N., Jubault M., Manzanares-Dauleux M.J., Gravot A. (2015) Both the Jasmonic Acid and the Salicylic Acid Pathways Contribute to

Références Bibliographiques

- Resistance to the Biotrophic Clubroot Agent *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis*. *Plant & cell physiology* 56:2158–2168.
- Lepoivre P. (2003) *Phytopathologie: bases moléculaires et biologiques des pathosystemes et fondements des strategies de lutte*. Bruxelles, BE: Ed. De Boeck Université.
- Léran S., Varala K., Boyer J.-C., Chiurazzi M., Crawford N., Daniel-Vedele F., David L., Dickstein R., Fernandez E., Forde B., Gassmann W., Geiger D., Gojon A., Gong J.-M., Halkier B.A., Harris J.M., Hedrich R., Limami A.M., Rentsch D., Seo M., Tsay Y.-F., Zhang M., Coruzzi G., Lacombe B. (2014) A unified nomenclature of NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER family members in plants. *Trends in plant science* 19:5–9.
- Le Roux C., Huet G., Jauneau A., Camborde L., Trémousaygue D., Kraut A., Zhou B., Levaillant M., Adachi H., Yoshioka H., Raffaele S., Berthomé R., Couté Y., Parker J.E., Deslandes L. (2015) A receptor pair with an integrated decoy converts pathogen disabling of transcription factors to immunity. *Cell* 161:1074–1088.
- Libiseller G., Dvorzak M., Kleb U., Gander E., Eisenberg T., Madeo F., Neumann S., Trausinger G., Sinner F., Pieber T., Magnes C. (2015) IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters. *BMC bioinformatics* 16:118.
- Li L., Luo Y., Chen B., Xu K., Zhang F., Li H., Huang Q., Xiao X., Zhang T., Hu J., Li F., Wu X. (2016) A Genome-Wide Association Study Reveals New Loci for Resistance to Clubroot Disease in *Brassica napus*. *Frontiers in plant science* 7:1483.
- Li Z.-K., Luo L.J., Mei H.W., Paterson A.H., Zhao X.H., Zhong D.B., Wang Y.P., Yu X.Q., Zhu L., Tabien R., Stansel J.W., Ying C.S. (1999) A “defeated” rice resistance gene acts as a QTL against a virulent strain of *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Molecular & general genetics* 261:58–63.
- Lippert K., Galinski E.A., Trüper H.G. (1993) Biosynthesis and function of trehalose in *Ectothiorhodospira halochloris*. *Antonie van Leeuwenhoek* 63:85–91.
- Little D.Y., Rao H., Oliva S., Daniel-Vedele F., Krapp A., Malamy J.E. (2005) The putative high-affinity nitrate transporter NRT2.1 represses lateral root initiation in response to nutritional cues. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:13693–13698.
- Liu G., Ji Y., Bhuiyan N.H., Pilot G., Selvaraj G., Zou J., Wei Y. (2010) Amino acid homeostasis modulates salicylic acid-associated redox status and defense responses in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 22:3845–3863.
- Liu S., Kandoth P.K., Warren S.D., Yeckel G., Heinz R., Alden J., Yang C., Jamai A., El-Mellouki T., Juvale P.S., Hill J., Baum T.J., Cianzio S., Whitham S.A., Korkin D., Mitchum M.G., Meksem K. (2012) A soybean cyst nematode resistance gene points to a new mechanism of plant resistance to pathogens. *Nature* 492:256–260.
- Liu J., Liu X., Dai L., Wang G. (2007) Recent progress in elucidating the structure, function and evolution of disease resistance genes in plants. *Journal of genetics and genomics* 34:765–776.
- Liu K.-H., Tsay Y.-F. (2003) Switching between the two action modes of the dual-affinity nitrate transporter CHL1 by phosphorylation. *The EMBO journal* 22:1005–1013.
- Li W., Wang Y., Okamoto M., Crawford N.M., Siddiqi M.Y., Glass A.D.M. (2007) Dissection of the AtNRT2.1:AtNRT2.2 inducible high-affinity nitrate transporter gene cluster. *Plant physiology* 143:425–433.
- Locasale J.W. (2013) Serine, glycine and one-carbon units: cancer metabolism in full circle. *Nature reviews Cancer* 13:572–583.
- Lovelock D.A., Donald C.E., Conlan X.A., Cahill D.M. (2013) Salicylic acid suppression of clubroot in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) caused by the obligate biotroph *Plasmodiophora brassicae*. *Australasian plant pathology* 42:141–153.

