



**HAL**  
open science

# Etude de l'impact du climat sur la résistance quantitative d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*

Marie Didelon

► **To cite this version:**

Marie Didelon. Etude de l'impact du climat sur la résistance quantitative d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*. Interactions entre organismes. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30114 . tel-03922774

**HAL Id: tel-03922774**

**<https://theses.hal.science/tel-03922774>**

Submitted on 4 Jan 2023

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



# THÈSE

En vue de l'obtention du  
**DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE**  
Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

---

Présentée et soutenue par  
**Marie DIDELON**

Le 29 avril 2022

**Etude de l'impact du climat sur la résistance quantitative d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum***

---

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries**

Spécialité : **Developpement des plantes, interactions biotiques et abiotiques**

Unité de recherche :

**LIPME - Laboratoire des Interactions Plantes-Microbes-Environnement**

Thèse dirigée par  
**Sylvain RAFFAELE et Adelin BARBACCI**

Jury

M. Ludovic BONHOMME, Rapporteur  
M. Antoine GRAVOT, Rapporteur  
Mme Mathilde FAGARD, Examinatrice  
M. Sylvain RAFFAELE, Directeur de thèse  
M. Adelin BARBACCI, Co-directeur de thèse  
M. Christophe JACQUET, Président



# Remerciements

Cette thèse n'est pas uniquement le fruit de mon travail mais aussi celui des nombreuses personnes qui m'ont entourée pendant ces 3 dernières années.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse, Sylvain et Adelin. Merci d'avoir osé m'embaucher alors que je n'y connaissais rien en plantes et de m'avoir donné l'indépendance que je souhaitais. Votre capacité à penser « outside the box » m'impressionne et m'inspire. Merci aussi pour votre patience et les nombreuses relectures de ces derniers mois. Je voudrais également remercier tout le reste de l'équipe QIP (éQIP ?) pour votre bonne humeur. C'était un réel plaisir de faire partie de cette équipe. Je tiens à remercier particulièrement Mehdi pour ton aide, ton soutien et tes conseils qui m'ont beaucoup aidé, plus d'une fois.

Je voudrais également remercier les membres de mon comité de thèse, Richard Berthomé et Christine Girousse, pour le temps que vous m'avez consacré et pour vos précieux conseils, pleins de bienveillance. Je remercie Ludovic Bonhomme et Antoine Gravot d'avoir accepté d'être mes rapporteurs. J'espère que cette thèse vous sera agréable à lire. Merci également à Mathilde Fagard et Christophe Jacquet pour avoir accepté de participer à mon jury de soutenance. Je voudrais aussi remercier l'équipe pédagogique du master GMC à l'Université de Bordeaux. Je voudrais vous remercier pour votre pédagogie et votre humanité. Vous êtes des incubateurs à curiosité. Mes années de master ont été passionnantes et inspirantes grâce à vous.

Je voudrais également remercier toutes les personnes participant à la vie et au fonctionnement du LIPME, la serre, la laverie, la gestion... toujours là pour aider et avec un grand sourire en prime. Vous avez rendu mon travail plus facile et plus joyeux. Un grand merci à l'AJS qui m'a fait rencontrer des personnes chères à mon cœur et qui est à l'origine d'amitiés qui resteront longtemps après mon séjour au LIPME. Je souhaite à cette association de perdurer, de grandir, de continuer à organiser de sympathiques soirées mais aussi quelques événements scientifiques (parce que c'est important aussi, la science). Je suis fière d'avoir été à la tête de cette association pendant ces 3 années (malgré le covid qui a rendu les rencontres difficiles). Shantala, je crois en toi pour reprendre cette association, avec ton énergie tout le campus sera bientôt membre de l'AJS !

Je voudrais enfin remercier mes proches. Je voudrais remercier mes copines, celles de Bordeaux et celles de Lorraine. Je me rends compte de la chance que j'ai d'avoir tant de belles personnes que je puisse compter dans mes amies. Je voudrais remercier ma petite Jojo, source de joie et de douceur au quotidien. Pendant ma thèse, j'ai également eu la chance de rencontrer mon chéri, Antoine. Je ne te remercierai jamais assez pour ton soutien jusque dans les moments difficiles, pour ta belle compagnie et pour ton amour. Ces 3 années ne sont que le début d'une belle aventure. Je voudrais également remercier la famille Escourrou, particulièrement les parents, François et Françoise qui m'ont rapidement accueilli dans leur famille et m'ont permis d'avoir une deuxième famille, ici à Toulouse.

Je voudrais bien évidemment remercier ma famille, que je n'ai malheureusement pas pu voir assez pendant ces 3 années mais qui m'ont soutenu à distance, notamment via l'envoi de colis pleins de bonnes choses de Lorraine. Je voudrais remercier principalement mes parents qui m'ont toujours encouragée et soutenue dans mes choix. Je suis fière d'être votre fille et je vous serais infiniment reconnaissante pour tout ce que vous m'avez donné.

Je dédie ainsi cette thèse à toutes ces personnes, parce que la recherche est un travail d'équipe et que je n'y serai jamais arrivé sans vous.

# Résumé

Le dérèglement climatique se traduit par l'augmentation globale des températures de surface, l'augmentation d'épisodes de fortes précipitations et la modification des vents. Ces modifications de l'environnement abiotique ne sont pas sans conséquence pour les interactions plantes-pathogènes. Si des études ont déjà montré que l'élévation de la température pouvait rendre les plantes plus sensibles aux infections, nous ne savons encore que très peu de choses sur les mécanismes génétiques sous-jacents. L'identification de gènes clés impliqués dans la modulation de l'immunité par le climat est pourtant une étape nécessaire à une meilleure compréhension de la résistance de la plante dans un environnement physique fluctuant. Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'identification de gènes impliqués dans la modulation de la résistance quantitative par le climat. Pour cela, j'ai étudié les dépendances génétiques de ce type de résistance le long d'une trajectoire de réchauffement climatique probable.

La résistance quantitative des plantes qui est mise en place pour faire face à certains champignons nécrotrophes est fortement multigénique. Les gènes impliqués sont majoritairement non spécifiques à la défense et sont modulés en réponse à des fluctuations de l'environnement abiotique. Cette caractéristique fait de cette forme de résistance un système idéal pour identifier des acteurs génétiques clés dans la modulation de la résistance par le climat. L'étude du pathosystème composé de la plante modèle *Arabidopsis thaliana* et du champignon nécrotrophe à large spectre d'hôte *Sclerotinia sclerotiorum* nous a permis d'identifier plusieurs acteurs génétiques clés. En combinant analyse transcriptomique, biologie moléculaire et bioinformatique, j'ai mis en évidence un réseau de gènes surexprimés en réponse à l'infection et dont l'expression est sensiblement modulée par le climat ainsi qu'une protéine de la famille des facteurs de transcription NAC pour laquelle nous avons identifié des cibles potentielles. L'analyse de données transcriptomiques a également permis d'associer à la modulation de la résistance par le climat un nombre conséquent de gènes appartenant à une famille de fonction inconnue baptisée, suite à cette étude, famille PADRE (*plastid movement, cadmium tolerance, calmodulin and response regulator interaction*). Comme les fluctuations thermiques ont pour conséquence la modification de la vitesse du vent, je me suis également intéressée à l'effet du vent sur la résistance des plantes. J'ai montré que le vent était un facteur environnemental modulant fortement la résistance des plantes et que l'augmentation de la sensibilité constatée dépendait du génotype et de la fréquence à laquelle les épisodes venteux se répètent.



# Abstract

Climate change leads to global warming, more recurring events of heavy precipitations, and modification of winds. These modifications of the abiotic environment influence the interaction between plants and pathogens. Studies showed that temperature elevation leads to a higher susceptibility in plants, however little is known about the molecular mechanisms involved. Identification of key genes involved in the modulation of immunity by climate is however necessary to a better understanding of plant resistance within a fluctuating environment. During my thesis, I focused on the identification of genes involved in the modulation of Quantitative Disease Resistance (QDR) by the climate. To do so, I studied the genetic dependence of QDR along a trajectory simulating climate change.

The QDR that takes place to counter some necrotrophic fungi is highly polygenic. QDR genes are widely unspecific to immunity and are sensitive to changes in the abiotic environment. This characteristic makes QDR an ideal system to identify key molecular actors of the modulation of immunity by climate. The study of the pathosystem composed of the model plant *A. thaliana* and the broad-spectrum necrotrophic fungus *S. sclerotiorum* allowed us to identify several of these key molecular actors. By combining transcriptomic analyses, molecular biology and bioinformatics, we highlighted a network of genes involved in resistance whose expression depends on climate as well as a NAC transcription factor family gene for which we identified the putative targets. The transcriptomic analyses also showed that a number of genes from a family of unknown function (subsequently coined PADRE for plastid movement, cadmium tolerance, calmodulin and response regulator interaction) were involved in the modulation of resistance by climate. As temperature variations lead to wind speed modifications, we also studied the effect of wind on plant resistance to pathogens. We showed that wind strongly modulated plant resistance and that higher susceptibility depended on the genotype and the frequency of the wind events.



# Liste des abréviations

ABA	Acide abscissique
ACD11	<i>Accelerated Cell Death 11</i>
AIA	Auxine
ARNm	ARN messenger
ARNs	Petit ARN
ARPC4	<i>Actin-Related Protein Complex 4</i>
ATL6	<i>Arabidopsis Toxicos en Levadura 6</i>
BAP	<i>BON Association Protein</i>
BON	Bonzai
CAIG	<i>Climate-Associated, Infection-induced Genes</i>
CaM	Calmoduline
cAMP	Adénosine cyclique monophosphate
CAMTA	<i>Calmodulin-binding Transcription Activator</i>
CBF	<i>C-repeat Binding Factor</i>
CDPK	Kinases dépendantes du calcium
cGMP	Guanosine cyclique monophosphate
CHIP-seq	Immunoprécipitation de la chromatine couplée à un séquençage
CK	Cytokinines
CNGC	<i>Cyclique Nucleotide-Gated ion Channel</i>
CP	Cerato-platanine
Cyp79b2	<i>Cytochrome P450 family 79 subfamily B polypeptide 2</i>
DAMP	<i>Damage-Associated Molecular Pattern</i>
DAP-seq	<i>DNA Affinity Purification sequencing</i>
DEG	Gène différentiellement exprimé
DUF	<i>Domain of Unknown Function</i>
EIN3	<i>Ethylene-Insensitive 3</i>
ERF1	<i>Ethylene-Responsive Factor 1</i>
ET	Ethylène
ETI	<i>Effector-Triggered Immunity</i>
ETS	<i>Effector Triggered Susceptibility</i>
FLS2	<i>Flagellin Sensing 2</i>
GA	Acide gibbérellique

GFP	<i>Green Fluorescence Protein</i>
GIEC	Groupe d'experts Intergouvernemental sur l'Evolution du Climat
GMC	Modèle climatique global
GO	Ontologies de gène
GWAS	<i>Genome-Wide Association Studies</i>
hpi	<i>Hours post infection</i>
HR	Réponse hypersensible
HRE	<i>Heat-Released Elicitor</i>
HSF	<i>Heat Shock Factor</i>
HSP	<i>Heat Shock Protein</i>
HY5	<i>Elongated Hypocotyl 5</i>
IAOx	Indo-3-acétaldoxime
ICE1	<i>Inducer of CBF Expression 1</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
LAZ5	Lazarus 5
LFC	Log2 de l'enrichissement
LOV1	<i>Locus Orchestrating Victorin effects 1</i>
LRR-RK	<i>Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase</i>
MAP kinases	<i>Mitogen-Activated Protein kinases</i>
MPK4	Kinase MAP 4
NAC	<i>No Apical Meristem, ATAF1 et 2, Cup-shaped cotyledon 2</i>
NC	Nucléotidyl cyclases
NLR	<i>NOD-like receptors</i>
NLS	<i>Nuclear Localization Signal</i>
NO	Oxyde nitrique
OA	Acide oxalique
ORA59	<i>Octadecanoid-Responsive Arabidopsis AP2/ERF59</i>
PADRE	Plastid movement, cadmium tolerance, calmodulin and response regulator interaction
PAMP	<i>Pathogen-Associated Molecular Pattern</i>
PDF1.2	<i>Plant Defensin 1.2</i>
PR	<i>Pathogenesis-Related</i>
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
PTI	<i>PAMP Triggered Immunity</i>
P-value	Erreur de premier ordre

QDR	<i>Quantitative Disease Resistance</i>
QTL	<i>Quantitative Trait Loci</i>
RLP30	<i>Receptor-Like Protein 30</i>
RONS	<i>Reactive Oxygen and Nitrogen Species</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
RPM	<i>Reads Per Million</i>
SA	<i>Acide salicylique</i>
SCFE1	<i>Sclerotinia Culture Filtrate Elicitor 1</i>
SDS	<i>SOLO DANCERS</i>
Sha	<i>Shahdara</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TIR-NBS-LRR	<i>TIR-Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat</i>
TRP	<i>Transient Receptor Potential</i>
TRX	<i>Thioredoxine</i>
WAK1	<i>Wall Associated Kinase 1</i>
WAKL10	<i>Wall-Associated Kinase-Like 10</i>
XLG2	<i>Extra-Large GTP-binding 2</i>



# Index des figures

Figure 1: Le modèle zigzag	p 4
Figure 2: Des GO associés au climat sont retrouvés dans les GO enrichis en réponse à l'infection.	p 9
Figure 3: Prédiction des modifications des températures moyennes de surface pour 2081-2100	p 11
Figure 4: Les réponses aux modifications de la température présentent de nombreuses similarités.	p 15
Figure 5: Prédictions de différences de récoltes entre 2020 et 2070 par latitude, culture et modèle de prédiction	p 16
Figure 6 : Observation des effets du changement climatique entre 1950 et aujourd'hui	p 20
Figure 7 : Prédiction des modifications de précipitations annuelles pour 2081-2100	p 21
Figure 8 : Prédiction des modifications des vents de surface pour 2081-2100	p 23
Figure 9 : Cycle de vie de <i>S. sclerotiorum</i>	p 26
Figure 10 : Réponse moléculaire à l'infection par <i>S. sclerotiorum</i>	p 31
Figure 11 : Classification des climats de Köppen-Geiger	p 40
Figure 12 : Phénotype de sensibilité en réponse à l'infection par <i>S. sclerotiorum</i> en fonction du climat et du génotype	p 43
Figure 13 : Sélection des gènes les plus surexprimés en réponse à <i>S. sclerotiorum</i> dans toutes les accessions et tous les climats	p 44
Figure 14 : Analyse différentielle de l'expression des gènes en fonction du climat et analyse d'enrichissement en GO de la sélection de gènes	p 47
Figure 15 : Le réseau de corrélation s'organise en 3 clusters principaux.	p 50
Figure 16 : Les mutants des gènes candidats sont tous plus résistants après avoir été cultivés dans le climat chaud.	p 52

- Figure 17 : Localisation nucléaire de AT3G12910-GFP et augmentation de la résistance à *S. sclerotiorum* p 53
- Figure 18 : Les cibles potentielles d'AT3G12910 sont impliquées dans la réponse au stress et dans le métabolisme. p 55
- Figure 19 : Analyse différentielle de l'expression des gènes en fonction du climat dans les échantillons contrôles p 59
- Figure 20 : Surreprésentation des climats dans les polymorphismes p 65
- Figure 21 : Des gènes PADRE sont impliqués dans la réponse à *S. sclerotiorum* en fonction du climat. p 70
- Figure 22 : Effet de la fréquence du vent sur la sensibilité d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum* p 91
- Figure 23 : L'impact du vent sur la résistance dépend de la taille des feuilles. p 93
- Figure 24 : La majorité des gènes différentiellement exprimés en réponse à *S. sclerotiorum* sont dépendants du climat. p 97

# Table des matières

<b>Avant-propos .....</b>	<b>1</b>
<b>Introduction générale.....</b>	<b>3</b>
L'immunité des plantes fait intervenir divers mécanismes de résistance .....	3
La PTI et l'ETI sont deux couches de la résistance qualitative.....	3
Les pathogènes nécrotrophes exploitent la mort cellulaire programmée des cellules végétales.....	5
L'ETI impose une forte pression de sélection sur les pathogènes.....	6
La résistance quantitative est multigénique.....	7
La résistance quantitative permet une plus grande durabilité de la résistance .....	8
Les modifications climatiques à venir et leurs impacts sur les plantes cultivées.....	9
La température globale de la Terre augmente depuis le XVIII <sup>ème</sup> siècle.....	10
Des températures élevées peuvent induire une réponse moléculaire importante chez les plantes.....	11
La réponse moléculaire au froid partage des voies de signalisation avec la réponse aux températures élevées. ....	12
La modification des températures modifie le rendement des récoltes ainsi que le risque d'infection par des agents pathogènes.....	15
Une variation des températures modifie la défense des plantes. ....	17
Le cycle de l'eau devrait s'intensifier avec le réchauffement climatique.....	20
Le réchauffement climatique affecte l'intensité du vent, source majeure de sollicitations mécaniques.....	22
Sclerotinia sclerotiorum, champignon pathogène nécrotrophe à large spectre d'hôte .....	25
Description du cycle d'infection par <i>S. sclerotiorum</i> .....	25
L'infection par <i>S. sclerotiorum</i> peut avoir lieu à différentes températures mais nécessite une humidité très élevée.....	26
La réponse des plantes à l'infection par <i>S. sclerotiorum</i> est complexe et implique divers mécanismes de l'immunité.....	28
Questions et démarche .....	33

## **Chapitre I : Identification d'un nouveau facteur de transcription NAC impliqué dans la régulation climatique de la QDR d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*.....37**

Introduction .....	37
Résultats .....	40
Les différentes accessions d' <i>A. thaliana</i> montrent un phénotype plus sensible à l'infection par <i>S. sclerotiorum</i> lorsqu'elles ont été cultivées dans le climat le plus chaud. ....	40
Analyse du séquençage d'ARN en fonction de l'infection par <i>S. sclerotiorum</i> et sélection des gènes les plus surexprimés en réponse à l'infection.....	45
Analyse du séquençage d'ARN en fonction du climat et sélection des gènes dont l'expression est modulée par l'infection et le climat.....	45
Le cluster 2 regroupe des gènes dont l'expression est modulée par le climat indépendamment du génotype. ....	47
Les gènes CAIG candidats sont des gènes de sensibilité à <i>S. sclerotiorum</i> dans le climat le plus chaud.....	50
AT3G12910 est localisé dans le noyau chez <i>N. benthamiana</i> et sa surexpression entraîne une meilleure résistance à l'infection par <i>S. sclerotiorum</i> .....	52
Les cibles potentielles d'AT3G12910 sont des gènes associés aux stress.....	54
Discussion .....	57
Une simulation du réchauffement climatique a montré une augmentation de la sensibilité des plantes dans un climat chaud.....	57
L'infection entraîne une reprogrammation transcriptomique plus importante que le climat.....	58
Le réseau de co-expression des gènes CAIG est organisé en 3 clusters.....	59
Les gènes candidats sont des facteurs de sensibilité à <i>S. sclerotiorum</i> dans le climat le plus chaud.....	60
Les polymorphismes dans les gènes CAIG sont associés à des climats spécifiques .....	62
La famille de facteurs de transcription NAC est impliquée dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques.....	66

## **Chapitre II : Plusieurs membres de la famille PADRE influencent négativement la résistance d'*A. thaliana* face à *S. sclerotiorum* en fonction du climat .....69**

Introduction .....	69
<u>Article</u> : <i>Patterns of Sequence and Expression Diversification Associate Members of the PADRE Gene Family With Response to Fungal Pathogens</i> .....	69
Résultats complémentaires et discussion .....	85

**Chapitre III : Le vent, une conséquence thermique qui module la résistance d’*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*.....89**

Introduction ..... 89

Résultats ..... 90

    La durée du vent module différentiellement la résistance d’*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*.  
    ..... 90

    L’impact du vent sur la résistance d’*A. thaliana* à *S. sclerotiorum* dépend de la quantité de  
    signaux mécaniques perçue par la plante. .... 92

Discussion ..... 94

**Discussion générale.....95**

Les pathogènes s’adaptent plus rapidement au réchauffement climatique que les plantes.  
..... 95

La QDR est hautement multigénique et fortement modulée par l’environnement climatique.  
..... 96

Une nouvelle vision de la QDR ..... 98

**Matériel et méthodes..... 101**

Matériel végétal et culture d’*A. thaliana*..... 101

Extraction d’ADN génomique ..... 102

Culture de *S. sclerotiorum* et infection ..... 102

Séquençage d’ARN..... 103

Réseau de coexpression..... 103

Extraction d’ARN et qRT-PCR ..... 103

Analyse des polymorphismes ..... 104

Mutagenèse dirigée et clonage ..... 104

Transformation d’*E. coli* ..... 105

Transformation d’*A. tumefaciens*..... 106

Agro-infection de *N. bethamiana* et microscopie confocale ..... 106

**Bibliographie..... 111**



# Avant-propos

Le réchauffement climatique est une réalité. Les températures mesurées actuellement battent souvent des records détenus depuis des décennies, des siècles, voire des milliers d'années. La température globale augmente, ainsi que le niveau des océans, les glaciers fondent et nous observons de plus en plus d'évènements climatiques extrêmes.

Ces modifications climatiques impactent fortement la biosphère. Les plantes par exemple, de par leur nature sessile, font directement face au changement climatique de leur environnement proche. Une espèce peut répondre au réchauffement climatique par un changement de niche écologique mais les prédictions indiquent des perturbations importantes à l'échelle des écosystèmes naturels et de la biodiversité (Bellard et al., 2012). Au niveau de l'agriculture, certaines productions risquent de perdre en rendement (Chaloner et al., 2021), tandis que d'autres devront être délocalisées afin de trouver un climat plus favorable. Ainsi, le réchauffement climatique aura très probablement un impact négatif sur notre production de nourriture.

De plus, le réchauffement climatique entraîne un changement dans l'environnement pouvant favoriser ou défavoriser certains microorganismes. Dans les régions où l'on prévoit une augmentation des précipitations, des organismes comme les champignons nécessitant un fort taux d'humidité auront des conditions plus favorables à leur croissance (Chen et al., 2021a). Ainsi, les modifications climatiques pourront également être à l'origine d'une augmentation des épidémies de pathogènes favorisés par ces nouvelles conditions météorologiques. Un exemple de ces pathogènes est le champignon *Sclerotinia sclerotiorum* (Abawi and Grogan, 1975).

*S. sclerotiorum* est un champignon pathogène à l'origine de la pourriture blanche dans de nombreuses productions agricoles causant des pertes économiques considérables chaque année, en particulier sur les récoltes de colza. Pour chaque pourcentage d'incidence de la maladie (un nouveau cas sur 100 plantes), une réduction des récoltes de colza de 12,75 kg/ha en moyenne (0,5 %) est observée (del Río et al., 2007). Or l'incidence de *S. sclerotiorum* dans un champ peut atteindre les 100 % (Harding et al., 2017) et l'incidence moyenne observée en Allemagne sur 10 ans (entre 1994 et 2004) s'élève à 10,5 % avec une grande variabilité selon les années (Koch et al., 2007). Parmi les principales plantes hôtes de *S. sclerotiorum*, aucune variété complètement résistante n'existe. Les principaux moyens de lutte contre *S. sclerotiorum* dans les cultures de colza aujourd'hui sont l'épandage de fongicides et la lutte culturale (Derbyshire and Denton-Giles, 2016). La lutte biologique est possible avec le champignon mycotrophe *Coniothyrium minitans* (Derbyshire and Denton-Giles, 2016) dans le cadre d'un plan de contrôle de la maladie intégrant plusieurs moyens de lutte plutôt que comme une solution à part entière. Dans un tel plan de contrôle de *S. sclerotiorum*, l'utilisation de variété partiellement résistantes seraient également un atout et pourrait permettre une diminution de l'utilisation de fongicides.

Le principal mécanisme de défense des plantes face à *S. sclerotiorum* réside dans la résistance quantitative (QDR pour *Quantitative Disease Resistance*) (Wang et al., 2019a). La

QDR est caractérisée par une distribution continue de phénotypes de résistance, contrairement à la résistance qualitative où les phénotypes sont divisés en deux catégories discrètes, sensibles et résistants. La QDR est par définition hautement multigénique, ce qui implique une faible pression de sélection appliquée au pathogène et donc une haute durabilité de la résistance dans les champs (Parlevliet, 2002).

Chez les plantes, une maladie est la résultante de l'interaction entre la plante, le pathogène et les conditions environnementales. Ainsi, comprendre les mécanismes inhérents à la résistance quantitative en conditions environnementales variables est primordial afin de protéger les cultures dans un contexte de réchauffement climatique global, face aux agents pathogènes en perpétuelle évolution.

*Arabidopsis thaliana* est une des plantes les plus étudiées en laboratoire, pour laquelle de nombreuses ressources génétiques sont disponibles sous la forme d'accessions naturelles d'origines géographique et climatique connues (The 1001 Genomes Consortium, 2016). *A. thaliana* est phylogénétiquement proche du colza et également hôte de *S. sclerotiorum*. Au cours de ma thèse, nous avons ainsi étudié l'impact du climat sur la résistance quantitative de la plante modèle *A. thaliana* face au champignon pathogène nécrotrophe *S. sclerotiorum*.

# Introduction générale

## L'immunité des plantes fait intervenir divers mécanismes de résistance

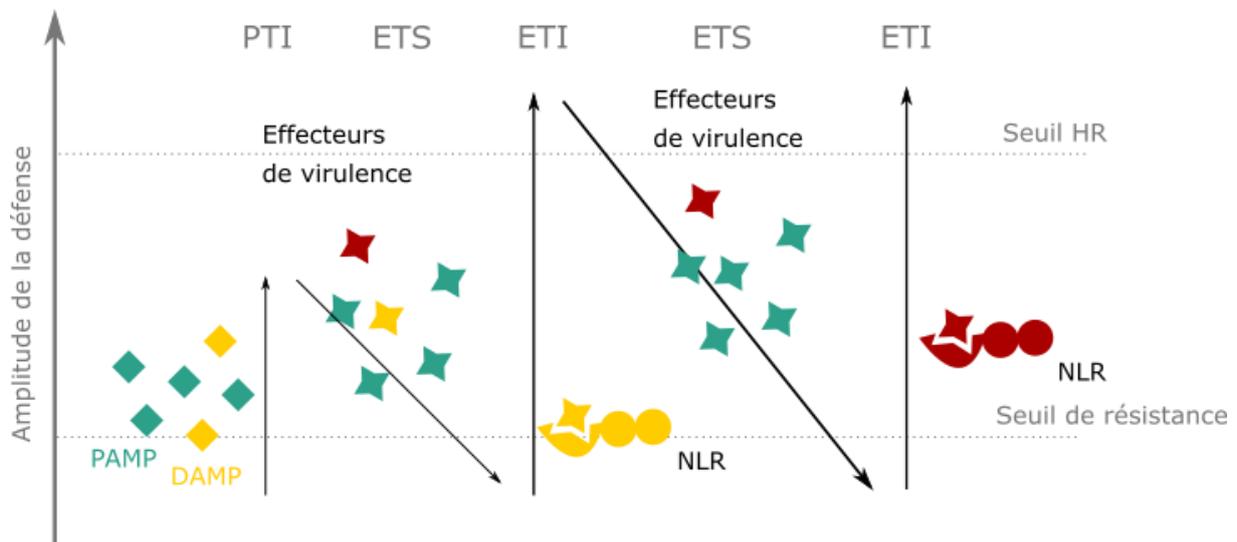
### La PTI et l'ETI sont deux couches de la résistance qualitative

Dans la nature, les plantes sont confrontées à de nombreux organismes pathogènes tels que des champignons, des bactéries, des virus, des nématodes ou des plantes parasites. Au cours de l'évolution, différents mécanismes se sont développés chez les plantes, permettant leur survie face à leurs bioagresseurs. Une partie de ce système de défense implique des récepteurs membranaires appelés PRR (*Pattern Recognition Receptors*). Les PRR ont généralement un domaine kinase et reconnaissent des motifs moléculaires conservés associés aux pathogènes appelés PAMP (pour *Pathogen Associated Molecular Pattern*). Le PRR FLS2 (*Flagellin Sensing 2*), kinase semblable aux récepteurs répétés riches en leucine (LRR-RK pour *Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase*), reconnaît par exemple la flagelline, composant protéique majoritaire du flagelle des bactéries (Gomez-Gomez and Boller, 2000). Certains PRRs peuvent aussi reconnaître des motifs moléculaires associés aux dommages dus à l'infection (DAMPs pour *Damage Associated Molecular Pattern*) comme les oligogalacturonides dérivés de la dégradation de la paroi cellulaire végétale (Souza et al., 2017). La reconnaissance des PAMP et des DAMP par les PRR entraîne une cascade moléculaire activant la production de ROS (*Reactive Oxygen Species*), l'activation de MAP kinases (*Mitogen-Activated Protein kinases*), la production de phytohormones, une reprogrammation de l'expression des gènes et un renforcement de la paroi cellulaire, on parle alors de l'immunité déclenchée par les PAMP/DAMP, ou PTI (*PAMP Triggered Immunity*) (**Figure 1**) (Bacete et al., 2018; Dodds and Rathjen, 2010; Ingle et al., 2006; Zipfel, 2009).

Suite à la reconnaissance de l'agent pathogène, de nombreuses phytohormones sont produites comme l'éthylène, l'acide salicylique, l'acide jasmonique, les auxines, les cytokinines, les brassinostéroïdes, l'acide abscissique ou les gibbérellines (Berens et al., 2017; Robert-Seilaniantz et al., 2011; Tsuda and Katagiri, 2010). Des interactions existent entre les voies des différentes phytohormones et peuvent agir de manière synergique ou antagoniste. Ces régulations varient en fonction du pathogène rencontré et permettent d'adapter la réponse de défense (Berens et al., 2017). L'acide salicylique est classiquement associé à la réponse aux pathogènes biotrophes tandis que l'acide jasmonique et l'éthylène sont associés à la réponse aux pathogènes nécrotrophes (Berens et al., 2017; Robert-Seilaniantz et al., 2011). Les interactions entre les différentes voies de biosynthèse et de signalisation des phytohormones mènent à une reprogrammation de l'expression de gènes permettant la défense face aux pathogènes. Dans le cas de la réponse aux pathogènes nécrotrophes par exemple, le facteur de transcription EIN3 (*Ethylene-Insensitive 3*) est un élément clé dans la transduction du signal des voies de l'éthylène et de l'acide jasmonique. L'augmentation du taux d'éthylène entraîne une accumulation de EIN3 dans le noyau (An et al., 2010) et l'acide

jasmonique permet l'augmentation de son activité transcriptionnelle (Zhu et al., 2011). EIN3 permet alors l'activation de la transcription de ERF1 (*Ethylene-Responsive Factor 1*) et ORA59 (*Octadecanoid-Responsive Arabidopsis AP2/ERF59*) (Solano et al., 1998; Zhu et al., 2011) qui sont des facteurs de transcription nécessaires à l'activation de la transcription de nombreux gènes de défense comme par exemple PDF1.2 (*Plant Defensin 1.2*) (Lorenzo et al., 2003; Pré et al., 2008; Solano et al., 1998; Zarei et al., 2011).

Certains pathogènes sont capables d'infecter les plantes sans être reconnus par les PRR ou en supprimant les signaux suivant leur reconnaissance. Cette suppression de la PTI est souvent liée à la sécrétion de petites molécules favorisant l'infection par les pathogènes, appelées effecteurs de virulence. On observe alors une sensibilité déclenchée par les effecteurs (ETS, *Effector Triggered Susceptibility*) (**Figure 1**) (Jones and Dangl, 2006). Par exemple, lors de l'infection d'*A. thaliana* par la bactérie pathogène *Pseudomonas syringae*, la bactérie sécrète un effecteur HopAI1 qui, en inactivant les MAP kinases, inhibe des cascades moléculaires menant au renforcement des défenses de la paroi cellulaire et à l'activation transcriptionnelle des gènes de la PTI (Zhang et al., 2007). Au cours de l'évolution, des plantes ont développé des récepteurs NLR (NOD-like receptors) intracellulaires, reconnaissant



**Figure 1 : Le modèle zigzag.** Dans la phase 1, les plantes détectent les PAMP (losanges verts) et les DAMP (losanges jaunes) issus de l'infection par le pathogène via leurs PRR, et déclenchent la PTI. Dans la phase 2, des pathogènes sécrètent des effecteurs de virulence (étoiles) qui interfèrent avec la PTI ou permettent la propagation du pathogène, ce qui mène à une susceptibilité déclenchée par les effecteurs (ETS). Dans la phase 3, un effecteur (indiqué en jaune) est reconnu par un récepteur NLR, ce qui déclenche l'ETI, une version amplifiée de la PTI qui dépassent généralement le seuil de l'induction de la réponse hypersensible (HR). Dans la phase 4, les pathogènes ne possédant pas l'effecteur jaune sont sélectionnés et sont capables de déclencher l'ETS. Dans la phase 5, la pression de sélection apportée par les pathogènes favorise la sélection de plantes possédant un NLR capable de reconnaître un autre effecteur (en rouge) et de déclencher l'ETI. Figure adaptée de Jones and Dangl, 2006.

spécifiquement des effecteurs produits par les pathogènes, et codés par des gènes de résistance appelés gènes R. Les NLR sont en général spécifiques d'un effecteur. La reconnaissance des effecteurs par les NLR peut être directe ou indirecte (Cui et al., 2015) et engendre une modulation structurelle du NLR le faisant passer d'inactif à activé (Takken and Goverse, 2012). Une fois activé, le NLR peut recruter directement ou indirectement des facteurs de transcription et permettre ainsi une reprogrammation transcriptionnelle de la cellule mettant en place une réponse de défense appelée ETI pour *Effector-Triggered Immunity* (**Figure 1**) (Cui et al., 2015). Les voies de signalisation mises en place pendant l'ETI sont semblables à celles déclenchées par la PTI et souvent accompagnés d'une mort cellulaire programmée et localisée des cellules végétales, appelée réponse hypersensible (HR) (Cui et al., 2015), de sorte que l'ETI est parfois considérée comme une version accélérée et amplifiée de la PTI permettant une résistance complète au pathogène (**Figure 1**) (Dodds and Rathjen, 2010; Jones and Dangl, 2006; Tao et al., 2003).

### Les pathogènes nécrotrophes exploitent la mort cellulaire programmée des cellules végétales.

Les pathogènes biotrophes sont des pathogènes se nourrissant de cellules vivantes et les pathogènes nécrotrophes de cellules mortes. Associée à une mort cellulaire programmée, la HR est efficace contre les pathogènes biotrophes mais elle peut être utilisée par les agents pathogènes nécrotrophes pour favoriser leur croissance. C'est par exemple le cas des champignons nécrotrophes *S. sclerotiorum* et *B. cinerea* dont la croissance est réduite dans un mutant d'*A. thaliana* incapable de mettre en place une HR (Govrin and Levine, 2000). En revanche, la croissance de *B. cinerea* est accélérée quand il est co-infecté dans une accession sauvage d'*A. thaliana* avec une souche avirulente de *P. syringae* favorisant la HR (Govrin and Levine, 2000). Certains pathogènes comme *Cochliobolus victoriae*, ont ainsi évolué pour utiliser ce mécanisme de défense à leur avantage, transformant des gènes R en facteurs de sensibilité (Lorang et al., 2007). *C. victoriae* est un champignon pathogène nécrotrophe qui produit un facteur de virulence appelé victorine lors de l'infection. Le gène *LOV1* (*Locus Orchestrating Victorin effects 1*), codant une protéine NLR, a été identifié comme un facteur de sensibilité à la victorine et à l'infection par *C. victoriae* (Lorang et al., 2007; Sweat et al., 2008). Lors de l'infection, la victorine se lie à une thioredoxine, TRX-h5, ce qui entraîne l'activation de LOV1. L'activation de LOV1 mène à la mise en place d'une mort cellulaire au site d'infection, ce qui facilite la propagation de *C. victoriae* (Lorang et al., 2012, 2007; Sweat and Wolpert, 2007; Sweat et al., 2008). La majorité des accessions naturelles d'*A. thaliana* possèdent un allèle fonctionnel de *LOV1*, ainsi les auteurs suggèrent que la protéine NLR LOV1 aurait un rôle dans la défense face à un autre pathogène, inconnu à ce jour, ce qui expliquerait le maintien du gène *LOV1* au cours de l'évolution (Sweat and Wolpert, 2007).

Ainsi la HR, bien que permettant une résistance complète face à de nombreux agents pathogènes biotrophes, peut être délétère face à des pathogènes nécrotrophes.