Références Bibliographiques

- Ludwig-Müller J., Bendel U., Thermann P., Ruppel M., Epstein E., Hilgenberg W. (1993) Concentrations of indole-3-acetic acid in plants of tolerant and susceptible varieties of Chinese cabbage infected with *Plasmodiophora brassicae* Woron. *The New phytologist* 125:763–769.
- Ludwig-Müller J., Epstein E., Hilgenberg W. (1996) Auxin-conjugate hydrolysis in Chinese cabbage: Characterization of an amidohydrolase and its role during infection with clubroot disease. *Physiologia plantarum* 97:627–634.
- Ludwig-Müller J., Jülke S., Geiß K., Richter F., Mithöfer A., Šola I., Rusak G., Keenan S., Bulman S. (2015) A novel methyltransferase from the intracellular pathogen *Plasmodiophora brassicae* methylates salicylic acid. *Molecular plant pathology* 16:349–364.
- Ludwig-Müller J., Pieper K., Ruppel M., Cohen J.D., Epstein E., Kiddle G., Bennett R. (1999) Indole glucosinolate and auxin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. glucosinolate mutants and the development of clubroot disease. *Planta* 208:409–419.
- Ludwig-Müller J., Prinsen E., Rolfe S.A., Scholes J.D. (2009) Metabolism and Plant Hormone Action During Clubroot Disease. *Journal of plant growth regulation* 28:229–244.
- Mackey D., Holt B.F. 3rd, Wiig A., Dangl J.L. (2002) RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM1-mediated resistance in *Arabidopsis*. *Cell* 108:743–754.
- Malinovsky F.G., Fangel J.U., Willats W.G.T. (2014) The role of the cell wall in plant immunity. *Frontiers in plant science* 5:178.
- Malinowski R., Novák O., Hossein Borhan M., Spíchal L., Strnad M., Rolfe S.A. (2016) The role of cytokinins in clubroot disease. *European journal of plant pathology* 145:543–557.
- Malinowski R., Smith J.A., Fleming A.J., Scholes J.D., Rolfe S.A. (2012) Gall formation in clubroot-infected *Arabidopsis* results from an increase in existing meristematic activities of the host but is not essential for the completion of the pathogen life cycle. *The Plant journal* 71:226–238.
- Mallard S., Gaudet D., Aldeia A., Abelard C., Besnard A.L., Sourdille P., Dedryver F. (2005) Genetic analysis of durable resistance to yellow rust in bread wheat. *Theoretical and applied genetics* 110:1401–1409.
- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Baron F., Thomas G. (2000) Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theoretical and applied genetics* 101:885–891.
- Manzanares-Dauleux M.J., Delourme R., Glory P., Giboulot A., Thomas G. (2003) Mapping QTLs and major resistance genes to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassica napus*. In: 13th Crucifer Genetics Workshop, UC Davis, California, March, pp 23–26.
- Manzanares-Dauleux M.J., Divaret I., Baron F., Thomas G. (2001) Assessment of biological and molecular variability between and within field isolates of *Plasmodiophora brassicae*. *Plant pathology* 50:165–173.
- Marschner H. (1995) *Mineral nutrition of higher plants.*, 2nd edn Academic Press: San Diego, CA, USA.
- Martin T., Oswald O., Graham I.A. (2002) *Arabidopsis* seedling growth, storage lipid mobilization, and photosynthetic gene expression are regulated by carbon:nitrogen availability. *Plant physiology* 128:472–481.
- Masclaux-Daubresse C., Reisdorf-Cren M., Pageau K., Lelandais M., Grandjean O., Kronenberger J., Valadier M.-H., Feraud M., Jougllet T., Suzuki A. (2006) Glutamine synthetase-glutamate synthase pathway and glutamate dehydrogenase play distinct roles in the sink-source nitrogen cycle in tobacco. *Plant physiology* 140:444–456.
- Matsumoto E., Yasui C., Ohi M., Tsukada M. (1998) Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Euphytica* 104:79–86

Références Bibliographiques

- McDonald B.A., Linde C. (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential, and durable resistance. *Annual review of phytopathology* 40:349–379.
- Melo P.M., Silva L.S., Ribeiro I., Seabra A.R., Carvalho H.G. (2011) Glutamine synthetase is a molecular target of nitric oxide in root nodules of *Medicago truncatula* and is regulated by tyrosine nitration. *Plant physiology* 157:1505–1517.
- Meyers B.C., Kozik A., Griego A., Kuang H., Michelmore R.W. (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR--encoding genes in *Arabidopsis*. *The Plant cell* 15:809–834.
- Meyer C., Stitt M. (2001) Nitrate Reduction and signalling. *Plant Nitrogen*:37–59.
- Michelmore R.W., Christopoulou M., Caldwell K.S. (2013) Impacts of resistance gene genetics, function, and evolution on a durable future. *Annual review of phytopathology* 51:291–319.
- Mitani S., Araki S., Takii Y., Ohshima T., Matsuo N., Miyoshi H. (2001) The Biochemical Mode of Action of the Novel Selective Fungicide Cyazofamid: Specific Inhibition of Mitochondrial Complex III in *Phythium spinosum*. *Pesticide biochemistry and physiology* 71:107–115.
- Mitani S., Sugimoto K., Hayashi H., Takii Y., Ohshima T., Matsuo N. (2003) Effects of cyazofamid against *Plasmodiophora brassicae* Woronin on Chinese cabbage. *Pest management science* 59:287–293.
- Mitchell D.T., Rice K.A. (1979) Translocation of ¹⁴C-labelled assimilates in cabbage during club root development. *The Annals of applied biology* 92:143–152.
- Mithen R., Magrath R. (1992) A contribution to the life history of *Plasmodiophora brassicae*: secondary plasmodia development in root galls of *Arabidopsis thaliana*. *Mycological research* 96:877–885.
- Mittelstraß K., Treutter D., Pleßl M., Heller W., Elstner E.F., Heiser I. (2006) Modification of primary and secondary metabolism of potato plants by nitrogen application differentially affects resistance to *Phytophthora infestans* and *Alternaria solani*. *Plant biology* 8:653–661.
- Mittler R. (2006) Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in plant science* 11:15–19.
- Mittler R., Blumwald E. (2010) Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual review of plant biology* 61:443–462.
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H., Shibuya N. (2007) CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:19613–19618.
- Morgan M.A., Volk R.J., Jackson W.A. (1973) Simultaneous Influx and Efflux of Nitrate during Uptake by Perennial Ryegrass. *Plant physiology* 51:267–272.
- Moriguchi K., Kimizuka-Takagi C., Ishii K., Nomura K. (1999) A Genetic Map Based on RAPD, RFLP, Isozyme, Morphological Markers and QTL Analysis for Clubroot Resistance in *Brassica oleracea*. *Breeding science* 49:257–265.
- Moury B., Selassie K.G., Marchoux G. (1998) High temperature effects on hypersensitive resistance to tomato spotted wilt tospovirus (TSWV) in pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). *European Journal of Plant Pathology* 104:489-498.
- Mousdale D.M.A. (1981) Endogenous indolyl-3-acetic acid and pathogen-induced plant growth disorders: distinction between hyperplasia and neoplastic development. *Experientia* 37:972–973.
- Müller J., Aeschbacher R.A., Wingler A., Boller T., Wiemken A. (2001) Trehalose and trehalase in *Arabidopsis*. *Plant physiology* 125:1086–1093.
- Müller P., Hilgenberg W. (1986) Isomers of zeatin and zeatin riboside in clubroot tissue: evidence for trans-zeatin biosynthesis by *Plasmodiophora brassicae*. *Physiologia plantarum* 66:245–250.
- Mullin W.J., Collins M.J., Proudfoot K.G. (1980) glucosinolate content and clubroot of rutabaga and turnip. *Canadian journal of plant science* 60:605–612.