## L'ETI impose une forte pression de sélection sur les pathogènes

La PTI et l'ETI sont des formes d'immunité procurant une résistance dite qualitative, qui entraîne la plupart du temps une résistance complète de la plante face à son agresseur. La relation gène-pour-gène, caractérisée au XX<sup>ème</sup> siècle (Flor, 1971), est traditionnellement utilisée pour développer des variétés de plantes agronomiques complètement résistantes à certains pathogènes retrouvés dans les champs. L'agriculture moderne est caractérisée par une culture sur de très vastes parcelles. Un nombre restreint de variétés sélectionnées pour leur haut rendement ou leur résistance à des pathogènes y sont cultivées. Cette uniformisation des cultures mène à une perte de diversité génétique au sein des territoires agronomiques. La culture sur un vaste territoire d'une variété résistante à un pathogène impose une forte pression de sélection sur le pathogène (Zhan et al., 2015). Ainsi, dans le cas de résistances monogéniques, comme celles conférées par les gènes R, une simple mutation ponctuelle du gène d'avorulence, qui modifierait sa séquence, son expression ou la séquence protéique du produit du gène, peut empêcher la reconnaissance de l'effecteur, mener à une ETS et donc à une augmentation de la virulence du pathogène. Ceci a été observé par exemple dans le gène d'avorulence *AvrRlm6* de *Leptosphaeria maculans*, champignon pathogène responsable de la nécrose du collet chez le colza. Dans des conditions expérimentales en France, la résistance apportée par le gène de résistance Rlm6 chez le colza a été contournée en 3 ans (Brun et al., 2000). L'analyse de la séquence de *AvrRml6* dans les souches virulentes de *L. maculans* a mis en évidence l'existence d'allèles d'*AvrRml6* possédant une mutation ponctuelle « non-sens », c'est-à-dire faisant apparaître un codon STOP prématuré et menant à la production d'une protéine tronquée (Fudal et al., 2009). De plus, la fixation de la mutation dans la population est d'autant plus rapide qu'elle apparaît dans une vaste monoculture dans laquelle le pathogène virulent pourra largement se développer. Le développement du pathogène mènerait alors à un contournement de la résistance (Lannou et al., 2021; Zhan et al., 2015). Nous pouvons citer pour exemple le cas du champignon *Puccinia graminis* à l'origine de la rouille noire du blé. En l'espace de 7 ans, une souche de *P. graminis* (Ug99) a contourné les résistances conférées par deux gènes R, *Sr31* en 1999 et *Sr24* en 2006 (Pretorius et al., 2000; Stokstad, 2007). Ainsi, sélectionner des variétés présentant une résistance complète à un pathogène mais monogénique n'est souvent pas une solution durable pour éviter les épidémies.

Une résistance durable à un pathogène est définie comme une résistance dont l'efficacité perdure sur une longue durée malgré une utilisation intensive en agriculture dans des conditions propices au pathogène (Johnson, 1981). Afin de palier la faible durabilité des résistances monogéniques, des stratégies de pyramidage de gènes de résistance ont été développées. Certaines de ces stratégies consistent à combiner plusieurs gènes R dans un même génotype afin d'augmenter la durabilité des différentes résistances qu'ils confèrent (Feechan et al., 2015; REX Consortium, 2016; Xiao et al., 2017, 2016). Ces stratégies se basent sur le raisonnement selon lequel les mutations à différents loci d'avorulence seraient indépendantes et que la probabilité pour qu'un pathogène accumule les mutations permettant de contourner les résistances apportées par la pyramide de gènes R serait infime (Mundt, 2018). Cependant, le contournement des résistances apportées par la pyramide de gènes R pourrait survenir suite à des délétions, des recombinaisons génétiques, la perte de

gènes d'avirulence reconnaissant plusieurs gènes R, le développement de gènes suppresseurs affectant plusieurs loci d'avirulence ou l'action d'éléments transposables (Mundt, 2018). Par ailleurs, les gènes R apportant la résistance aux cultivars utilisés en agriculture ne sont souvent pas identifiés avant leur utilisation. Ainsi, des pyramides de gènes R pourraient être développées alors que des souches de pathogènes virulentes contre une ou plusieurs de ces résistances pourraient déjà exister, ce qui réduirait alors les probabilités pour que cette pyramide de gènes soit durable. Une autre stratégie de pyramidage de gènes consiste à combiner des gènes R avec des QTL (*Quantitative Trait Loci*) ou des gènes de résistance quantitative (Mundt, 2018; Pilet-Nayel et al., 2017).

### La résistance quantitative est multigénique

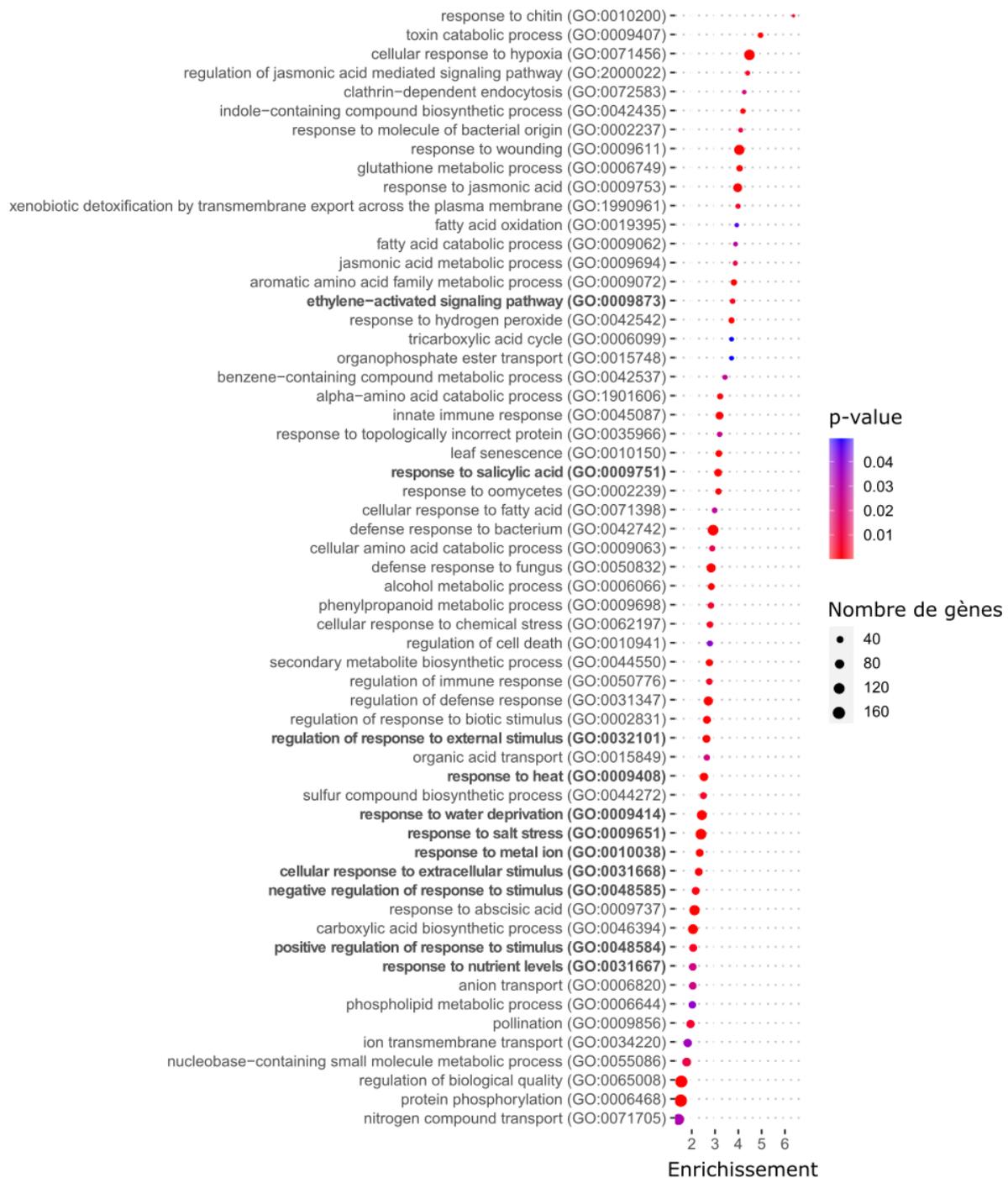
En absence de résistance complète, comme par exemple dans le cas de la défense face à un pathogène nécrotrophe, une distribution continue de phénotypes de résistance allant du plus sensible au plus résistant est observée au sein des populations végétales. Ainsi, alors qu'on parle de résistance qualitative pour l'ETI, on parle ici de résistance quantitative ou QDR. La QDR ne permet pas une résistance complète mais une réduction de la maladie. En effet la QDR réduit la multiplication du pathogène, la colonisation de la plante et/ou la sévérité des symptômes, mais ne les supprime pas complètement. La QDR est ainsi parfois appelée résistance incomplète, en opposition à la résistance complète (Poland et al., 2009). La distribution des phénotypes de QDR peut s'expliquer par l'implication d'une multitude de gènes. Suite à une infection par le pathogène nécrotrophe *S. sclerotiorum*, on observe une importante reprogrammation de l'expression des gènes, avec une moyenne de 32,4% des gènes différentiellement exprimés (DEG) en réponse au champignon pathogène *S. sclerotiorum* parmi six espèces différentes appartenant au groupe des Pentapetalae chez les angiospermes (Sucher et al., 2020). Une cartographie des QTL associés à la résistance à *S. sclerotiorum* chez le colza recense jusqu'à 30 loci distincts (Zhang et al., 2019). Parmi les gènes associés à la QDR, beaucoup ne sont pas dédiés spécifiquement à la défense de la plante mais remplissent des fonctions biologiques variées. Beaucoup sont pléiotropes et le contrôle fin de leur expression permet de réguler des processus biologiques autres que la défense. Par exemple, le gène *ARPC4* (*Actin-Related Protein Complex 4*) chez *A. thaliana* est impliqué dans la nucléation de l'actine. Une mutation KO (*Knock-Out*) dans le gène *ARPC4* entraîne à la fois une diminution de la résistance à *S. sclerotiorum* et des défauts morphologiques des cellules de la plante (Badet et al., 2018). Ainsi, on retrouve dans la QDR des gènes impliqués dans la défense ainsi que certains allèles de gènes impliqués dans la PTI avec par exemple *FLS2* (Dunning et al., 2007), des gènes impliqués dans la régulation des phytotoxines (Kliebenstein et al., 2005) mais aussi des gènes impliqués dans le développement de la plante (Badet et al., 2018; Collins et al., 1998) et beaucoup de gènes de fonction inconnue (Didelon et al., 2020).

Nous avons réalisé une étude préliminaire pour identifier les ontologies de gènes (GO) associées au climat enrichies en réponse à l'infection par *S. sclerotiorum*. Pour cela nous avons réalisé une analyse d'enrichissement en GO parmi les DEG en réponse à l'infection par *S. sclerotiorum*. Nous avons considéré comme DEG les gènes présentant un ratio d'expression dont le log2 de l'enrichissement (LFC) était supérieur à 1,5 et une erreur de premier ordre (p-

value) ajustée (correction de Benjamin-Hochberg) inférieure à 10%. Nous avons observé 11 GO pouvant être associées à la réponse aux stress abiotiques ou au climat parmi les GO enrichies pendant l'infection par *S. sclerotiorum* (**Figure 2**). Ces résultats suggèrent l'implication de gènes liés aux réponses à l'environnement abiotique dans la QDR.

### La résistance quantitative permet une plus grande durabilité de la résistance

La QDR est contrôlée par un grand nombre de gènes, existant souvent sous différentes formes alléliques, et ayant une faible contribution au phénotype de résistance global (Boyle et al., 2017). Cette caractéristique multigénique de la QDR implique une plus grande durabilité de la QDR dans le champ, en comparaison avec la résistance apportée par les gènes R (Parlevliet, 2002). Les effets apportés par un gène ou par un QTL peuvent être synergétiques et permettre une efficacité de la QDR proche de celle de la résistance complète (Singh et al., 2005). De plus, le contournement de la résistance apportée par un gène R est plus fréquent lorsque celui-ci est présent dans un fond génétique sensible que lorsqu'il est dans un fond génétique partiellement résistant (Palloix et al., 2009). Ainsi, la sélection de variétés possédant une combinaison d'allèles de gènes de la QDR augmentant la résistance ou leur association avec des gènes R (pyramidage de gènes) semble être une solution pour permettre une plus grande durabilité de la résistance des variétés cultivées à diverses pathogènes (Mundt, 2018; Pilet-Nayel et al., 2017). En effet, des expériences ont montré que la résistance à *L. maculans* apportée par le gène *Rml6* a une durabilité plus importante quand *Rml6* est intégré à un fond génétique partiellement résistant (résistance quantitative) que quand il est intégré à un fond génétique sensible. La résistance apportée par *Rml6* a été contournée en 3 ans dans le fond génétique partiellement résistant alors qu'elle a été contournée en 8 ans dans le fond génétique sensible (Brun et al., 2010; Delourme et al., 2014).



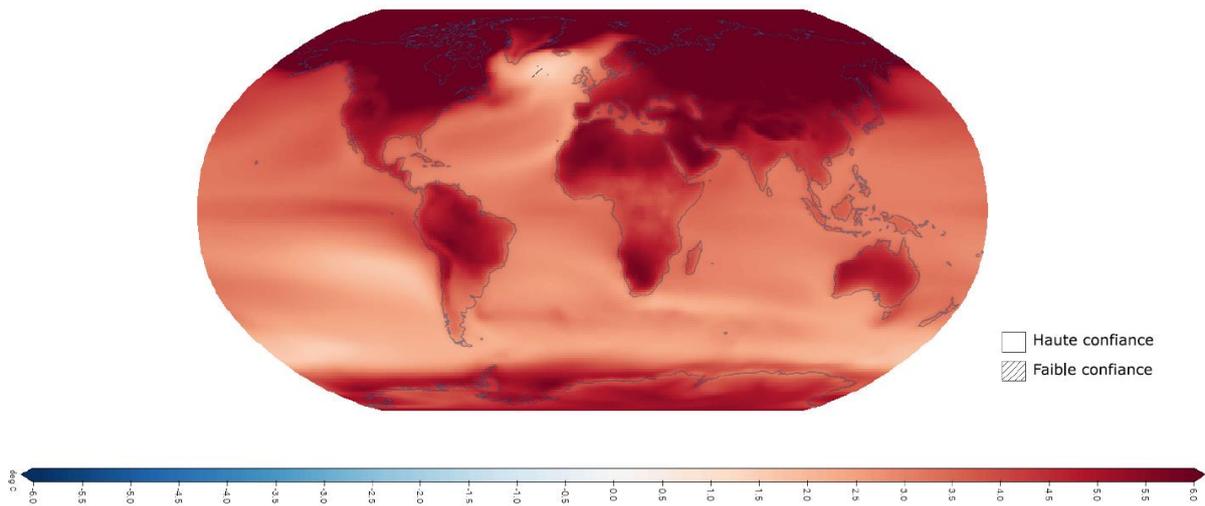
**Figure 2 : Des GO associés au climat sont retrouvés dans les GO enrichis en réponse à l'infection.** Analyse d'enrichissement en GO des DEG en réponse à l'infection *par S. sclerotiorum* grâce au système de classification PANTHER. La taille des points indique le nombre de gènes de la sélection associés à chaque GO, la couleur des points indique la p-valeur après correction par Bonferroni pour comparaisons multiples et en x est indiqué le taux d'enrichissement de chaque GO dans la sélection par rapport au génome d'*A. thaliana*. Les GO pouvant être associés aux stress abiotiques ou à la réponse au climat sont indiqués en gras.

## Les modifications climatiques à venir et leurs impacts sur les plantes cultivées

Le climat représente les caractéristiques statistiques de l'atmosphère terrestre dans une région donnée et pour une période donnée. Le climat d'une région est défini selon différents critères comme la température, les précipitations, la vitesse du vent, la pression atmosphérique, l'humidité ou encore l'ensoleillement. Ces caractéristiques climatiques créent un environnement abiotique affectant les plantes, les microorganismes et l'interaction entre les plantes et leurs pathogènes. Ceci est décrit par le « triangle des maladies » expliquant que pour qu'une maladie se développe chez les plantes, une plante sensible, un pathogène virulent et des conditions environnementales favorables au pathogène doivent être réunis. Si un de ces paramètres est défavorable, la maladie ne se développe pas. Afin de prévoir les impacts du réchauffement climatique, de nombreuses études évaluent les effets d'une modification des températures sur la résistance des plantes. Ces études permettent d'une part d'observer les différents impacts de la température sur la résistance et d'autre part d'améliorer notre compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans l'interaction entre la résistance et les températures. La combinaison de différentes modifications environnementales peut néanmoins avoir un impact plus complexe que l'addition des différents stress (Pandey et al., 2015; Zhang and Sonnewald, 2017). Ainsi, l'étude de l'impact de combinaisons de stress environnementaux sur la résistance est une approche complémentaire apportant une vision de l'impact d'un environnement complexe sur la résistance.

### La température globale de la Terre augmente depuis le XVIII<sup>ème</sup> siècle

Depuis la révolution industrielle, l'activité humaine rejette plus de gaz dans l'atmosphère, notamment de gaz à effet de serre. Ces émissions, couplées à d'autres activités humaines telles que la déforestation, ont mené à une modification du climat global de la Terre en à peine quelques décennies. Cette modification du climat se traduit principalement par un réchauffement de la température globale. Entre 2011 et 2020 la température globale de la Terre était 1,1°C plus élevée qu'entre 1850 et 1900 (+1,6°C pour les zones terrestres et +0,9°C pour les océans) (IPCC, 2021). Selon les prédictions, cette augmentation devrait continuer, voire s'intensifier, jusqu'à augmenter la température globale de la Terre de plusieurs degrés Celsius d'ici la fin du XXI<sup>ème</sup> siècle (**Figure 3**) (IPCC, 2021). Ce réchauffement climatique est à l'origine de nombreuses autres modifications climatiques. En effet, via des réactions en chaîne, l'augmentation de la température modifie le cycle de l'eau, le cycle du carbone, ainsi que la pression atmosphérique et les vents.



**Figure 3 : Prédiction des modifications de températures moyennes de surface pour 2081-2100.** Représentation des prédictions des modifications de températures moyennes de surface pour 2081-2100, comparé à 1995-2014, différence de °C, selon les prédictions du CMIP6 (scénario SSP5 8.5). Figure tirée de l’atlas interactif du GIEC (Groupe d’experts Intergouvernemental sur l’Evolution du Climat) : <https://interactive-atlas.ipcc.ch/>.

### Des températures élevées peuvent induire une réponse moléculaire importante chez les plantes

La majorité des plantes vasculaires ont un optimum de température de croissance se situant entre 10°C et 30°C (Nievola et al., 2017). Lorsque ces plantes sont exposées à des températures élevées (les études imposent en général une augmentation d’au moins 5°C au-dessus de leur optimum de croissance), une série de réactions moléculaires, cellulaires et physiologiques se mettent en place afin de permettre à la plante de survivre à ces conditions (Dinesh et al., 2016; Ruelland and Zachowski, 2010). Les hautes températures affectent les plantes de différentes manières en fonction de leur état de développement et de leur état reproductif. Une grande variabilité de susceptibilité à la chaleur est également retrouvée entre espèces et entre génotypes d’une même espèce (Barnabás et al., 2007; Sakata and Higashitani, 2008).

Les réactions physiologiques et moléculaires consécutives à une augmentation brutale de la température sont nombreuses et bien documentées dans la littérature (Bita and Gerats, 2013; Saidi et al., 2011; Wahid et al., 2007). A l’échelle physiologique, l’élévation des températures affecte différents processus tels que la photosynthèse, la respiration oxydative, le métabolisme, ainsi que les voies de signalisation des hormones (Allakhverdiev et al., 2008; Scafaro et al., 2021). L’augmentation de la température induit également l’augmentation de la transpiration menant à une réduction du potentiel hydrique dans les feuilles et les fleurs (Tsukaguchi et al., 2003). La reproduction sexuée et la floraison sont particulièrement affectées par les températures élevées (Barnabás et al., 2007; Hedhly et al., 2009; Thakur et al., 2010).

A l'échelle cellulaire, un des premiers évènements découlant d'une hausse de la température est l'augmentation de la fluidité et de la perméabilité de la membrane plasmique (Falcone et al., 2004; Murata and Los, 1997; Vigh et al., 1998). Cette modification de la membrane plasmique déclenche une cascade de signalisation impliquant une entrée de calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) dans la cellule (Gong et al., 1998; Liu et al., 2006; Saidi et al., 2009, 2011; Wu and Jinn, 2010) et menant à une régulation rapide de l'expression de facteurs de transcription et de protéines chaperonnes telles que les HSF et HSP (pour *Heat Shock Factor* et *Heat Shock Protein*) (**Figure 4**) (Baniwal et al., 2004; von Koskull-Döring et al., 2007). L'homéostasie des protéines est altérée lors de l'augmentation de la température (Maestri et al., 2002), et l'expression des HSP permet de limiter le mauvais repliement, une dénaturation ou une agrégation des protéines (Baniwal et al., 2004; Saidi et al., 2011). L'augmentation de la fluidité et de la perméabilité de la membrane plasmique entraîne également une réorganisation du cytosquelette, impactant d'une part la différenciation et l'élongation des cellules (Potters et al., 2009; Smertenko et al., 1997) et participant d'autre part à la cascade signalétique menant à l'expression des HSP (Suri and Dhindsa, 2008).

Suite à l'augmentation de la fluidité et de la perméabilité de la membrane plasmique provoquée par l'augmentation de la température, une production de dérivés actifs de l'oxygène (ROS) est initiée par les cellules végétales. Les ROS font partie de la cascade de signalisation permettant l'expression de HSP (Königshofer et al., 2008). Une production de phytohormones et de métabolites secondaires est également initiée (**Figure 4**). Les variations observées dans les taux de phytohormones montrent une augmentation de l'acide abscissique (ABA), l'acide salicylique (SA) et l'éthylène (ET). Une diminution est observée pour les cytokinines (CK), l'auxine (AIA) et les acides gibbérelliques (GA) (Larkindale and Huang, 2004, 2005; Talanova et al., 2003). En plus des phytohormones, des métabolites secondaires protecteurs et antioxydants sont produits. Il s'agit principalement de composés phénoliques tels que les flavonoïdes, les anthocyanes ou les stéroïdes (Maestri et al., 2002; Wahid et al., 2007).

L'augmentation de la température mène à une réorganisation majeure de l'expression des gènes. Après une augmentation graduelle de la température de 22°C à 45°C pendant 6h, 4100 gènes (soit 12,5 % du génome) sont différentiellement exprimés par rapport au contrôle à 22°C (au moins 2 fois plus exprimés que dans le contrôle) (Larkindale and Vierling, 2008). Parmi les transcrits les plus exprimés on retrouve approximativement un tiers de HSP ou autres protéines chaperonnes (Larkindale and Vierling, 2008).

### La réponse moléculaire au froid partage des voies de signalisation avec la réponse aux températures élevées.

Quand les plantes sont exposées à des températures inférieures à leur optimum de croissance, des symptômes tels qu'un ralentissement de la croissance, le flétrissement ou la chlorose peuvent être observés. L'exposition de plantes à des températures basses (hors gel) peut causer des altérations de processus physiologiques tels que la régulation du potentiel hydrique, la nutrition, le métabolisme, la photosynthèse et la respiration oxydative (Graham and Patterson, 1982; Levitt, 1980; Lukatkin et al., 2012). Le flétrissement observé chez les

plantes sensibles au froid est dû à une réduction de la capacité d'absorption d'eau des racines et à une altération de la fermeture des stomates, menant à une réduction du potentiel hydrique dans les feuilles (Bloom et al., 2004; Boese et al., 1997; Bolger et al., 1992; Pardossi et al., 1992; Wilkinson et al., 2001). En cas de gel, une nécrose peut être observée en addition des symptômes cités précédemment. Les deux principales sources de dégâts liés au gel sont la déshydratation cellulaire et la dégradation de la membrane (Thomashow, 1999; Yadav, 2010). La formation de glace dans l'espace intercellulaire entraîne un mouvement de l'eau du cytoplasme vers l'espace intercellulaire, menant à la déshydratation cellulaire. Au moment de la fonte, l'eau retourne rapidement dans les cellules et entraîne une lyse des membranes (Uemura and Steponkus, 1989).

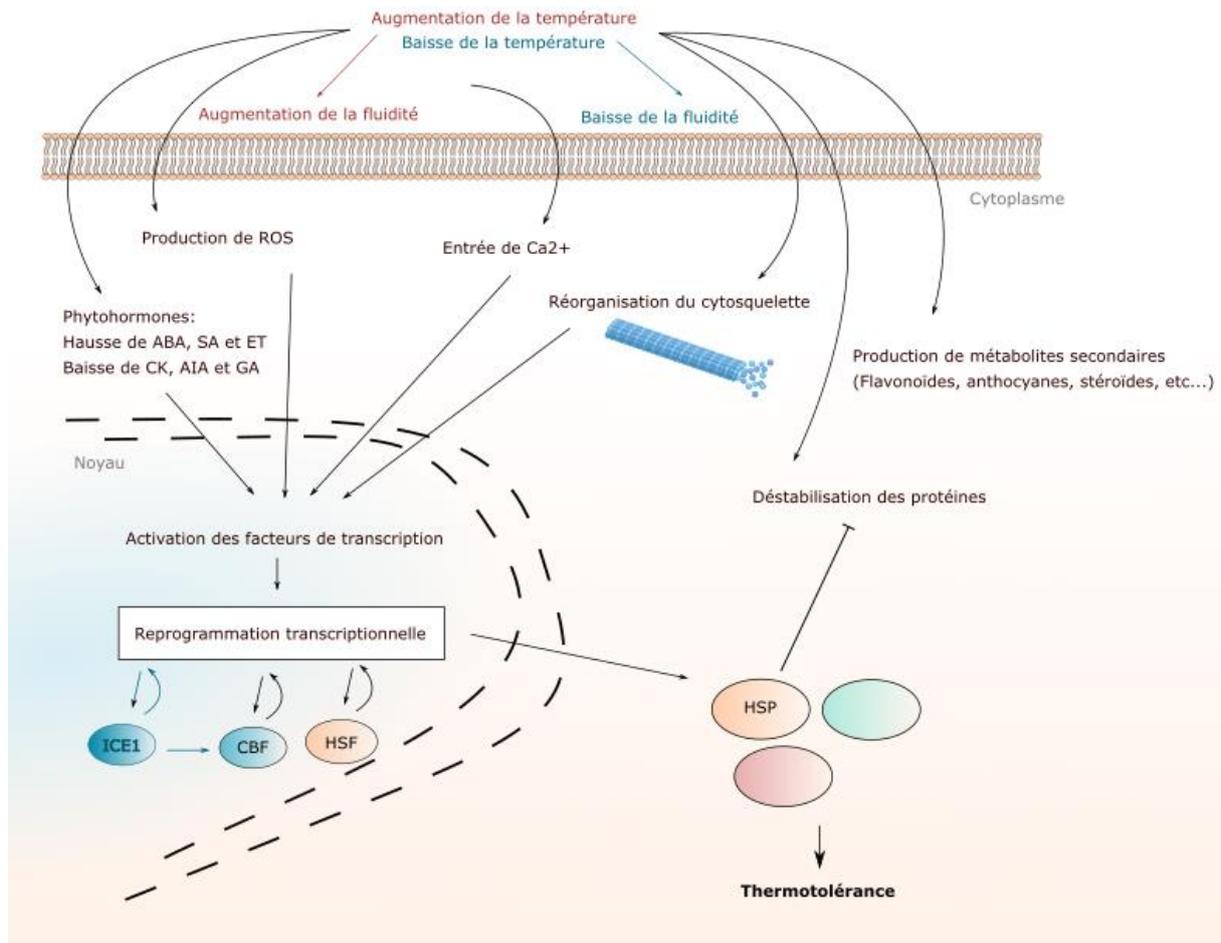
La réponse au froid partage également de nombreuses caractéristiques moléculaires avec la réponse aux températures élevées (**Figure 4**). En effet, les premières modifications cellulaires au froid concernent la rigidification de la membrane plasmique et une modification de l'organisation du cytosquelette (déstabilisation des micro-filaments d'actine) (**Figure 4**) (Örvar et al., 2000). Rapidement après ces modifications, une augmentation de la concentration de  $Ca^{2+}$  cytosolique a lieu (Knight and Knight, 2012; Knight et al., 1996, 1991; Plieth et al., 1999) ainsi qu'une production de ROS (Kocsy et al., 2001). La réponse des phytohormones au froid est également similaire à celle décrite en réponse aux températures élevées avec une augmentation du niveau de ABA, SA et ET, et une diminution de AIA, CK et GA (Kosová et al., 2012; Miura and Furumoto, 2013; Wightman, 1979).

L'activation de ces cascades de signalisation mène à une reprogrammation majeure de l'expression des gènes. En réponse à un traitement de 24h à 4°C on retrouve un nombre de DEG allant de 2926 (9 % du génome, LFC > |2|, q-value < 0.01) (Jia et al., 2016) à 4357 (13 % du génome, LFC > |2|, q-value < 0.05) (Yang et al., 2019) en fonction des critères de sélection des DEG. Parmi ces gènes, certains sont spécifiques de la réponse au froid dont les CBF (*C-repeat Binding Factor*) (Catalá et al., 2003; Doherty et al., 2009; Sangwan et al., 2001; Tähtiharju et al., 1997), et certaines HSP (Anderson et al., 1994; Krishna et al., 1995). Les CBF correspondent à plus de 12% du transcriptome en réponse au froid chez *A. thaliana* (Fowler and Thomashow, 2002). Le facteur de transcription ICE1 (*Inducer of CBF Expression 1*) est également un élément clé dans la réponse au froid et est nécessaire à l'acclimatation au froid chez *A. thaliana*. ICE1 permet l'activation de la transcription de gènes CBF et les mutants KO ICE1 sont fortement affectés dans leur acclimatation au froid (Chinnusamy et al., 2003).

La réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques est orchestrée par de nombreuses cascades de signalisation activant des facteurs de transcription et des gènes permettant la tolérance ou la résistance à ces stress. De nombreux acteurs de cette signalisation sont communs à une variété de stress. Les cascades de signalisation impliquant par exemple les phytohormones, les RONS (*Reactive Oxygen and Nitrogen Species*), les MAP kinases ou le  $Ca^{2+}$  sont retrouvées à la fois dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques. C'est également le cas de facteurs de transcription comme les WRKY, les AP2/ERF, les HSF ou les NAC (*No Apical Meristem*, ATAF1 et 2, *Cup-shaped cotyledon 2*) (Atkinson and Urwin, 2012; Ma and Bohnert, 2007; Zhang and Sonnewald, 2017). Etant donné la grande similarité des réponses à différents stress, des interférences sont possibles en présence de stress combinés.

Dans le cas de la stimulation des plantes par un stress abiotique préalable à une infection, les interférences peuvent diminuer ou augmenter la résistance de la plante au pathogène (Zhang and Sonnewald, 2017). L'exposition prolongée à des températures élevées d'une variété sensible d'orge augmente sa sensibilité à *Blumeria graminis* (Schwarczinger et al., 2021). Cependant, des plants de tomates en conditions de sécheresse présentent une réduction de l'infection par *B. cinerea* de 50 % (Achu et al., 2006). Ainsi, de nombreux éléments sont communs à la réponse des plantes aux différents stress, ce qui implique des interférences lors de stress combinés.

De nombreuses études nous permettent d'appréhender la réponse des plantes à des changements de températures. Cependant, la majorité des expériences étudient leur réponse à un « choc », c'est-à-dire à une variation rapide de la température, ou à des températures extrêmes, bien en dehors de leur optimum de croissance. Peu d'études permettent d'appréhender la réponse des plantes face à une variation graduelle des températures, comme prédit suite au réchauffement climatique (IPCC, 2021). Par ailleurs, les plantes sont souvent cultivées à une température unique, ne prenant pas en compte les variations naturelles de température entre le jour et la nuit. Ainsi, une approche de la culture des plantes en laboratoire se rapprochant plus de ce qui peut être retrouvé dans la nature, avec une différence de température entre le jour et la nuit similaire aux conditions météorologiques réelles, permettrait d'enrichir notre vision de la réponse des plantes aux changements climatiques à venir.



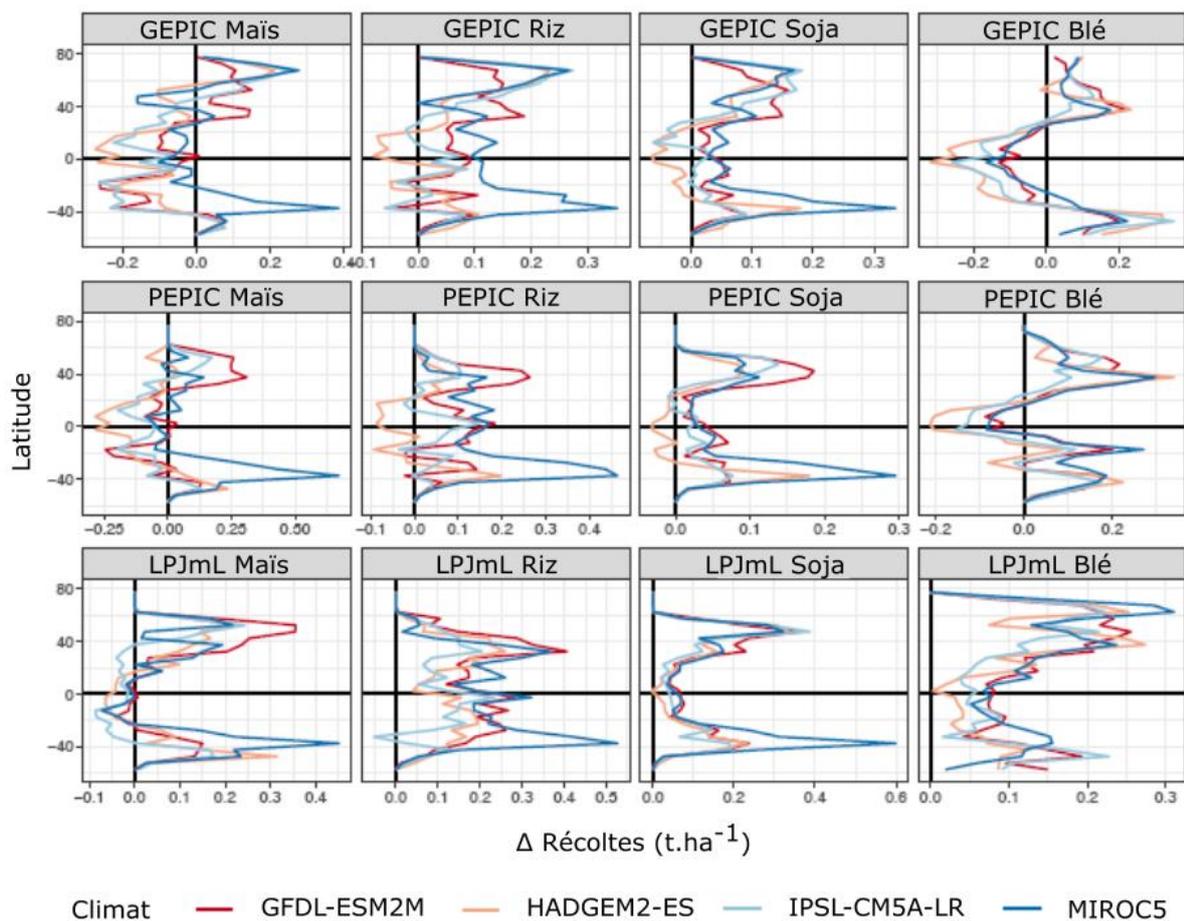
**Figure 4 : Les réponses aux modifications de la température présentent de nombreuses similarités.** Les informations indiquées en rouge correspondent uniquement à la réponse à une augmentation de la température, les informations indiquées en bleu correspondent uniquement à la réponse à une baisse de la température.

La modification des températures modifie le rendement des récoltes ainsi que le risque d'infection par des agents pathogènes

Les températures élevées peuvent modifier des mécanismes physiologiques tels que la photosynthèse, la respiration oxydative, le métabolisme, le remplissage des grains ou encore la germination du pollen (Allakhverdiev et al., 2008; Barlow et al., 2015; Djanaguiraman et al., 2018; Herrero and Johnson, 1980; Scafaro et al., 2021). De fait, l'augmentation de la température peut entraîner une perte de rendement des cultures. Cela a été observé par exemple dans le cas du maïs, du soja et du coton. Le rendement de ces cultures augmente jusqu'à des températures entre 29°C-32°C puis diminue très fortement au-delà (Schlenker and Roberts, 2009).

Les prédictions de rendement des cultures en fonction de différents modèles de réchauffement climatique pour la période de 2020 à 2070 ont estimé le rendement de 4

cultures majeures dans le futur : le maïs, le riz, le soja et le blé. Ces études prédisent une augmentation du rendement dans les hautes latitudes et une faible augmentation voire une diminution du rendement dans les faibles latitudes (**Figure 5**) (Chaloner et al., 2021; Ostberg et al., 2018; Rosenzweig et al., 2014). Cependant, ces données ne prennent pas en compte la modification de l'incidence et de la diversité des attaques de pathogènes due aux modifications climatiques. Chaloner *et al* a analysé le risque d'infection en fonction de la température pour 80 espèces de champignons et d'oomycètes pathogènes des cultures. Cette étude montre que l'augmentation du rendement des cultures sera accompagnée, pour la majorité des cultures étudiées, d'une augmentation du risque d'infection par ces pathogènes (Chaloner et al., 2021). De plus, les modifications climatiques entraînent un mouvement des niches géographiques des pathogènes vers les pôles (Bebber et al., 2013). Les prédictions



**Figure 5 : Prédictions de différences de récoltes entre 2020 et 2070 par latitude, culture et modèle de prédiction.** Comparaison entre les récoltes actuelles (moyenne des prédictions pour la période 2011-2030) et futures (moyenne pour la période 2061-2080) en tonnes par hectare, prédites par 3 modèles de prédiction (GEPIC, PEPIC et LPJmL) selon 4 modèles climatiques globaux (GMC) (GFDL-ESM2M, HADGEM2-ES, IPSL-CM5A-LR et MIROC5) en combinaison avec le RCP 6.0 (Representative Concentration Pathway). Les modèles de prédiction des cultures ne prennent pas en compte l'impact des pestes, des pathogènes ou des adventices. Figure adaptée de Chaloner et al., 2021.

annoncent ainsi une augmentation du risque d'infection et une modification des associations de pathogènes dues au réchauffement climatique. L'Europe, la Chine et le Pérou se positionnent comme les régions qui risquent de faire face à la plus grande quantité et au plus grand renouvellement de pathogènes (Chaloner et al., 2021).