Références Bibliographiques

- Mundt C.C. (2014) Durable resistance: a key to sustainable management of pathogens and pests. *Infection, genetics and evolution* 27:446–455.
- Murakami H., Tsushima S., Akimoto T., Murakami K., Goto I., Shishido Y. (2000) Effects of growing leafy daikon (*Raphanus sativus*) on populations of *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). *Plant pathology* 49:584–589.
- Murakami H., Tsushima S., Kuroyanagi Y., Shishido Y. (2002) Reduction of resting spore density of *Plasmodiophora brassicae* and clubroot disease severity by liming. *Soil science and plant nutrition* 48:685–691.
- Myers D.F., Campbell R.N. (1985) Lime and the control of clubroot of crucifers: Effects of pH, calcium, magnesium, and their interactions. *Phytopathology* 75:670–673.
- Nagaoka T., Doullah M.A.U., Matsumoto S., Kawasaki S., Ishikawa T., Hori H., Okazaki K. (2010) Identification of QTLs that control clubroot resistance in *Brassica oleracea* and comparative analysis of clubroot resistance genes between *B. rapa* and *B. oleracea*. *Theoretical and applied genetics* 120:1335–1346.
- Naiki T. (1987) Life cycle and control of *Plasmodiophora brassicae*, causing clubroot disease of cruciferous plants. *Soil Microorganisms* 29:23–37.
- Narisawa K., Shimura M., Usuki F., Fukuhara S., Hashiba T. (2005) Effects of Pathogen Density, Soil Moisture, and Soil pH on Biological Control of Clubroot in Chinese Cabbage by *Heteroconium chaetospora*. *Plant disease* 89:285–290.
- Narisawa K., Tokumasu S., Hashiba T. (1998) Suppression of clubroot formation in Chinese cabbage by the root endophytic fungus, *Heteroconium chaetospora*. *Plant pathology* 47:206–210.
- Narusaka M., Shirasu K., Noutoshi Y., Kubo Y., Shiraishi T., Iwabuchi M., Narusaka Y. (2009) RRS1 and RPS4 provide a dual Resistance-gene system against fungal and bacterial pathogens. *The Plant journal* 60:218–226.
- Nomura K., Minegishi Y., Kimizuka-Takagi C., Fujioka T., Moriguchi K., Shishido R., Ikehashi H. (2005) Evaluation of F2 and F3 plants introgressed with QTLs for clubroot resistance in cabbage developed by using SCAR markers. *Plant breeding* 124:371–375.
- Nour-Eldin H.H., Andersen T.G., Burow M., Madsen S.R., Jørgensen M.E., Olsen C.E., Dreyer I., Hedrich R., Geiger D., Halkier B.A. (2012) NRT/PTR transporters are essential for translocation of glucosinolate defence compounds to seeds. *Nature* 488:531–534.
- O'Brien J.A., Vega A., Bouguyon E., Krouk G., Gojon A., Coruzzi G., Gutiérrez R.A. (2016) Nitrate Transport, Sensing, and Responses in Plants. *Molecular plant* 9:837–856.
- Ohkubo Y., Tanaka M., Tabata R., Ogawa-Ohnishi M., Matsubayashi Y. (2017) Shoot-to-root mobile polypeptides involved in systemic regulation of nitrogen acquisition. *Nature plants* 3:17029.
- Ohyama K., Ogawa M., Matsubayashi Y. (2008) Identification of a biologically active, small, secreted peptide in *Arabidopsis* by in silico gene screening, followed by LC-MS-based structure analysis. *The Plant journal* 55:152–160.
- Olea F., Pérez-García A., Cantón F.R., Rivera M.E., Cañas R., Avila C., Cazorla F.M., Cánovas F.M., de Vicente A. (2004) Up-regulation and localization of asparagine synthetase in tomato leaves infected by the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae*. *Plant & cell physiology* 45:770–780.
- Orgeur G., Jestin C., Manzanares M., Grimault V. (2015) Hernie sur colza : la résistance variétale peut enfin être évaluée. *Phytoma* 684:14–17.
- Paesold S., Siegel I., Seidel C., Ludwig-Müller J. (2010) Flavonoid accumulation in *Arabidopsis thaliana* root galls caused by the obligate biotrophic pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Molecular plant pathology* 11:545–562.