### Une variation des températures modifie la défense des plantes.

De nombreuses études analysant la réponse des plantes à leur environnement biotique ou abiotique se concentrent sur la réponse de la plante à une seule de ces stimulations à la fois. Cependant, en dehors du laboratoire, les plantes sont fréquemment confrontées à des combinaisons de multiple facteurs biotiques et/ou abiotiques. Les mécanismes impliqués dans la réponse à une combinaison de facteurs sont plus complexes et différents d'une simple combinaison des mécanismes impliqués dans la réponse aux facteurs individuels (Pandey et al., 2015; Zhang and Sonnewald, 2017). Aussi, la réponse à une combinaison de facteurs peut être considérée comme un nouvel état de stress à part entière (Mittler, 2006). Suite à un stress combiné, la réponse transcriptionnelle de la plante est plus élevée (plus de DEG) qu'en réponse aux stress individuels. Elle est également spécifique et ne peut pas être prédite à partir des réponses aux stress individuels (Desaint et al., 2021; Prash and Sonnewald, 2013; Rasmussen et al., 2013; Zhang and Sonnewald, 2017). Un trait caractéristique de la réponse aux stress individuels ou combinés est cependant observé : une augmentation de l'expression de facteurs de transcription et de gènes répondant à l'environnement biotiques et/ou abiotique et une diminution de l'expression des gènes impliqués dans la photosynthèse et dans le métabolisme primaire (Desaint et al., 2021; Pandey et al., 2015; Rasmussen et al., 2013; Suzuki and Katano, 2018). Enfin, la réponse au stress combiné est en général plus proche de la réponse au stress le plus sévère ou au dernier stress appliqué (Desaint et al., 2021; Onaga et al., 2017).

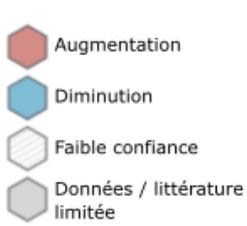
L'analyse de résultats provenant de 142 cas d'infection de plantes par des pathogènes associée à une élévation de la température montre que dans 55% des cas, l'élévation de la température entraîne une diminution ou une inhibition de la défense (Desaint et al., 2021). L'élévation de la température peut affecter tous les types de résistance (PTI, ETI ou QDR) mais les cas d'inhibition de la résistance concernent principalement l'ETI. Aoun et al. montrent qu'une augmentation de la température de 3°C (entre 27°C et 30°C) diminue la résistance moyenne de populations d'*A. thaliana* face à *Ralstonia solanacearum* (Aoun et al., 2017, 2020). Des études d'association pangénomique (GWAS pour *Genome-Wide Association Studies*) ont permis d'une part de montrer que le locus *RPS4/RRS1-R* (connu pour être impliqué dans la réponse à divers pathogènes dont *R. solanacearum* (Deslandes et al., 2002; Le Roux et al., 2015)) est le QTL majeur associé à la résistance à *R. solanacearum* à 27°C mais qu'il n'est pas détecté à 30°C (Aoun et al., 2017). D'autre part ces GWAS ont permis d'identifier le gène *SDS (SOLO DANCERS)* comme un gène de sensibilité à *R. solanacearum* à 30°C (Aoun et al., 2020).

Le froid a également un impact sur la défense des plantes. Les plantes ayant été acclimatées à des températures de 5 °C le jour et 2 °C la nuit présentent une augmentation de l'expression des gènes PR (*Pathogenesis-Related*) (Hon et al., 1995; Seo et al., 2008). Lors de

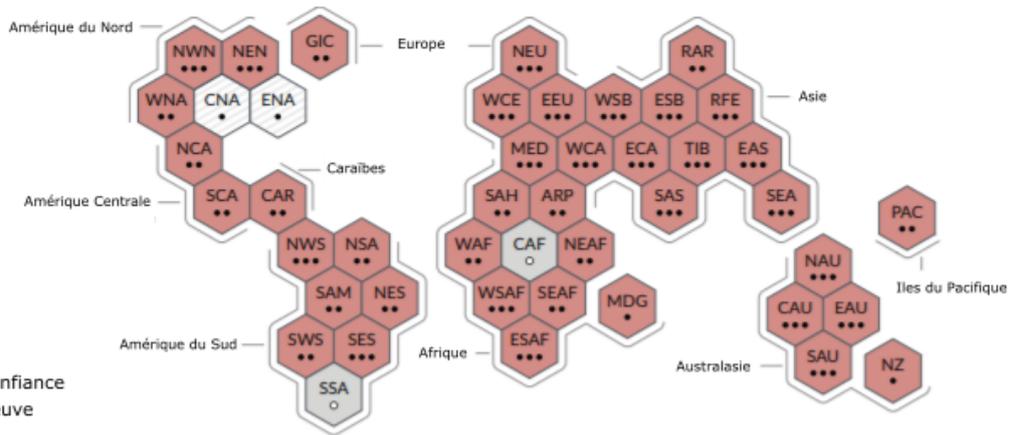
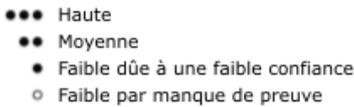
l'acclimatation au froid du blé d'hiver (2 °C), 17% des gènes induits sont des gènes impliqués dans la défense (Gaudet et al., 2003). L'induction de ces gènes de défense lors de l'acclimatation au froid peut expliquer l'augmentation de la résistance des plantes aux pathogènes lors de l'hivernage (Kuwabara and Imai, 2009). Parmi les gènes affectant les mécanismes de défense de la plante lors d'une exposition à des températures basses, on retrouve le facteur de transcription NTL6 de la famille des NAC (Seo et al., 2010). L'expression de NTL6 est induite après une exposition de 24 h à 4 °C (Kim et al., 2007b), la protéine est d'abord retrouvée dans une conformation dormante, liée à la membrane plasmique, avant d'être lysée en une forme plus courte, active et localisée dans le noyau (Seo et al., 2010). Sa localisation nucléaire lui permet d'activer la transcription de gènes PR, ce qui entraîne une augmentation de la résistance de la plante aux pathogènes. En effet, l'exposition à 4 °C pendant 3 jours d'une accession sauvage d'*A. thaliana* entraîne l'augmentation de sa résistance à l'infection par *P. syringae*. Les plantes présentant une réduction de l'expression de NTL6 montrent une résistance réduite à *P. syringae* après l'exposition au froid comparées au sauvage (Seo et al., 2010). De plus, la surexpression constitutive d'une forme tronquée (nucléaire) de NTL6 entraîne l'induction de l'expression des gènes PR1, PR2 et PR5 et une augmentation de la résistance à *P. syringae* à 23°C (Seo et al., 2010).

La température affecte donc tous les types de résistance, ETI, PTI ou QDR et semble avoir un impact majeur sur les mécanismes de défense mis en place par la plante en réponse aux pathogènes. Une meilleure compréhension de l'effet des variations de température sur les mécanismes de défense des plantes est donc fondamentale afin de permettre d'appréhender les effets du réchauffement climatique global.

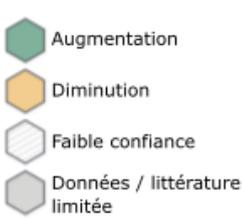
## A: Chaleurs extrêmes



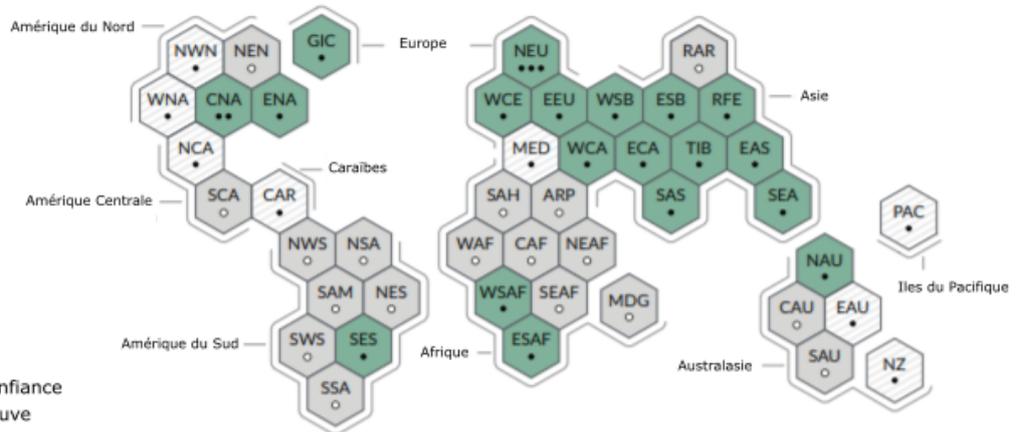
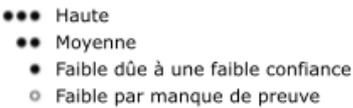
Contribution de l'Homme aux modifications observées:



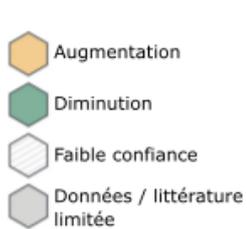
## B: Fortes précipitations



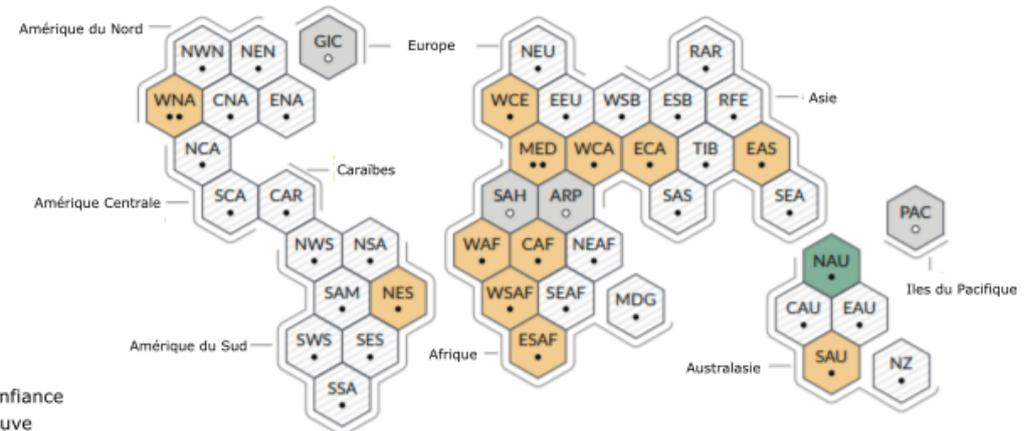
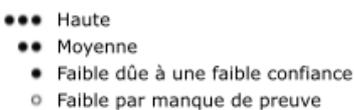
Contribution de l'Homme aux modifications observées:



## C: Episodes de sécheresse



Contribution de l'Homme aux modifications observées:



### Figure 6 : Observation des effets du changement climatique entre 1950 et aujourd'hui.

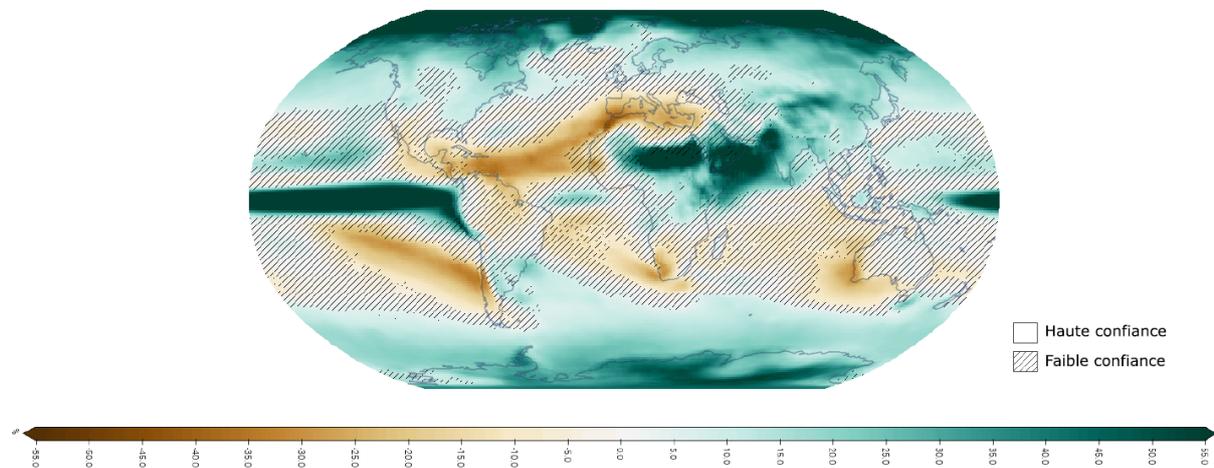
Les régions de référence du groupe de travail I du 6<sup>ème</sup> rapport du GIEC (IPCC AR6 WGI) sont représentés sous la forme d'hexagones de taille égale en leur position géographique approximative. Les acronymes régionaux sont indiqués ci-dessous. Chaque évaluation a été réalisée pour chaque région des années 1950 à aujourd'hui. Les hexagones blancs et gris indiquent des régions pour lesquelles il y a peu de confiance en le type de changement observé. Les hexagones d'autres couleurs indiquent des régions pour lesquelles il y a au moins une confiance moyenne dans le type de changement observé. Le niveau de confiance attribué à la contribution de l'Homme aux changements observés est indiqué par un nombre de points : 3 points pour une forte confiance, 2 points pour une confiance moyenne et 1 point pour une faible confiance. A : Représentation des changements pour les fortes températures. Les observations sont basées sur les températures maximales journalières, ainsi que sur d'autres indicateurs tels que la durée des périodes de fortes températures, leur fréquence et leur intensité à un niveau régional. B : Représentation des changements pour les événements de fortes précipitations. Les observations sont basées sur les quantités de précipitations observées sur un jour ou sur 5 jours, via des études régionales et globales. C : Représentation des changements pour les épisodes de sécheresse. Les estimations sont basées sur les observations et les simulations de changements pour la colonne totale de l'humidité du sol, complétées par les observations de changements pour l'humidité du sol en surface et de l'équilibre entre les précipitations et l'évapotranspiration. Régions de référence de l'IPCC AR6 WGI : NWN (Nord-ouest de l'Amérique du Nord), NEN (Nord-est de l'Amérique du Nord), WNA (Ouest de l'Amérique du Nord), CNA (Centre de l'Amérique du Nord), ENA (Est de l'Amérique du Nord), NCA (Nord de l'Amérique Centrale), SCA (Sud de l'Amérique Centrale), CAR (Caraïbes), NWS (Nord-ouest de l'Amérique du Sud), NSA (Nord de l'Amérique du Sud), NES (Nord-est de l'Amérique du Sud), SAM (Région des moussons de l'Amérique du Sud), SWS (Sud-ouest de l'Amérique du Sud), SES (Sud-est de l'Amérique du Sud), SSA (Sud de l'Amérique du Sud), GIC (Groenland et Islande), NEU (Europe du Nord), WCE (Europe Centrale et de l'Ouest), EEU (Europe de l'Est), MED (Méditerranée), SAH (Sahara), WAF (Afrique de l'Ouest), CAF (Afrique Centrale), NEAF (Nord-est de l'Afrique), SEAF (Sud-est de l'Afrique), WSAF (Sud-ouest de l'Afrique), ESAF (Sud-est de l'Afrique), MDG (Madagascar), RAR (Arctique russe), WSB (Ouest de la Sibérie), ESB (Est de la Sibérie), RFE (Extrême-Orient russe), WCA (Ouest et centre de l'Asie), ECA (Est et centre de l'Asie), TIB (Plateau tibétain), EAS (Asie de l'Est), ARP (Péninsule arabique), SAS (Asie du Sud), SEA (Asie du Sud-Est), NAU (Australie du Nord), CAU (Australie Centrale), EAU (Australie de l'Est), SAU (Australie du Sud), NZ (Nouvelle-Zélande), PAC (Petites îles du Pacifique).

### Le cycle de l'eau devrait s'intensifier avec le réchauffement climatique.

Le cycle de l'eau, ou cycle hydrologique, décrit le mouvement perpétuel de l'eau sur Terre sous ses différentes formes, liquide, vapeur, solide et à travers différents réservoirs tels que les océans, la cryosphère, le sol et l'atmosphère. L'eau qui s'évapore de l'océan se retrouve sous forme de vapeur dans l'atmosphère avant de se condenser dans les nuages et de retomber sur terre sous la forme de précipitations liquides ou solides (pluie ou neige). L'eau est essentielle aux plantes et plus globalement à la vie sur Terre. C'est grâce à ce cycle qu'elle est rendue disponible aux organismes vivants.

Cependant, le réchauffement climatique modifie le cycle de l'eau. Certaines de ces modifications sont déjà visibles aujourd'hui. On observe une augmentation globale des fortes précipitations et des événements de sécheresse (**Figure 6**). Dans certaines régions, comme l'Europe de l'Ouest et l'Europe centrale, l'est de l'Afrique australe et l'Asie de l'Est, on observe une augmentation à la fois des températures, des fortes précipitations et des événements de sécheresse depuis 1950 (**Figure 6**) (IPCC, 2021).

Selon les prédictions des modèles climatiques du CMIP6 (IPCC, 2021), le cycle de l'eau va s'intensifier dans le futur, avec une grande variabilité entre les saisons et les années. La quantité de précipitations globales va augmenter (1-3% supplémentaires par degré Celsius de réchauffement (IPCC, 2014, Collins et al, 2013)), mais de manière non uniforme. Une très forte augmentation des précipitations annuelles est prévue dans des régions comme les hautes latitudes, le Pacifique équatorial ou une partie de la région des moussons, tandis qu'une très forte diminution des précipitations annuelles est prévue dans les tropiques et les subtropiques, avec une variation en fonction des périodes de l'année (**Figure 7**) (IPCC, 2021).



**Figure 7 : Prédiction des modifications de précipitations annuelles pour 2081-2100.** Représentation des prédictions des modifications de précipitations annuelles pour 2081-2100, comparé à 1995-2014, en pourcentage, selon les prédictions du CMIP6 (scénario SSP5 8.5). Figure tirée de l'atlas interactif du GIEC : <https://interactive-atlas.ipcc.ch/>.

### Effet de l'eau et de l'humidité sur l'infection

Suite aux modifications du cycle de l'eau dues au réchauffement climatique, les prédictions annoncent une fréquence accrue des épisodes prolongés de sécheresse ou de fortes précipitations (Wetherald and Manabe, 2002). Ces événements de sécheresse et de fortes précipitations vont influencer les interactions entre les plantes et leurs pathogènes (Aung et al., 2018). D'abord, l'humidité atmosphérique et la disponibilité de l'eau sur la surface des feuilles sont des facteurs favorisant la germination et la dispersion des spores et les épidémies de champignons filamenteux pathogènes (Huber and Gillespie, 1992; Talley et al., 2002). Des variations de l'humidité relative atmosphérique et des événements pluvieux favorisent la dispersion des spores du champignon *Botrytis cinerea* (Jarvis, 1962). L'humidité et les événements pluvieux peuvent également favoriser les épidémies de *S. sclerotiorum* qui a besoin d'eau disponible à la surface des feuilles pour permettre la germination de ses spores et la propagation de l'infection (Abawi and Grogan, 1975). Si la feuille s'assèche pendant l'infection, alors la propagation du champignon s'arrête (Abawi and Grogan, 1975).

Par ailleurs, les stomates sont des points d'entrée des pathogènes dans les feuilles (Melotto et al., 2006). Les cellules des stomates, les cellules de garde, ont évolué en développant des mécanismes de reconnaissance des PAMP (Arnaud and Hwang, 2015). La reconnaissance des pathogènes via les PAMP déclenche une cascade de signalisation menant

à la fermeture des stomates visant à limiter l'entrée des pathogènes (Melotto et al., 2017). Certains pathogènes ont développé des mécanismes ou des molécules permettant de manipuler l'ouverture des stomates, comme par exemple l'acide oxalique produit par *S. sclerotiorum* (Guimarães and Stotz, 2004; Melotto et al., 2017). Cependant, l'ouverture des stomates est également induite par une forte humidité atmosphérique via l'activation du catabolisme de l'ABA, phytohormone connue pour induire la fermeture des stomates (Melotto et al., 2017; Okamoto et al., 2009). Ainsi, les épisodes prolongés de fortes précipitations dus au réchauffement climatique global pourraient favoriser l'entrée des pathogènes dans l'apoplaste par les stomates en favorisant leur ouverture via une augmentation de l'humidité atmosphérique.

De plus, il a été montré qu'une forte humidité atmosphérique peut retarder la HR associée à l'ETI. En effet, les tomates exprimant les gènes R Cf-4 ou Cf-9 et reconnaissant les facteurs d'avirulence Avr4 ou Avr9 du champignon pathogène *Cladosporium fulvum* présentent une HR retardée et diminuée dans des conditions d'humidité atmosphérique élevée (95%) (Wang et al., 2005). La HR est même supprimée quand les conditions de forte humidité atmosphérique sont associées à une température élevée (32°C) (Wang et al., 2005). Ainsi, comme la température, une forte humidité atmosphérique peut avoir un effet suppresseur sur l'ETI.

Enfin, la sécheresse a également un impact sur la défense des plantes face à leurs pathogènes (Aung et al., 2018). En effet, il a été montré qu'un épisode de sécheresse peut avoir des effets antagonistes sur la résistance. La sécheresse peut augmenter la résistance du pois chiche aux pathogènes *Pseudomonas syringae* pv. phaseolicola et *R. solanacearum* (Sinha et al., 2016) ou rendre le riz plus sensible à l'infection par *Magnaporthe oryzae* en affectant la PTI et l'ETI (Bidzinski et al., 2016). Ainsi, tandis que les précipitations et une forte humidité atmosphérique semblent favoriser les infections et diminuer l'efficacité des mécanismes de défense des plantes, la sécheresse semble avoir un effet plus contrasté avec un impact différent en fonction du pathosystème observé.

## Le réchauffement climatique affecte l'intensité du vent, source majeure de sollicitations mécaniques

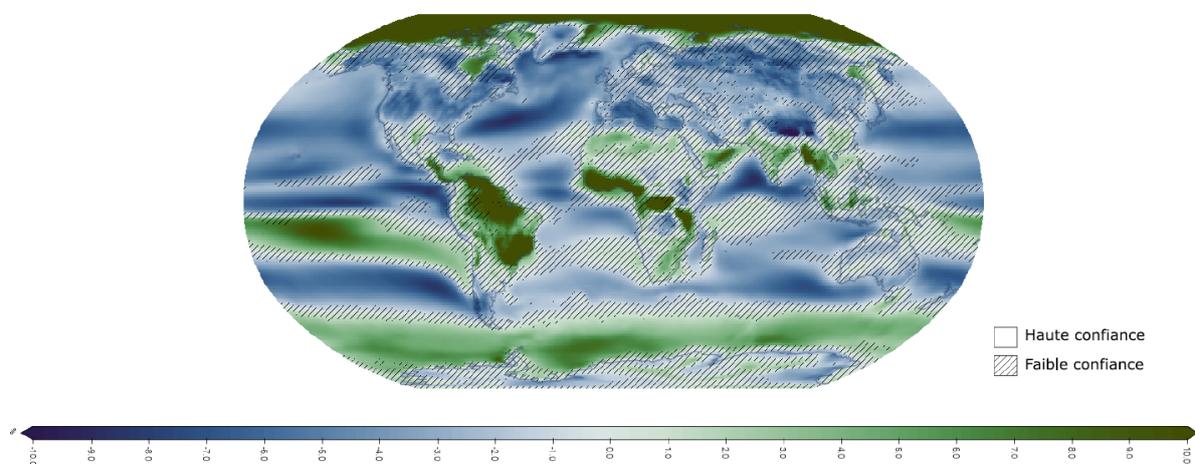
### Les variations de températures atmosphériques sont à l'origine du vent

Le vent est un phénomène d'origine thermique qui atténue les hétérogénéités spatiales de température. La formation d'une cellule de vent est qualitativement bien décrite par la loi des gaz parfaits ( $P.V \simeq T$ , avec P la pression, V le volume et T la température de l'air). La formation de la cellule de vent s'initie dans une zone de haute température au sol. L'air chaud, moins dense, s'élève à une hauteur d'équilibre située entre 10 et 20 km du sol provoquant une diminution locale de la pression. En altitude, l'air se refroidit et s'étend spatialement. Plus dense, l'air froid redescend formant au sol une zone de température plus basse et de plus haute pression distante de la zone d'initiation. Il en résulte un déséquilibre thermodynamique entre ces deux zones. Il se forme alors un écoulement d'air dirigé de la zone de haute pression (et basse température) vers la zone de basse pression (et haute

température) qui permet le retour à l'équilibre (température et pression identiques dans les deux zones).

### Les prédictions pour le futur

La vitesse moyenne du vent à la surface de la Terre est actuellement inférieure à  $36 \text{ km.h}^{-1}$ . Il existe cependant une grande disparité avec des zones beaucoup plus venteuses que d'autres. Cette disparité peut être expliquée par de nombreux paramètres tels que la longitude, la latitude, le relief, l'altitude, etc. Le changement climatique, lié à une modification des températures à la surface de la Terre, aura donc également un impact sur le vent. Cependant les prédictions sur les variations de la vitesse du vent sont plutôt incertaines comparées à celles sur les températures de surface. Il n'est pas rare que différentes simulations proposent des comportements opposés. Toutefois, selon le modèle CMIP6, on peut s'attendre à une augmentation de la vitesse du vent en Amérique du Sud et dans l'ouest de l'Afrique et à une diminution en Europe de l'Ouest (**Figure 8**) (IPCC, 2021).



**Figure 8 : Prédiction des modifications des vents de surface pour 2081-2100.** Représentation des prédictions des modifications des vents de surface pour 2081-2100, comparé à 1995-2014, en pourcentage, selon les prédictions du CMIP6 (scénario SSP5 8.5). Figure tirée de l'atlas interactif du GIEC : <https://interactive-atlas.ipcc.ch/> .

### Effet du vent sur les plantes et leurs pathogènes

Les interactions plantes-vent couvrent un champ de mécanismes large, allant des effets thermiques sur une feuille jusqu'à la dispersion des graines sur de longues trajectoires (de Langre, 2008). Le vent affecte notamment la photosynthèse de différentes manières. Par exemple, les oscillations du plan d'une feuille causées par le vent, réduisent l'interception de la lumière par les feuilles les plus exposées et simultanément laisse passer la lumière jusqu'aux feuilles les moins exposées, à l'intérieur de la canopée (Roden, 2003). Le vent peut également avoir un impact sur la morphologie des plantes, c'est ce qu'on appelle la thigmomorphogénèse. Par exemple, la tige d'une plante stimulée mécaniquement sera plus

petite qu'une plante non stimulée (Jaffe, 1973), une légère courbure de la tige d'une tomate pendant 30 secondes arrête sa croissance pendant environ une heure (Coutand and Moulia, 2000) et les branches d'un arbre exposé au vent sont plus épaisses (Watt et al., 2005) et ses racines sont plus denses et asymétriques (Tamasi et al., 2005). De plus, le vent est un des mécanismes majeurs permettant la dispersion des spores des champignons et des pollens (McCartney, 1994). Certains champignons ont même développé des mécanismes actifs permettant de relâcher leurs spores au-delà des couches d'air statiques proches de la surface des plantes. C'est par exemple le cas de *S. sclerotiorum* dont les spores sont éjectées à plusieurs cm au-dessus des apothécies (Hartill and Underhill, 1976; McCartney, 1994; Roper et al., 2010). Enfin, des travaux dans l'équipe montrent que la mécanoperception (la perception des signaux mécaniques) module fortement le niveau de la résistance immunitaire d'*A. thaliana* face au champignon nécrotrophe *S. sclerotiorum* (Léger et al., 2021). Le vent étant une des sources de stimulations mécaniques majeures dans l'environnement, il est probable qu'il modifie fortement le niveau de résistance des plantes.

## Sclerotinia sclerotiorum, champignon pathogène nécrotrophe à large spectre d'hôte

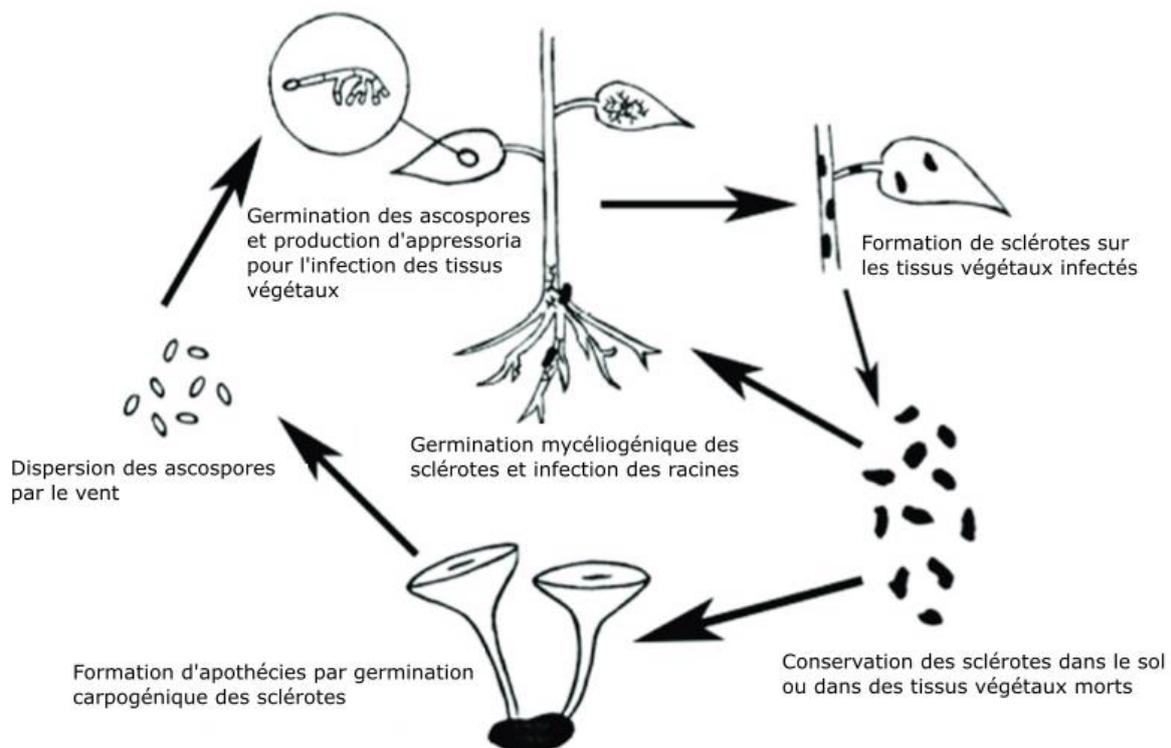
*Sclerotinia sclerotiorum* est un champignon pathogène nécrotrophe à l'origine de la maladie cryptogamique appelée pourriture blanche ou pourriture du collet. *S. sclerotiorum* fait partie des pathogènes de plantes infectant le plus d'espèces différentes (Derbyshire et al., 2017; Navaud et al., 2018). En effet, *S. sclerotiorum* est capable d'infecter plus de 400 espèces différentes dont plusieurs de haut intérêt agronomique telles que le soja, le colza, le tournesol, la laitue, la carotte ... (Boland, 1994; Purdy, 1979). Chaque année, *S. sclerotiorum* cause d'importantes pertes de rendement, notamment dans les champs de colza dont il est une des principales causes de maladie. Ces pertes peuvent aller jusqu'à 15q/ha, soit près de la moitié de la récolte. Chez les plantes malades, infectées par *S. sclerotiorum*, on peut observer des lésions gorgées d'eau sur les feuilles. Ces lésions s'étendent rapidement et descendent par le pétiole jusque dans la tige. Elles deviennent ensuite des tissus nécrotiques qui est colonisé par du mycélium blanc et duveteux de *S. sclerotiorum* avec souvent une production de sclérotés noirs (Bolton et al., 2006) (**Figure 9**).

### Description du cycle d'infection par *S. sclerotiorum*

*S. sclerotiorum* tient son nom des agrégats d'hyphes que le champignon forme, appelés sclérotés. Les sclérotés permettent la survie à long-terme du champignon (Willettts and Wong, 1980) et sont capables de rester viables jusqu'à 8 ans dans le sol (Adams and Ayers, 1979). Lorsque des conditions environnementales favorables sont réunies (voir paragraphe suivant), les sclérotés peuvent germer et initier le cycle d'infection. En fonction de ces conditions environnementales, les sclérotés peuvent germer de façon carpogénique ou mycéliogénique. Les sclérotés qui germent de manière mycéliogénique produisent des hyphes qui peuvent directement attaquer les tissus végétaux (Bardin and Huang, 2001; Le Tourneau, 1979). L'infection par ce type de germination n'est possible que sur certaines espèces de plantes comme le tournesol ou certains légumes pour lesquels le mycélium infecte directement des tissus racinaires sensibles (Bolton et al., 2006). Les sclérotés qui germent de manière carpogénique développent des apothécies qui produisent des ascospores. Emportées par le vent, les ascospores peuvent infecter les parties aériennes des plantes (Bolton et al., 2006). Le plus souvent, la maladie est initiée par une production d'ascospores (Abawi and Grogan, 1979; Schwartz and Steadman, 1978; Steadman, 1979). Cependant, bien que les ascospores soient capables de germer sur un tissu végétal sain, ils ne peuvent pas infecter la plante sans source exogène de nutriments et une surface recouverte d'un film d'eau. C'est pourquoi, les ascospores germent en général sur des tissus déjà nécrosés ou sénescents (comme les pétales d'une fleur morte, par exemple (Bolton et al., 2006; Inglis and Boland, 1990)), apportant une source de nutriments suffisante pour permettre l'infection de la plante (Abawi and Grogan, 1979; Bolton et al., 2006; Lumsden, 1979).

Une fois que l'ascospore a germé, le mycélium peut pénétrer le tissu de la plante hôte en utilisant des enzymes de dégradation de la paroi, la pression mécanique (Sanati Nezhad

and Geitmann, 2013) via les appressoria (différenciation de l'hyphe permettant la pénétration des tissus) ou en s'infiltrant à travers les stomates (Bolton et al., 2006; Lumsden, 1979). L'OA est un facteur de virulence majeur de *S. sclerotiorum* et affaiblit les défenses de la plante de multiples manières. L'OA cause la production de ROS (Cessna et al., 2000), modifie l'environnement redox (Williams et al., 2011), le pH (Favaron et al., 2005) et chélate le calcium (Heller and Witt-Geiges, 2013). Via ces processus, l'OA initie la mort cellulaire programmée des cellules végétales (Kim et al., 2008), active des enzymes capables de dégrader la paroi cellulaire (Favaron et al., 2005) et de déréguler les cellules de garde (Guimarães and Stotz, 2004).



**Figure 9 : Cycle de vie de *S. sclerotiorum*.** Les sclérotés sont la forme dormante de *S. sclerotiorum*. Leur germination mène à la formation d'hyphes ou d'apothécies. Les apothécies sont les organes permettant la formation et la dispersion des ascospores. Les tissus végétaux infectés sont un support pour la formation de nouveaux sclérotés.

L'infection par *S. sclerotiorum* peut avoir lieu à différentes températures mais nécessite une humidité très élevée.

*S. sclerotiorum* présente une répartition géographique très large. Un grand nombre de pays de tous les continents ont rapporté sa présence mais il reste plus représenté dans les régions tempérées (Purdy, 1979). *S. sclerotiorum* présente une température optimale de croissance autour de 20°C mais peut se manifester à des températures allant de 4°C à 30°C (Berg and Lentz, 1968; Willetts and Wong, 1980). L'humidité est également un facteur très

important dans l'infection par *S. sclerotiorum*. Des expériences sur le haricot commun (*Phaseolus vulgaris*) ont montré qu'une humidité relative très élevée (proche de 100%) n'était pas suffisante pour démarrer l'infection des feuilles de haricot à partir d'ascospores (Abawi and Grogan, 1975). La surface entre l'inoculum de *S. sclerotiorum* et le tissu végétal doit être maintenu humide pendant approximativement 48h à 72h pour que l'infection puisse démarrer et progresser. Si la feuille s'assèche pendant l'infection, la progression de la lésion s'arrête et la feuille doit à nouveau être humidifiée pendant 48 à 72h pour que l'infection reprenne (Abawi and Grogan, 1975).

*S. sclerotiorum* est capable d'initier l'infection au niveau des racines de certaines plantes telles que le tournesol et certains légumes, grâce à une germination mycéliogénique des sclérotés présents dans le sol (Bardin and Huang, 2001; Le Tourneau, 1979). La germination mycéliogénique, et le flétrissement du tournesol causé par *S. sclerotiorum* infectant les racines, sont plus fréquents quand les sclérotés présents dans le sol ont été endommagés mécaniquement (Huang and Kozub, 1990). La germination mycéliogénique des sclérotés est favorisée quand les sclérotés ont été produits à des températures élevées (20-25°C) et qu'ils ont été soumis à un séchage par dessiccation avant d'être incubés dans des conditions de très forte humidité relative (Huang et al., 1998). Les auteurs suggèrent que la germination mycéliogénique observée est due aux dommages causés à la partie externe du sclérote durant le séchage intensif. Ces dommages causeraient un relargage de nutriments permettant la croissance des hyphes. Ainsi, une grande sécheresse des sols, comme prédite suite au changement climatique, pourrait favoriser la germination mycéliogénique de *S. sclerotiorum*.