Références Bibliographiques

- Palm E.T. (1963) Effect of mineral nutrition on the invasion and response of turnip tissue to *Plasmodiophora brassicae* Wor. Contrib Boyce Thompson Inst 22:91–112.
- Pandey P., Irulappan V., Bagavathiannan M.V., Senthil-Kumar M. (2017) Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-morphological Traits. *Frontiers in plant science* 8:537.
- Parker J.L., Newstead S. (2014) Molecular basis of nitrate uptake by the plant nitrate transporter NRT1.1. *Nature* 507:68–72.
- Parkin I.A.P., Gulden S.M., Sharpe A.G., Lukens L., Trick M., Osborn T.C., Lydiat D.J. (2005) Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 171:765–781.
- Parkin I.A.P., Koh C., Tang H., Robinson S.J., Kagale S., Clarke W.E., Town C.D., Nixon J., Krishnakumar V., Bidwell S.L., Denoeud F., Belcram H., Links M.G., Just J., Clarke C., Bender T., Huebert T., Mason A.S., Pires J.C., Barker G., Moore J., Walley P.G., Manoli S., Batley J., Edwards D., Nelson M.N., Wang X., Paterson A.H., King G., Bancroft I., Chalhoub B., Sharpe A.G. (2014) Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome biology* 15:R77.
- Parkin I.A.P., Sharpe A.G., Lydiat D.J. (2003) Patterns of genome duplication within the *Brassica napus* genome. *Genome / National Research Council Canada* 46:291–303.
- Pedras M.S.C., Zheng Q.-A., Strelkov S. (2008) Metabolic changes in roots of the oilseed canola infected with the biotroph *Plasmodiophora brassicae*: phytoalexins and phytoanticipins. *Journal of agricultural and food chemistry* 56:9949–9961.
- Peng G., McGregor L., Lahlali R., Gossen B.D., Hwang S.F., Adhikari K.K., Strelkov S.E., McDonald M.R. (2011) Potential biological control of clubroot on canola and crucifer vegetable crops. *Plant pathology* 60:566–574.
- Pérez-García A., Pereira S., Pissarra J., García Gutiérrez A., Cazorla F.M., Salema R., de Vicente A., Cánovas F.M. (1998) Cytosolic localization in tomato mesophyll cells of a novel glutamine synthetase induced in response to bacterial infection or phosphinothricin treatment. *Planta* 206:426–434.
- Petutschnig E.K., Jones A.M.E., Serazetdinova L., Lipka U., Lipka V. (2010) The lysin motif receptor-like kinase (LysM-RLK) CERK1 is a major chitin-binding protein in *Arabidopsis thaliana* and subject to chitin-induced phosphorylation. *The Journal of biological chemistry* 285:28902–28911.
- Petutschnig E.K., Stolze M., Lipka U., Kopischke M., Horlacher J., Valerius O., Rozhon W., Gust A.A., Kemmerling B., Poppenberger B. (2014) A novel *Arabidopsis* CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1 (CERK1) mutant with enhanced pathogen-induced cell death and altered receptor processing. *The New phytologist* 204:955–967.
- Piao Z.Y., Deng Y.Q., Choi S.R., Park Y.J., Lim Y.P. (2004) SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Theoretical and applied genetics* 108:1458–1465.
- Piao Z.Y., Park Y.J., Choi S.R., Hong C.P., Park J.Y., Choi Y.S., Lim Y.P. (2002) Conversion of an AFLP marker linked to clubroot resistance gene in Chinese cabbage into a SCAR marker. *Journal-Korean Society for Horticultural Science* 43:653–659.
- Piao Z., Ramchiary N., Lim Y.P. (2009) Genetics of clubroot resistance in Brassica species. *Journal of plant growth regulation* 28:252–264.
- Poland J.A., Balint-Kurti P.J., Wisser R.J., Pratt R.C., Nelson R.J. (2009) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in plant science* 14:21–29.
- Pryor D.E. (1940) The effect of some mineral nutrients on the development of clubroot of crucifers. *Journal of agricultural research* 61.

Références Bibliographiques

- Purnell M.P., Botella J.R. (2007) Tobacco isoenzyme 1 of NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase catabolizes glutamate in vivo. *Plant physiology* 143:530–539.
- Raa J. (1971) Indole-3-acetic Acid Levels and the Role of Indole-3-acetic Acid Oxidase in the Normal Root and Club-root of Cabbage. *Physiologia plantarum* 25:130–134.
- Řičařová V., Kaczmarek J., Strelkov S.E., Kazda J., Lueders W., Rysanek P., Manolii V., Jedryczka M. (2016) Pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* causing damage to oilseed rape in the Czech Republic and Poland. *European journal of plant pathology* 145:559–572.
- Rico A., Preston G.M. (2008) *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 Uses Constitutive and Apoplast-Induced Nutrient Assimilation Pathways to Catabolize Nutrients That Are Abundant in the Tomato Apoplast. *Molecular plant-microbe interactions* 21:269–282.
- Roberts I., Smith S., De Rybel B., Van Den Broeke J., Smet W., De Cokere S., Mispelaere M., De Smet I., Beeckman T. (2013) The CEP family in land plants: evolutionary analyses, expression studies, and role in *Arabidopsis* shoot development. *Journal of experimental botany* 64:5371–5381.
- Rochat C., Boutin J.-P. (1991) Metabolism of Phloem-borne Amino Acids in Maternal Tissues2 *Pisum sativum* L. *Journal of experimental botany* 42:207–214.
- Rocherieux J., Glory P., Giboulot A., Boury S., Barbeyron G., Thomas G., Manzanares-Dauleux M.J. (2004) Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theoretical and applied genetics* 108:1555–1563.
- Rolfe S.A., Strelkov S.E., Links M.G., Clarke W.E., Robinson S.J., Djavaheri M., Malinowski R., Haddadi P., Kagale S., Parkin I.A.P., Taheri A., Borhan M.H. (2016) The compact genome of the plant pathogen *Plasmodiophora brassicae* is adapted to intracellular interactions with host Brassica spp. *BMC genomics* 17:272.
- Rooney H.C.E., Van't Klooster J.W., van der Hoorn R.A.L., Joosten M.H.A.J., Jones J.D.G., de Wit P.J.G.M. (2005) Cladosporium Avr2 inhibits tomato Rcr3 protease required for Cf-2-dependent disease resistance. *Science* 308:1783–1786.
- Rousseau E., Fabre F., Mailleret L., Palloix A., Simon V., Valière S., Moury B., Grogard F. (2014) Protecting the durability of major resistance genes to plant viruses with quantitative resistance. *Conférence Jacques Monod*.
- Rouxel T., Balesdent M.-H. (2010) Avirulence genes. Elsevier Oceanography Series.
- Roux F., Voisin D., Badet T., Balagué C., Barlet X., Huard-Chauveau C., Roby D., Raffaele S. (2014) Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular plant pathology* 15:427–432.
- Saini S., Sharma I., Kaur N., Pati P.K. (2013) Auxin: a master regulator in plant root development. *Plant cell reports* 32:741–757.
- Saito M., Kubo N., Matsumoto S., Suwabe K., Tsukada M., Hirai M. (2006) Fine mapping of the clubroot resistance gene, Crr3, in *Brassica rapa*. *Theoretical and applied genetics* 114:81–91.
- Sakamoto K., Saito A., Hayashida N., Taguchi G., Matsumoto E. (2008) Mapping of isolate-specific QTLs for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. pekinensis). *Theoretical and applied genetics* 117:759–767.
- Sarris P.F., Duxbury Z., Huh S.U., Ma Y., Segonzac C., Sklenar J., Derbyshire P., Cevik V., Rallapalli G., Saucet S.B., Wirthmueller L., Menke F.L.H., Sohn K.H., Jones J.D.G. (2015) A Plant Immune Receptor Detects Pathogen Effectors that Target WRKY Transcription Factors. *Cell* 161:1089–1100.
- Scheible W.R., Gonzalez-Fontes A., Lauerer M., Muller-Rober B., Caboche M., Stitt M. (1997) Nitrate Acts as a Signal to Induce Organic Acid Metabolism and Repress Starch Metabolism in Tobacco. *The Plant cell* 9:783–798.