Cependant, la majorité des maladies causées par *S. sclerotiorum* est initiée au niveau des parties aériennes de la plante. Ceci est causé par les ascospores produits par les apothécies issues de la germination carpogénique des sclérotés. L'humidité et la température sont des facteurs environnementaux importants pour la germination carpogénique des sclérotés et la production des ascospores. La germination carpogénique a lieu dans des sols très humides, sans être saturés en eau (Hao et al., 2003). Beaucoup de températures optimales pour la germination carpogénique des sclérotés ont été décrites, allant de 7°C à 20°C (Phillips, 1987). La grande variation de températures optimales observées pour la germination carpogénique peut être expliquée par les origines géographiques des isolats de *S. sclerotiorum* et par la température à laquelle les sclérotés ont été produits. En effet, lorsque les sclérotés sont produits à des températures relativement froides (10°C), les sclérotés issus d'isolats provenant de régions froides produisent facilement des apothécies tandis que les sclérotés issus d'isolats provenant de régions chaudes ne produisent pas ou peu d'apothécies. Lorsque les sclérotés sont produits à des températures plus élevées (25°C), les isolats de régions chaudes produisent plus facilement des apothécies qu'une partie des isolats de régions froides (Huang and Kozub, 1991). Ainsi, les températures ont un impact sur la germination carpogénique de *S. sclerotiorum* et une variation de celles-ci pourrait avoir un impact sur la capacité de *S. sclerotiorum* à produire des ascospores.

La réponse des plantes à l'infection par *S. sclerotiorum* est complexe et implique divers mécanismes de l'immunité.

#### La perception de *S. sclerotiorum* par les plantes lors de l'infection

La perception des pathogènes ou de l'infection est cruciale pour permettre la mise en place des différents mécanismes de défense de la plante. Lors de l'infection, les pathogènes produisent des PAMP ou libèrent des DAMP qui sont reconnus par des récepteurs de la plante afin de déclencher la PTI. Pendant l'infection, *S. sclerotiorum* produit des divers éliciteurs et enzymes, acteurs de sa virulence. Un des facteurs de virulence principaux de *S. sclerotiorum* est l'acide oxalique. L'acide oxalique interfère de différentes manières avec les mécanismes de défense de la plante, induit la mort cellulaire programmée des cellules végétales, dérégule les cellules de garde et modifie le niveau de calcium du site d'infection pour éviter des concentrations toxiques pour *S. sclerotiorum* (Cessna et al., 2000; Guimarães and Stotz, 2004; Heller and Witt-Geiges, 2013; Kim et al., 2008; Marciano et al., 1983; Williams et al., 2011). L'acide oxalique fait également drastiquement baisser le pH du site d'infection, procurant ainsi les conditions optimales pour l'activité des polygalacturonidases et autres enzymes de dégradation de la paroi des cellules végétales (Favaron et al., 2005). Typiquement, lors de la dégradation de la paroi par des pathogènes comme *B. cinerea*, des oligogalacturonides sont libérés (Ferrari et al., 2013). Ces DAMP sont reconnus par le récepteur WAK1 (*Wall Associated Kinase 1*) (Brutus et al., 2010; Wang et al., 2019b). La reconnaissance des oligogalacturonides par WAK1 déclenche la PTI.

*S. sclerotiorum* produit également d'autres éliciteurs comme SCFE1 (*Sclerotinia Culture Filtrate Elicitor 1*) (Zhang et al., 2013), HRE (*Heat-Released Elicitor*) (Bertinetti and Ugalde, 1996), SsCut (une cutinase) (Zhang et al., 2014) ou SsSm1 (une protéine de la famille des cerato-platanines (CP)) (Pan et al., 2018). L'éliciteur SCFE1 est reconnu par un récepteur transmembranaire chez *A. thaliana* appelé RLP30 (*Receptor-Like Protein 30*). La reconnaissance de SCFE1 par RLP30 entraîne l'induction de la PTI (Zhang et al., 2013). Cette réponse est cependant quantitative, un continuum de phénotypes est observé dans la production d'éthylène en réponse à SCFE1 parmi différentes accessions d'*A. thaliana* (Zhang et al., 2013). Par ailleurs, la chitine, composant majeur de la paroi cellulaire de *S. sclerotiorum*, est reconnu spécifiquement par le récepteur AtCERK1 chez *A. thaliana* (Liu et al., 2012; Miya et al., 2007; Petutschnig et al., 2010; Shinya et al., 2012; Wan et al., 2008). VmE02 est un autre PAMP retrouvé chez *S. sclerotiorum*. Un prétraitement avec VmE02 augmente la résistance de *N. benthamiana* à *S. sclerotiorum* (Nie et al., 2019). Ainsi, la perception de l'infection par *S. sclerotiorum* est en partie modulée par des PAMP ou des DAMP menant à l'induction des mécanismes de défense liés à la PTI.

#### La perception mécanique de *S. sclerotiorum* par les cellules végétales déclenche des mécanismes de défense : la thigmoimmunité

La perception de *S. sclerotiorum* par la plante hôte ne se fait pas uniquement par la perception d'éliciteurs ou de DAMP. En effet, de récents travaux réalisés dans l'équipe montrent que la perception des signaux mécaniques de l'infection par *S. sclerotiorum* déclenche des mécanismes de défense. La mise en place des mécanismes de défense suite à

la mécanoperception de l'infection est appelée thigmoimmunité. La thigmoimmunité diffère de l'ETI ou de la PTI par la nature non moléculaire des signaux qui l'activent. Lors de l'infection, *S. sclerotiorum* crée un relâchement partiel de la paroi des cellules végétales à travers l'activité des enzymes de dégradation de la paroi cellulaire et de l'acide oxalique (**Figure 10**). Ce relâchement des parois génère des déformations excessives dans les cellules saines adjacentes au site d'infection, dues à la réorganisation globale de l'équilibre des stress mécaniques dans les parois (Léger et al., 2021). Les cellules végétales perçoivent la fluctuation de la tension apoplastique provoquée par le pathogène comme des signaux mécaniques qui guident la réorganisation des microtubules corticales à un niveau cellulaire et supra-cellulaire (Léger et al., 2021). La mécanoperception des signaux du pathogène dans les feuilles remanie le stress interne sur quelques mm autour du site de l'infection et contrôle l'expression des gènes de résistance dans les cellules distales. Ce mécanisme de régulation est potentiellement indépendant de la défense déclenchée par les DAMP (Léger et al., 2021).

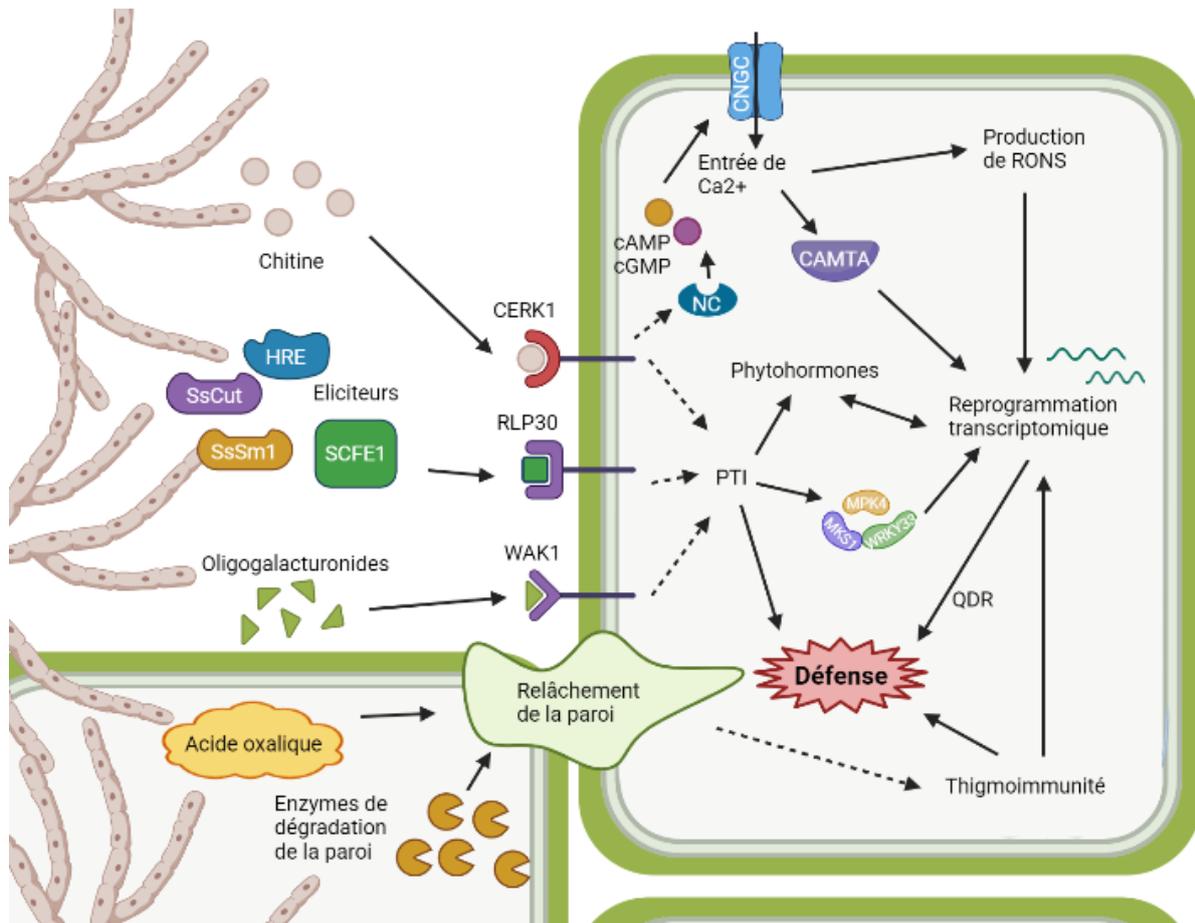
La réponse à *S. sclerotiorum* fait intervenir les RONS et les phytohormones comme molécules de signalisation.

La défense des plantes face à *S. sclerotiorum* est un réseau complexe faisant intervenir différentes cascades signalétiques (Wang et al., 2019a). Les principales molécules de signalisation impliquées dans l'activation de la défense des plantes sont le  $\text{Ca}^{2+}$  (Dangl et al., 1996), les RONS (Delledonne, 2005; Stael et al., 2015; Wendehenne et al., 2004), les kinases MAP (Meng and Zhang, 2013; Pitzschke et al., 2009) et les phytohormones (Kunkel and Brooks, 2002) (**Figure 10**). Le  $\text{Ca}^{2+}$  est une des molécules majeures de la réponse des plantes à leurs pathogènes (Dangl et al., 1996). Dans le cas de la réponse à *S. sclerotiorum*, suite à la perception de PAMP comme la chitine, des nucléotidyl cyclases (NC) sont activées, générant des nucléotides cycliques comme l'adénosine cyclique monophosphate (cAMP) ou la guanosine cyclique monophosphate (cGMP). Ces nucléotides cycliques sont alors capables d'activer des canaux ioniques spécifiques (CNGC) permettant le transfert de  $\text{Ca}^{2+}$  à travers la membrane plasmique menant à une augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique (Ma and Berkowitz, 2011; Qi et al., 2010; Saand et al., 2015a, 2015b; Świeżawska et al., 2018) (**Figure 10**). L'augmentation de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est à l'origine d'une cascade de signalisation permettant la mise en place des défenses de la plante. Ainsi, plusieurs gènes de CNGC de la tomate sont impliqués dans la résistance à *S. sclerotiorum* (Saand et al., 2015a, 2015b). L'augmentation de la concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  cytosolique est captée par diverses protéines comme les calmodulines (CaM) ou les kinases dépendantes du calcium (CDPK) (Hamel et al., 2014; Ranty et al., 2006). Ces protéines activent d'autres kinases, menant à la production d' $\text{H}_2\text{O}_2$  (Liu and He, 2016; Wang et al., 2015b). Elles activent également les facteurs de transcription liés aux calmodulines (CAMTA) menant à l'expression de gènes impliqués dans la défense (**Figure 10**). Étonnamment, le facteur de transcription CAMTA3 semble cependant réguler négativement la défense. En effet, les mutants *camta3* présentent un phénotype plus résistant à *S. sclerotiorum* que le sauvage ainsi qu'une accentuation de la PTI avec une production plus importante d' $\text{H}_2\text{O}_2$  en réponse à la chitine et une surexpression du récepteur BAK1 (Rahman et al., 2016).

Parmi les molécules de signalisation permettant la réponse des plantes à *S. sclerotiorum*, on retrouve également les RONS (**Figure 10**) (Delledonne, 2005; Stael et al., 2015; Wendehenne et al., 2004). Les RONS sont produits à des quantités suffisantes pour être observés dès 20hpi (*hours post infection*) et 16hpi respectivement pour les ROS et les NO (oxyde nitrique). Leur production additionnée à l'expression des gènes associés semble conférer une résistance quantitative. En effet, Perchepped et al. (2010) ont comparé la production de RONS et l'expression des gènes associés, suite à l'infection par *S. sclerotiorum* dans deux accessions d'*A. thaliana*, considérées comme sensible (Shahdara) ou résistante (Rubezhnoe-1). Ils ont pu observer que la production de RONS était plus précoce dans l'accession résistante que dans l'accession sensible. Ils montrent également que l'expression des gènes associés à ces RONS, comme *PDF1-2* ou *PR1* (*Pathogenesis-Related protein 1*), était plus importante dans l'accession résistante que dans l'accession sensible.

Les MAPK sont des molécules de signalisation importantes dans la réponse à *S. sclerotiorum*, permettant une reprogrammation transcriptionnelle rapide suite à une série de phosphorylations. La kinase MAP 4 (MPK4) et le facteur de transcription WRKY33 jouent un rôle important dans la résistance à *S. sclerotiorum* et *B. cinerea* (Brodersen et al., 2006; Petersen et al., 2000; Wang et al., 2015a, 2009, 2014). Lors de l'activation de la PTI suite à la perception du pathogène, MPK4 est activé et phosphoryle son substrat, MKS1. Consécutivement, le complexe formé par MKS1 et WRKY33 est libéré de MPK4 et WRKY33 participe à la reprogrammation de la transcription (**Figure 10**) (Andreasson et al., 2005; Qiu et al., 2008; Suarez-Rodriguez et al., 2007). WRKY33 est impliqué dans la régulation de l'expression de gènes jouant un rôle dans la biosynthèse de camalexine et de gènes impliqués dans les voies de défense de l'acide jasmonique et de l'éthylène comme *PDF1.2* et *ORA59* (Birkenbihl et al., 2012; Brodersen et al., 2006; Liu et al., 2015; Wang et al., 2015a).

Enfin, les phytohormones jouent également un rôle dans la signalisation de la défense des plantes (**Figure 10**) (Kunkel and Brooks, 2002). L'analyse du phénotype de sensibilité à *S. sclerotiorum* de mutants des régulateurs de la signalisation par l'acide jasmonique, l'acide salicylique et l'éthylène (respectivement les mutants *coi1-2*, *npr1* et *ein2*), ainsi que des mutants insensibles à ou déficient en acide abscissique chez *A. thaliana*, a montré que ces mutants ont un phénotype de sensibilité accrue à l'infection par *S. sclerotiorum* (Guo and Stotz, 2007; Perchepped et al., 2010a). Ainsi, des phytohormones telles que l'acide jasmonique, l'acide salicylique, l'éthylène et l'acide abscissique sont des régulateurs positifs de la défense des plantes face à l'infection par *S. sclerotiorum* (Guo and Stotz, 2007; Perchepped et al., 2010b; Yang et al., 2018).



**Figure 10 : Réponse moléculaire à l'infection par *S. sclerotiorum*.** Représentation des différents mécanismes moléculaires et cascades de signalisation impliqués dans la perception de l'infection par *S. sclerotiorum* et dans la mise en place des mécanismes de défense. Schéma réalisé avec BioRender.com.

*S. sclerotiorum* est capable de manipuler les défenses de la plante hôte.

De nombreux pathogènes ont développé des mécanismes détournant les mécanismes de défenses de la plante à leur avantage. Plusieurs études suggèrent que *S. sclerotiorum* pourrait en faire partie. En effet, lors de l'infection, *S. sclerotiorum* sécrète SsCP1, un éliciteur de la famille des CP. SsCP1 interagit directement avec une des protéines dépendantes de la voie de l'acide salicylique, PR1, chez *A. thaliana* (Yang et al., 2018). L'interaction entre SsCP1 et PR1 déclencherait la voie de défense impliquant l'acide salicylique et une surexpression de PR1 augmente la résistance à *S. sclerotiorum*. Cependant, SsCP1 est un facteur de virulence de *S. sclerotiorum*, les mutants KO du gène SsCP1 sont moins virulents que les sauvages (Yang et al., 2018). De plus, SsCP1 entraîne des lésions nécrotiques après infiltration dans des feuilles de *Nicotiana benthamiana* (Yang et al., 2018) et les protéines de la famille des CP provoquent des lésions similaires à la HR (Frías et al., 2011; Pazzagli et al., 1999; Yang et al., 2009). Enfin, les PR1 ont une activité antifongique dans différentes plantes contre divers champignons et oomycètes pathogènes (Kiba et al., 2007; Niderman et al., 1995; Rauscher et al., 1999), et l'interaction entre PR1 et SsCP1 pourrait inhiber l'activité antifongique de PR1 (Yang et al., 2018).

Par ailleurs, une étude réalisée dans l'équipe identifie LAZ5 (*Lazarus 5*), une TIR-NBS-LRR (*TIR-Nucleotide Binding Site-Leucine Rich Repeat*) nécessaire à la mort cellulaire déclenchée par ACD11 (*Accelerated Cell Death 11*) (Palma et al., 2010), comme un facteur de sensibilité d'*A. thaliana* face à *S. sclerotiorum*. L'étude suggère que des effecteurs de *S. sclerotiorum* pourraient cibler LAZ5 afin de déclencher les mécanismes de mort cellulaire et favoriser l'infection (Barbacci et al., 2020).

Lors de l'infection, *S. sclerotiorum* sécrète une chorismate mutase hautement similaire à l'effecteur Cmu1 du champignon pathogène biotrophe à l'origine du charbon du maïs, *Ustilago maydis*. Cmu1 est capable de catalyser la conversion du chorismate en préphénate, ce qui dérive le chorismate vers la voie des phénylpropanoïdes. La voie de biosynthèse de l'acide salicylique est alors entravée et l'immunité de la plante diminuée. Quand les plantes sont infectées par un mutant de Cmu1, elles produisent significativement plus d'acide salicylique et les mutants sont moins virulents. (Derbyshire et al., 2017; Djamei et al., 2011; Kabbage et al., 2013). Ainsi, *S. sclerotiorum* serait notamment capable de manipuler la HR, de réprimer des molécules antifongiques et de détourner la voie de biosynthèse de l'acide salicylique.