Références Bibliographiques

- Scheible W.-R., Krapp A., Stitt M. (2000) Reciprocal diurnal changes of phosphoenolpyruvate carboxylase expression and cytosolic pyruvate kinase, citrate synthase and NADP-isocitrate dehydrogenase expression regulate organic acid metabolism during nitrate assimilation in tobacco leaves. *Plant, cell & environment* 23:1155–1167.
- Schranz M.E., Lysak M.A., Mitchell-Olds T. (2006) The ABC's of comparative genomics in the Brassicaceae: building blocks of crucifer genomes. *Trends in plant science* 11:535–542.
- Schwelm A., Dixelius C., Ludwig-Müller J. (2016) New kid on the block--the clubroot pathogen genome moves the plasmodiophorids into the genomic era. *European journal of plant pathology* 145:531–542.
- Schwelm A., Fogelqvist J., Knaust A., Jülke S., Lilja T., Bonilla-Rosso G., Karlsson M., Shevchenko A., Dhandapani V., Choi S.R., Kim H.G., Park J.Y., Lim Y.P., Ludwig-Müller J., Dixelius C. (2015) The *Plasmodiophora brassicae* genome reveals insights in its life cycle and ancestry of chitin synthases. *Scientific reports* 5:11153.
- Segonzac C., Boyer J.-C., Ipotesi E., Szponarski W., Tillard P., Touraine B., Sommerer N., Rossignol M., Gibrat R. (2007) Nitrate efflux at the root plasma membrane: identification of an *Arabidopsis* excretion transporter. *The Plant cell* 19:3760–3777.
- Shah J. (2003) The salicylic acid loop in plant defense. *Current opinion in plant biology* 6:365–371.
- Sharma R.C., Duvellier E., Ortiz-Ferrara G. (2007) Progress and challenge towards reducing wheat spot blotch threat in the Eastern Gangetic Plains of South Asia: Is climate change already taking its toll? *Field crops research* 103:109–118.
- Shin R., Berg R.H., Schachtman D.P. (2005) Reactive oxygen species and root hairs in *Arabidopsis* root response to nitrogen, phosphorus and potassium deficiency. *Plant & cell physiology* 46:1350–1357.
- Siddiqi M.Y., Glass A., Ruth T.J., Rufty T.W. (1990) Studies of the uptake of nitrate in barley I. Kinetics of $^{13}\text{NO}_3^-$ influx. *Plant physiology* 93:1426–1432.
- Siemens J., Glawischnig E., Ludwig-Müller J. (2008) Indole Glucosinolates and Camalexin do not Influence the Development of the Clubroot Disease in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Phytopathology* 156:332–337.
- Siemens J., González M.-C., Wolf S., Hofmann C., Greiner S., Du Y., Rausch T., Roitsch T., Ludwig-Müller J. (2011) Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular plant pathology* 12:247–262.
- Siemens J., Graf H., Bulman S., In O., Ludwig-Müller J. (2009) Monitoring expression of selected *Plasmodiophora brassicae* genes during clubroot development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant pathology* 58:130–136.
- Siemens J., Keller I., Sarx J., Kunz S. (2006) Transcriptome analysis of *Arabidopsis* clubroots indicate a key role for cytokinins in disease development. *Molecular plant-microbe interactions* 19:480–494.
- Siemens J., Nagel M., Ludwig-Müller J., Sacristán M.D. (2002) The Interaction of *Plasmodiophora brassicae* and *Arabidopsis thaliana*: Parameters for Disease Quantification and Screening of Mutant Lines. *Journal of Phytopathology* 150:592–605.
- Skopelitis D.S., Paranychianakis N.V., Paschalidis K.A., Pliakonis E.D., Delis I.D., Yakoumakis D.I., Kouvarakis A., Papadakis A.K., Stephanou E.G., Roubelakis-Angelakis K.A. (2006) Abiotic stress generates ROS that signal expression of anionic glutamate dehydrogenases to form glutamate for proline synthesis in tobacco and grapevine. *The Plant cell* 18:2767–2781.
- Smirnoff N., Stewart G.R. (1985) Nitrate assimilation and translocation by higher plants: comparative physiology and ecological consequences. *Physiologia plantarum* 64:133–140.
- Smith C.A., Want E.J., O'Maille G., Abagyan R., Siuzdak G. (2006) XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry* 78:779–787.

Références Bibliographiques

- Snoeiijers S.S., Pérez-García A., Joosten M.H.A.J., De Wit P.J.G.M. (2000) The Effect of Nitrogen on Disease Development and Gene Expression in Bacterial and Fungal Plant Pathogens. *European journal of plant pathology* 106:493–506.
- Snowdon R., Lühs W., Friedt W. (2007) Oilseed rape. *Oilseeds*:55–114.
- Solomon P.S., Oliver R.P. (2001) The nitrogen content of the tomato leaf apoplast increases during infection by *Cladosporium fulvum*. *Planta* 213:241–249.
- Solomon P.S., Oliver R.P. (2002) Evidence that gamma-aminobutyric acid is a major nitrogen source during *Cladosporium fulvum* infection of tomato. *Planta* 214:414–420.
- Somé A., Manzanares M.J., Laurens F., Baron F., Thomas G., Rouxel F. (1996) Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant pathology* 45:432–439.
- Spanu P.D., Abbott J.C., Amselem J., Burgis T.A., Soanes D.M., Stüber K., Ver Loren van Themaat E., Brown J.K.M., Butcher S.A., Gurr S.J., Lebrun M.-H., Ridout C.J., Schulze-Lefert P., Talbot N.J., Ahmadinejad N., Ametz C., Barton G.R., Benjdia M., Bidzinski P., Bindschedler L.V., Both M., Brewer M.T., Cadle-Davidson L., Cadle-Davidson M.M., Collemare J., Cramer R., Frenkel O., Godfrey D., Harriman J., Hoede C., King B.C., Klages S., Kleemann J., Knoll D., Koti P.S., Kreplak J., López-Ruiz F.J., Lu X., Maekawa T., Mahanil S., Micali C., Milgroom M.G., Montana G., Noir S., O’Connell R.J., Oberhaensli S., Parlange F., Pedersen C., Quesneville H., Reinhardt R., Rott M., Sacristán S., Schmidt S.M., Schön M., Skamnioti P., Sommer H., Stephens A., Takahara H., Thordal-Christensen H., Vigouroux M., Wessling R., Wicker T., Panstruga R. (2010) Genome expansion and gene loss in powdery mildew fungi reveal tradeoffs in extreme parasitism. *Science* 330:1543–1546.
- Sprague S.J., Balesdent M.-H., Brun H., Hayden H.L., Marcroft S.J., Pinochet X., Rouxel T., Howlett B.J. (2006) Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European journal of plant pathology* 114:33–40.
- St Clair D.A. (2010) Quantitative disease resistance and quantitative resistance Loci in breeding. *Annual review of phytopathology* 48:247–268.
- Strelkov S.E., Hwang S.-F. (2014) Clubroot in the Canadian canola crop: 10 years into the outbreak. *Canadian journal of plant pathology* 36:27–36.
- Strelkov S.E., Hwang S.-F., Manolii V.P., Cao T., Feindel D. (2016) Emergence of new virulence phenotypes of *Plasmodiophora brassicae* on canola (*Brassica napus*) in Alberta, Canada. *European journal of plant pathology* 145:517–529.
- Stuttman J., Hubberten H.-M., Rietz S., Kaur J., Muskett P., Guerois R., Bednarek P., Hoefgen R., Parker J.E. (2011) Perturbation of *Arabidopsis* amino acid metabolism causes incompatibility with the adapted biotrophic pathogen *Hyaloperonospora arabidopsidis*. *The Plant cell* 23:2788–2803.
- Sugiura M., Georgescu M.N., Takahashi M. (2007) A nitrite transporter associated with nitrite uptake by higher plant chloroplasts. *Plant & cell physiology* 48:1022–1035.
- Sun J., Bankston J.R., Payandeh J., Hinds T.R., Zagotta W.N., Zheng N. (2014) Crystal structure of the plant dual-affinity nitrate transporter NRT1.1. *Nature* 507:73–77.
- Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Matsumoto S., Hirai M. (2003) Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *Theoretical and applied genetics* 107:997–1002.
- Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Kondo M., Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Hirai M., Matsumoto S. (2006) Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance. *Genetics* 173:309–319.

Références Bibliographiques

- Suzuki N., Rivero R.M., Shulaev V., Blumwald E., Mittler R. (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *The New phytologist* 203:32–43.
- Tabata R., Sumida K., Yoshii T., Ohyama K., Shinohara H., Matsubayashi Y. (2014) Perception of root-derived peptides by shoot LRR-RKs mediates systemic N-demand signaling. *Science* 346:343–346.
- Talukder Z.I., McDonald A.J.S., Price A.H. (2005) Loci controlling partial resistance to rice blast do not show marked QTL \times environment interaction when plant nitrogen status alters disease severity. *The New phytologist* 168:455–464.
- Tal I., Zhang Y., Jørgensen M.E., Pisanty O., Barbosa I.C.R., Zourelidou M., Regnault T., Crocoll C., Olsen C.E., Weinstain R., Schwechheimer C., Halkier B.A., Nour-Eldin H.H., Estelle M., Shani E. (2016) The *Arabidopsis* NPF3 protein is a GA transporter. *Nature communications* 7:11486.
- Tanaka S., Kochi S.-I., Kunita H., Ito S.-I., Kameya-Iwaki M. (1999) Biological Mode of Action of the Fungicide, Flusulfamide, Against *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). *European journal of plant pathology* 105:577–584.
- Tang D., Wang G., Zhou J.-M. (2017) Receptor Kinases in Plant-Pathogen Interactions: More Than Pattern Recognition. *The Plant cell* 29:618–637.
- Tavernier V., Cadiou S., Pageau K., Laugé R., Reisdorf-Cren M., Langin T., Masclaux-Daubresse C. (2007) The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity. *Journal of experimental botany* 58:3351–3360.
- Tegeder M., Rentsch D. (2010) Uptake and partitioning of amino acids and peptides. *Molecular plant* 3:997–1011.
- Thevelein J.M. (1984) Regulation of trehalose mobilization in fungi. *Microbiological reviews* 48:42–59.
- Thomas H., de Villiers L. (1996) Gene expression in leaves of *Arabidopsis thaliana* induced to senesce by nutrient deprivation. *Journal of experimental botany* 47:1845–1852.
- Tippmann H.F., Schlüter U., Collinge D.B. (2006) Common themes in biotic and abiotic stress signalling in plants. In: *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. Global Science Books:52–67.
- Tommerup I.C., Ingram D.S. (1971) The life-cycle of *plasmodiophora brassicae* woron. in brassica tissue cultures and in intact roots. *The New phytologist* 70:327–332.
- Tsay Y.F., Schroeder J.I., Feldmann K.A., Crawford N.M. (1993) The herbicide sensitivity gene CHL1 of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell* 72:705–713.
- Ueno H., Matsumoto E., Aruga D., Kitagawa S., Matsumura H., Hayashida N. (2012) Molecular characterization of the CRA gene conferring clubroot resistance in *Brassica rapa*. *Plant molecular biology* 80:621–629.
- Uma B., Rani T.S., Podile A.R. (2011) Warriors at the gate that never sleep: non-host resistance in plants. *Journal of plant physiology* 168:2141–2152.
- Unkles S.E., Hawker K.L., Grieve C., Campbell E.I., Montague P., Kinghorn J.R. (1991) crnA encodes a nitrate transporter in *Aspergillus nidulans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:204–208.
- Vanacker H., Foyer C.H., Carver T.L.W. (1999) Changes in apoplastic antioxidants induced by powdery mildew attack in oat genotypes with race non-specific resistance. *Planta* 208:444–452.
- Vanoni M.A., Dossena L., van den Heuvel R.H.H., Curti B. (2005) Structure–function studies on the complex iron–sulfur flavoprotein glutamate synthase: the key enzyme of ammonia assimilation. *Photosynthesis research* 83:219–238.
- Vetter M.M., Kronholm I., He F., Häweker H., Reymond M., Bergelson J., Robatzek S., de Meaux J. (2012) Flagellin perception varies quantitatively in *Arabidopsis thaliana* and its relatives. *Molecular biology and evolution* 29:1655–1667.

Références Bibliographiques

- Vidal E.A., Moyano T.C., Canales J., Gutiérrez R.A. (2014) Nitrogen control of developmental phase transitions in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of experimental botany* 65:5611–5618.
- Vlot A.C., Dempsey D.A., Klessig D.F. (2009) Salicylic Acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual review of phytopathology* 47:177–206.
- Vogel G., Fiehn O., Jean-Richard-dit-Bressel L., Boller T., Wiemken A., Aeschbacher R.A., Wingler A. (2001) Trehalose metabolism in *Arabidopsis*: occurrence of trehalose and molecular cloning and characterization of trehalose-6-phosphate synthase homologues. *Journal of experimental botany* 52:1817–1826.
- Voorrips R.E., Jongerius M.C., Kanne H.J. (1997) Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. *Theoretical and applied genetics* 94:75–82.
- Wagner G., Charton S., Lariagon C., Laperche A., Lugan R., Hopkins J., Frendo P., Bouchereau A., Delourme R., Gravot A., Manzanares-Dauleux M.J. (2012) Metabotyping: a new approach to investigate rapeseed (*Brassica napus* L.) genetic diversity in the metabolic response to clubroot infection. *Molecular plant-microbe interactions* 25:1478–1491.
- Walker J.C., Hooker W.J. (1945) Plant Nutrition in Relation to Disease Development. II. Cabbage Clubroot. *American journal of botany* 32:487–490.
- Wallenhammar A.-C. (1996) Prevalence of *Plasmodiophora brassicae* in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels. *Plant pathology* 45:710–719.
- Walters D.R., Bingham I.J. (2007) Influence of nutrition on disease development caused by fungal pathogens: implications for plant disease control. *The Annals of applied* 151:307-324.
- Walters D.R., Shuttleton M.A. (1985) Polyamines in the roots of turnip infected with *plasmodiophora brassicae* wor. *The New phytologist* 100:209–214.
- Wang G.L., Ruan D.L., Song W.Y., Sideris S., Chen L., Pi L.Y., Zhang S., Zhang Z., Fauquet C., Gaut B.S., Whalen M.C., Ronald P.C. (1998) Xa21D encodes a receptor-like molecule with a leucine-rich repeat domain that determines race-specific recognition and is subject to adaptive evolution. *The Plant cell* 10:765–779.
- Ward J.L., Forcat S., Beckmann M., Bennett M., Miller S.J., Baker J.M., Hawkins N.D., Vermeer C.P., Lu C., Lin W., Truman W.M., Beale M.H., Draper J., Mansfield J.W., Grant M. (2010) The metabolic transition during disease following infection of *Arabidopsis thaliana* by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *The Plant journal* 63:443–457.
- Webster M.A. (1986) pH and nutritional effects on infection by *Plasmodiophora brassicae* Wor. and on clubroot symptoms. University of Aberdeen.
- Webster M.A., Dixon G.R. (1991) Boron, pH and inoculum concentration influencing colonization by *Plasmodiophora brassicae*. *Mycological research* 95:74–79.
- Werner S., Diederichsen E., Frauen M., Schondelmaier J., Jung C. (2008) Genetic mapping of clubroot resistance genes in oilseed rape. *Theoretical and applied genetics* 116:363–372.
- Williams P.H. (1966) A system for the determination of races of *Plasmodiophora brassicae* that infect cabbage and rutabaga. *Phytopathology* 56:624–626.
- Williams P.H., Keen N.T., Strandberg J.O., McNabola S.S. (1968) Metabolite synthesis and degradation during clubroot development in cabbage hypocotyls. *Phytopathology* 58:921.
- Williams P.H., McNabola S.S. (1967) Fine structure of *plasmodiophora brassicae* in sporogenesis. *Canadian journal of botany* 45:1665–1669.
- Winkel-Shirley B. (2002) Biosynthesis of flavonoids and effects of stress. *Current opinion in plant biology* 5:218–223.

Références Bibliographiques

- Winter G., Todd C.D., Trovato M., Forlani G., Funck D. (2015) Physiological implications of arginine metabolism in plants. *Frontiers in plant science* 6:534.
- von Wittgenstein N.J., Le C.H., Hawkins B.J., Ehlting J. (2014) Evolutionary classification of ammonium, nitrate, and peptide transporters in land plants. *BMC evolutionary biology* 14:11.
- Woronin M.S. (1878) *Plasmodiophora brassicae*, the cause of cabbage hernia. *Phytopathological Classic* 4.
- Yoshikawa H. (1993) Studies on breeding of clubroot resistance in cole [Cruciferae] crops. *Bulletin of the National Research Institute of Vegetables, Ornamental Plants and Tea Series A*.
- Yu F., Zhang X., Peng G., Falk K.C., Strelkov S.E., Gossen B.D. (2017) Genotyping-by-sequencing reveals three QTL for clubroot resistance to six pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica rapa*. *Scientific reports* 7:4516.
- Zamani-Noor N. (2017) Variation in pathotypes and virulence of *Plasmodiophora brassicae* populations in Germany. *Plant pathology* 66:316–324.
- Zhang H., Feng J., Hwang S.F., Strelkov S.E. (2015) Mapping of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) resistance in canola (*Brassica napus*). *Plant Pathology* 65:435-440.
- Zhao Y., Hull A.K., Gupta N.R., Goss K.A., Alonso J., Ecker J.R., Normanly J., Chory J., Celenza J.L. (2002) Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes & development* 16:3100–3112.
- Zhao D., Reddy K.R., Kakani V.G., Reddy V.R. (2005) Nitrogen deficiency effects on plant growth, leaf photosynthesis, and hyperspectral reflectance properties of sorghum. *European journal of agronomy* 22:391–403.
- Zhou J.J., Theodoulou F.L., Muldin I., Ingemarsson B., Miller A.J. (1998) Cloning and functional characterization of a *Brassica napus* transporter that is able to transport nitrate and histidine. *The Journal of biological chemistry* 273:12017–12023.
- Zipfel C., Robatzek S., Navarro L., Oakeley E.J., Jones J.D.G., Felix G., Boller T. (2004) Bacterial disease resistance in *Arabidopsis* through flagellin perception. *Nature* 428:764–767.
- Zurbriggen M.D., Carrillo N., Tognetti V.B., Melzer M., Peisker M., Hause B., Hajirezaei M.-R. (2009) Chloroplast-generated reactive oxygen species play a major role in localized cell death during the non-host interaction between tobacco and *Xanthomonas campestris* pv. vesicatoria. *The Plant journal* 60:962–973.

La résistance du colza à la hernie peut-elle être modulée par la fertilisation azotée ?

AIGU Yoann, UMR 1349 Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, Le Rheu, France

La hernie est une maladie racinaire affectant les *Brassica*, causée par *Plasmodiophora brassicae*. Le déploiement de variétés présentant des facteurs génétiques de résistances est le moyen de lutte principal contre cette maladie. Toutefois, l'efficacité de ces variétés résistantes dans les nouveaux systèmes d'agriculture durable, à bas intrant azoté, est encore à évaluer. Dans ce contexte, les questions de recherche posées dans cette thèse sont les suivantes : i) La modulation de la résistance à la hernie par la réduction de l'apport azoté est-elle génotype/isolat dépendante ? ii) Y-a-t-il un effet de la réduction des apports azotés sur l'architecture génétique de la résistance à la hernie chez le colza ? iii) Quels sont les réponses transcriptomiques et métabolomiques impliquées dans la réduction du développement des symptômes en condition de carence azotée ? Le criblage de la réponse de nombreux génotypes de colza vis-à-vis de plusieurs isolats de *P. brassicae* a été réalisé dans deux conditions de fertilisation azotée (8 mM et 1 mM de nitrate). Basé sur ces expériences, le contrôle génétique du développement des symptômes et de la production des spores de repos lors de l'infection par deux isolats (eH et K92-16) a été étudié par génétique de liaison chez une population biparentale et par génétique d'association chez un panel de colza d'hiver. Enfin, les réponses moléculaires impliquées dans la réduction du développement des symptômes observée chez le génotype 'Yudal' en condition 1mM ont été étudiées par des méthodes de RNA-seq et de métabolomique. L'impact de la fertilisation azotée sur la quantité de symptômes et la production de spores de repos est variable selon la combinaison génotype/isolat. Les modulations observées entraînent une augmentation de la résistance en condition 1mM. La fertilisation azotée module également l'effet (R^2) de certains des Quantitative Trait Loci (QTL) impliqués dans la résistance. Dans le cas de l'isolat eH, elle affecte principalement l'effet des QTL C09 et C02. L'augmentation de résistance observée chez le génotype 'Yudal' en condition 1mM, vis-à-vis de l'isolat eH, semble liée à la surexpression de gènes impliqués dans l'assimilation des nitrates (famille NRT2) et dans le transport de l'auxine.

Mots clefs : génétique quantitative ; transcriptomique ; métabolomique ; spores de repos ; *Plasmodiophora brassicae*

Can oilseed rape response to infection by clubroot be modulated by an abiotic factor such the nitrogen supply?

Clubroot is a *Brassica* root disease caused by *Plasmodiophora brassicae*. The use of varieties including genetic resistance factors is the most efficient strategy to manage clubroot disease. However, efficiency of these resistant varieties newly integrated in low-input agricultural systems (especially low nitrogen input) needs to be evaluated. In this context, the research questions investigated in this thesis are: i) Is clubroot resistance modulation by nitrogen fertilization genotype/isolate dependent? ii) Is there an effect of nitrogen fertilization reduction on the genetic architecture of clubroot resistance in rapeseed? iii) What are the transcriptomic and metabolomic responses implicated in symptom reduction under low nitrogen fertilization? To answer these questions, clubroot responses of several rapeseed genotypes were screened using different *P. brassicae* isolates under two nitrogen fertilizations (8mM and 1mM of nitrate). Based on this experiment, genetic control of symptom development and resting spore production during inoculation using two isolates (eH and K92-16) was studied by linkage analyses using a bi-parental population and by genome wide association using a winter rapeseed diversity set. Last, molecular responses implicated in symptom development, observed in 'Yudal' genotype under 1mM condition, were studied using RNA-seq and metabolomic methods. We revealed that impact of nitrogen fertilization on symptom quantity and resting spore production are dependent to genotype/isolate combination. Modulations observed were characterized by an increase of resistance under 1mM condition. Additionally, nitrogen fertilization modulates also the effect (R^2) of some Quantitative Trait Loci implicated in clubroot resistance (QTL). Using eH isolate, nitrogen fertilization principally impacts C09 QTL and C02 QTL effects. Ultimately, increase of resistance observed on 'Yudal' genotype under 1mM condition, using eH isolate, seems to be related with overexpression of genes implicated in nitrate assimilation (NRT2 family) and auxin transport.

Key words : quantitative genetics; transcriptomics; metabolomics; resting spores; *Plasmodiophora brassicae*