Enfin, certaines espèces de pathogènes sécrètent des petits ARN (ARNs) lors de l'infection, ciblant des gènes de défense des plantes par complémentarité. La liaison des ARNs aux ARN messagers (ARNm) cibles peut entraîner la dégradation des ARNm ou l'inhibition de la traduction (Pratt and MacRae, 2009). Quand les ARNm cibles sont des gènes impliqués dans la défense, la résistance des plantes au pathogène est alors réduite. Ceci a été observé pour *S. sclerotiorum*. Il a été montré qu'il sécrète abondamment au minimum 372 ARNs différents lors de l'infection. Les cibles de ces ARNs sont associées à l'immunité des plantes et leur expression est fortement réduite lors de l'infection par *S. sclerotiorum* (Derbyshire et al., 2019).

#### La QDR implique une large modification du transcriptome en réponse à *S. sclerotiorum*.

Suite à la reconnaissance de l'infection par *S. sclerotiorum* et l'initiation de diverses cascades de signalisation impliquant les RONS et les phytohormones, la défense de la plante est mise en place. Les phénotypes de résistance d'une population de plantes face à *S. sclerotiorum* présentent une distribution continue, un phénotype de QDR (Roux et al., 2014). On retrouve une distribution gaussienne des phénotypes en réponse à *S. sclerotiorum* dans les populations de tournesol (*Helianthus annuus*) (Fusari et al., 2012), de soja (*Glycine max*) (Bastien et al., 2014), de colza (*Brassica napus*) (Wu et al., 2013) et d'*Arabidopsis* (Perchepied et al., 2010a). La QDR est un type de résistance complexe, polygénique par définition (Corwin and Kliebenstein, 2017). A l'heure actuelle, quelques dizaines de gènes d'*A. thaliana* ont été caractérisés comme participant au phénotype de QDR en réponse à *S. sclerotiorum* (Badet et al., 2017, 2018; Barbacci et al., 2020; Derbyshire et al., 2019; Mbengue et al., 2016; Perchepied et al., 2010a; Stotz et al., 2011; Sucher et al., 2020). Cependant, suite à l'infection par *S. sclerotiorum*, une importante reprogrammation de l'expression des gènes est initiée. Badet et al., 2017 retrouvent 10% des gènes de la tomate (*Solanum lycopersicum*) différentiellement exprimés et 14% des gènes d'*A. thaliana*, tandis que Sucher et al., 2020 retrouvent une

moyenne de 32,4% des gènes différentiellement exprimés (DEG) parmi six espèces différentes du groupe des Pentapetalae des angiospermes. Or, selon le modèle omnigénique (Boyle et al., 2017), chaque gène différentiellement exprimé pourrait avoir un impact non nul sur le phénotype de la QDR. Ainsi, un grand nombre de gènes participant à la QDR face à *S. sclerotiorum* serait encore à caractériser.

## Questions et démarche

Les modifications climatiques à venir risquent de modifier la relation triangulaire plante-microorganisme-environnement telle qu'on la connaît aujourd'hui. Les systèmes de défense des plantes face au pathogène sont sensibles aux conditions environnementales telles que la température (Desaint et al., 2021) ou l'humidité ambiante ou tellurique (Aung et al., 2018). Le champignon pathogène *S. sclerotiorum* requiert une température autour de 20°C et une humidité complète sur le tissu végétal qu'il infecte pour une croissance optimale (Abawi and Grogan, 1975; Berg and Lentz, 1968; Willetts and Wong, 1980). Une modification du climat risque d'entraîner un décalage des niches écologiques des pathogènes de manière à la fois temporelle et spatiale. Les agriculteurs vont donc affronter de nouvelles menaces biologiques et devront adapter leur manière de faire face aux pathogènes (Bebber, 2015; Bebber et al., 2013).

Afin de s'adapter aux nouvelles menaces biologiques, le pyramidage de gènes pourrait permettre la sélection de variétés résistantes et durables. En effet, d'une part les résistances monogéniques conférées par des gènes R permettent une résistance complète de variétés à des pathogènes mais ne sont pas durables dans le temps (Ayme et al., 2006; Zhan et al., 2015). D'autre part, un système de résistance multigénique comme la QDR permet une résistance partielle à un large spectre de pathogènes et plus durable dans la course à l'armement contre les pathogènes. Enfin, l'association de la résistance des gènes R avec un fond génétique apportant une résistance via la QDR permet une plus grande durabilité de la résistance complète apportée par ces gènes R (Palloix et al., 2009). Ainsi le pyramidage des gènes R avec des gènes de la QDR pourrait permettre la sélection de variétés résistantes et durables. Cependant la QDR reste encore un système de défense de la plante relativement peu étudié, il est donc indispensable de mieux comprendre la QDR et sa relation avec les conditions climatiques pour en tirer parti dans l'agriculture du futur.

Proche du colza, l'une des principales cultures affectées par *S. sclerotiorum*, *A. thaliana* est également hôte de *S. sclerotiorum*. *A. thaliana* est un organisme modèle doté de nombreuses ressources génétiques dont des populations naturelles d'origines géographiques (et donc climatiques) variées sont disponibles. Pour accélérer la recherche de gènes conférant une résistance à *S. sclerotiorum* dans différentes conditions climatiques, nous avons étudié au cours de ma thèse l'impact du climat sur la résistance d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*. Pour cela nous avons créé différentes conditions de cultures représentant une évolution possible du

climat au cours du réchauffement climatique. Afin d'évaluer l'impact de chacun de ces climats sur la résistance, nous avons évalué le phénotype de sensibilité à *S. sclerotiorum* de différentes accessions d'*A. thaliana* ayant été cultivées dans les différents climats. Cette analyse phénotypique nous a montré que toutes les accessions étaient plus sensibles à l'infection dans le climat le plus chaud. Afin d'appréhender les bases moléculaires à l'origine de l'augmentation de la sensibilité dans le climat le plus chaud, nous avons recherché les gènes dont l'expression était modulée par le climat et l'infection. Pour cela, nous avons utilisé une analyse transcriptomique pour établir une liste non exhaustive de gènes candidats pour leur implication dans la résistance d'*A. thaliana* face à *S. sclerotiorum* en fonction des conditions climatiques. L'inférence d'un réseau de co-expression grâce aux données du séquençage d'ARN associée à un clustering hiérarchique à partir des gènes sélectionnés nous a permis d'identifier une organisation du réseau en 3 clusters principaux de gènes qui diffèrent par leur profil d'expression. 5 gènes candidats répartis parmi les 3 clusters ont été sélectionnés afin d'approfondir la compréhension du rôle des gènes de ces différents clusters dans la réponse à *S. sclerotiorum* en fonction du climat. L'analyse phénotypique de mutants de ces gènes nous a permis de montrer que les 5 gènes candidats étaient des facteurs de sensibilité à *S. sclerotiorum* dans un climat chaud. Nous avons enfin focalisé nos études sur un des gènes candidats, de la famille des facteurs de transcription NAC. Des constructions génétiques permettant sa surexpression en protéine de fusion avec la GFP nous ont permises de valider sa localisation nucléaire. Enfin, grâce à des données de DAP-seq (O'Malley et al., 2016a), nous avons pu déterminer que les gènes potentiellement régulés par ce facteur de transcription NAC étaient des gènes associés aux stress.

La QDR est un type de résistance hautement multigénique et est impactée par les modifications climatiques. Cependant, beaucoup de gènes impliqués dans la QDR sont de fonction inconnue et/ou appartenant à des familles de DUF (*Domain of Unknown Function*). Au cours du premier chapitre de cette thèse, la famille des DUF4228 s'est distinguée par son expression fortement induite par l'infection par *S. sclerotiorum* et par la dépendance au climat de l'expression de plusieurs de ses membres. Cette famille avait déjà préalablement été associée à la réponse aux stress abiotiques (Yang et al., 2020). Afin de mieux comprendre la fonction de cette famille de DUF, nous avons réalisé des études phylogénétiques et bioinformatiques qui nous ont permis de mettre en évidence le rôle de cette famille dans la résistance des plantes aux pathogènes et de nommer cette famille PADRE (*plastid movement, cadmium tolerance, calmodulin and response regulator interaction*) (Didelon et al., 2020).

Enfin, des travaux dans l'équipe ont récemment montré que la mécanoperception est à l'origine de la mise en place d'un mécanisme de défense, appelé thigmoimmunité, face à *S. sclerotiorum* chez *A. thaliana* (Léger et al., 2021). Le vent est la source de stimulations mécaniques majeure dans la nature. De plus, les variations de températures sont à l'origine du vent sur Terre donc le réchauffement climatique global prévu devrait avoir un impact sur le vent. Afin de comprendre l'impact du vent sur la résistance d'*A. thaliana* face à *S. sclerotiorum*, nous avons réalisé les premières analyses phénotypiques de l'infection d'*A. thaliana* par *S. sclerotiorum* après stimulation des plantes par différentes durées de vent. Nous avons montré que le vent modulait fortement la résistance et que cet impact dépendait de la quantité de signaux mécaniques perçus par la plante. Ces expériences préliminaires ont

permis à l'équipe d'obtenir un financement et de réaliser une étude d'association pangénomique afin d'identifier les acteurs génétiques à l'origine de l'impact du vent sur la résistance.



# Chapitre I : Identification d'un nouveau facteur de transcription NAC impliqué dans la régulation climatique de la QDR d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*

## Introduction

Selon les prédictions du dernier rapport du GIEC, le réchauffement climatique sera à l'origine d'une augmentation de la température de la surface globale de la Terre comprise entre 1,0 °C et 5,7 °C, selon les scénarios, pour la période 2081-2100 (IPCC, 2021). Une augmentation des températures peut avoir un impact sur le rendement des cultures, comme observé chez le maïs, le soja et le coton où des températures supérieures à respectivement 29 °C, 30 °C et 32 °C entraînent une forte diminution des récoltes (Schlenker and Roberts, 2009). A contrario, des projections sur le rendement de diverses cultures utilisant différents modèles de prédiction des cultures, prévoient une augmentation globale des récoltes pour la période 2020-2070 (Chaloner et al., 2021; Ostberg et al., 2018; Rosenzweig et al., 2014). Cependant, ces prédictions sont réalisées sans prendre en compte l'impact des modifications climatiques sur l'incidence des infections par des pathogènes qui pourraient avoir un effet négatif sur le rendement des cultures. Les prédictions annoncent en effet une augmentation du risque d'infection par des champignons et des oomycètes pathogènes (Chaloner et al., 2021), ainsi qu'un mouvement des niches géographiques des pathogènes vers les pôles (Bebber et al., 2013). Ainsi, les cultures pourront être soumises à une modification du climat, ainsi qu'à une incidence des infections plus forte, face à des pathogènes plus diversifiés.

Les études analysant la réponse des plantes à différents stress biotiques ou abiotiques se concentrent souvent sur l'étude d'un seul stress. Ces approches réductionnistes, à défaut de permettre de mieux comprendre la plante dans son environnement, permettent souvent une identification plus aisée des bases génétiques impliquées dans la réponse au stress étudié. Cependant, le réchauffement climatique va favoriser l'occurrence de combinaisons de stress comme l'association d'une augmentation des températures avec des infections par des pathogènes (Chaloner et al., 2021). Les mécanismes de réponse des plantes à des stress multiples sont plus complexes que la combinaison linéaire des réponses à chaque stress individuel (Pandey et al., 2015; Zhang and Sonnewald, 2017). La combinaison de stress peut être assimilée à un nouvel état de stress à part entière (Mittler, 2006). Ainsi, l'étude de l'impact de climats complexes sur la résistance est à approfondir afin de se préparer aux défis agronomiques associés au réchauffement climatique.

Diverses études ont montré que l'augmentation des températures avait un effet sur la résistance des plantes aux pathogènes. Une étude réunissant les analyses de 142 cas d'infection de plantes par des pathogènes, associée à une élévation de la température, montre que l'augmentation de la température entraîne une diminution ou une inhibition de la défense des plantes dans 55 % des cas. Différents mécanismes de résistance tels que la PTI, l'ETI ou la QDR apparaissent dépendants des fluctuations de température (Desaint et al., 2021). Ainsi, une augmentation de la température de 3 °C (entre 27 °C et 30 °C) diminue la défense de différentes populations d'*A. thaliana* à *R. solanacearum* (Aoun et al., 2017, 2020). Cette diminution de la résistance à *R. solanacearum* est associée à un changement de mécanisme de résistance dépendant de la température. Le locus *RPS4/RRS1-R*, est connu pour être impliqué dans la réponse à divers pathogènes dont *R. solanacearum*. Lors de l'infection d'une plante sensible, l'effecteur PopP2 sécrété par *R. solanacearum*, acétyle des facteurs de transcription de la famille des WRKY, affectant leur capacité à se lier à l'ADN et à mettre en place les mécanismes de défense. En présence de *RRS1-R*, un NLR possédant un domaine WRKY, ce dernier est acétylé par PopP2 ce qui déclenche les mécanismes de défense associés à *RPS4* (Deslandes et al., 2002; Le Roux et al., 2015). Le locus *RPS4/RRS1-R* est un QTL majeur associé à la résistance *R. solanacearum* à 27 °C, cependant il n'est pas détecté à 30 °C (Aoun et al., 2017). Ces résultats mettent en évidence qu'une légère modification de température peut fortement moduler les mécanismes de défense mis en place en réponse à un pathogène.

Parmi les pathogènes auxquels le réchauffement climatique pourrait bénéficier on retrouve le champignon pathogène *S. sclerotiorum*. *S. sclerotiorum* est un champignon nécrotrophe généraliste à l'origine de la pourriture blanche sur plus de 400 espèces. Il entraîne chaque année des pertes agronomiques considérables (Navaud et al., 2018; Peltier et al., 2012). Le champignon a besoin d'une humidité très élevée pour le développement de l'infection (Abawi and Grogan, 1975). Or, selon les prédictions, le réchauffement climatique devrait entraîner une augmentation des épisodes de fortes précipitations (Wetherald and Manabe, 2002) qui pourraient favoriser la germination de *S. sclerotiorum*. Le mécanisme de défense principal des plantes en réponse à *S. sclerotiorum* est la QDR, cependant aucune étude à notre connaissance n'a étudié l'impact des modifications climatiques sur la QDR en réponse à *S. sclerotiorum* à ce jour.

La QDR est un mécanisme de défense de la plante hautement multigénique, où chaque gène contribue faiblement au phénotype de résistance globale de la plante au pathogène (Boyle et al., 2017). Dans le cas d'une infection par *S. sclerotiorum* par exemple, une importante reprogrammation de l'expression des gènes est initiée dans la plante, avec une moyenne de 32,4 % des gènes différentiellement exprimés en réponse à *S. sclerotiorum* parmi six espèces appartenant au groupe des Pentapetalae chez les angiospermes (Sucher et al., 2020). Les gènes participant à la QDR ne sont pas uniquement des gènes associés aux mécanismes de défense, beaucoup d'entre eux sont pléiotropes et sont impliqués dans d'autres fonctions biologiques (Corwin et al., 2016). Par exemple, *ARPC4* est impliqué à la fois dans la nucléation de l'actine, dans la morphologie des plantes et dans la QDR d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum* (Badet et al., 2018). La nature hautement multigénique de la QDR nous permet de penser que l'expression de nombreux gènes impliqués dans la QDR pourrait être modulée

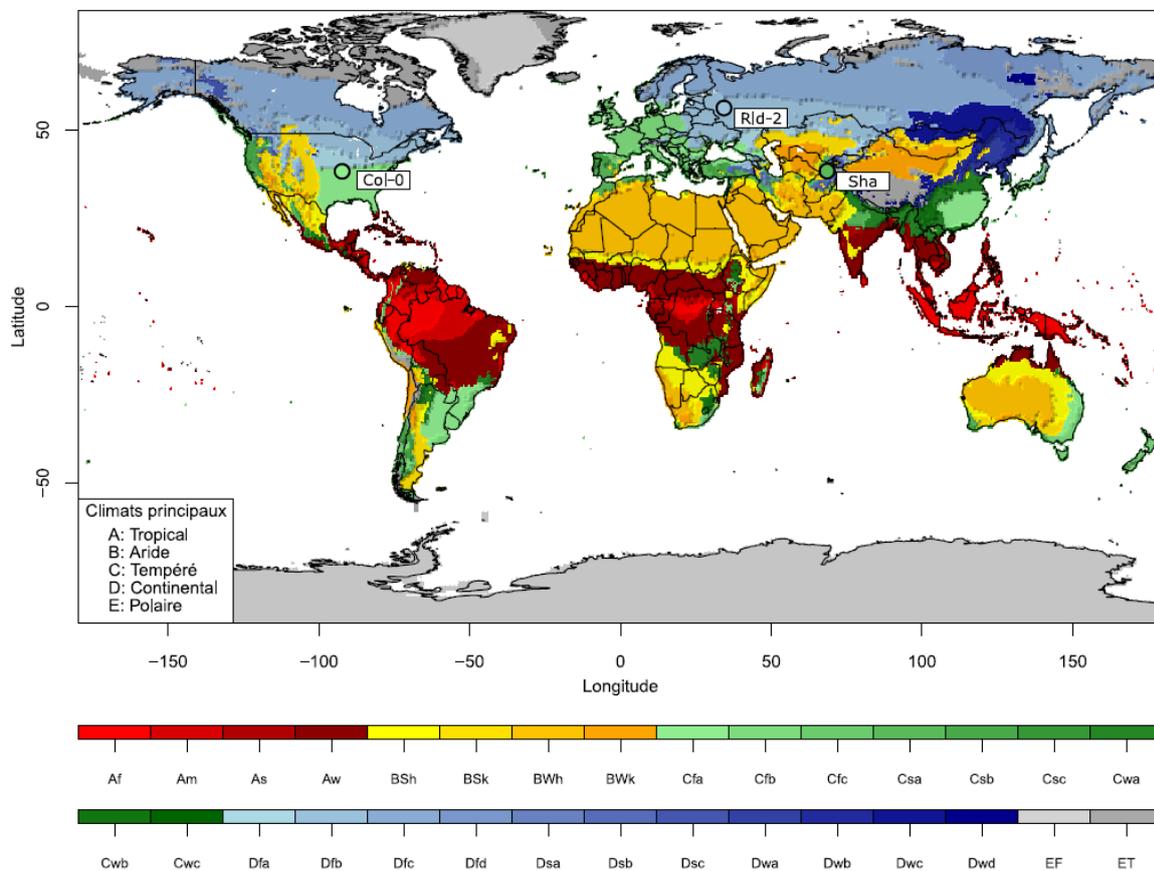
par les conditions climatiques. Les phénotypes de QDR pourraient alors varier dans des conditions climatiques changeantes.

Dans ce chapitre nous visons à mieux comprendre l'impact de divers climats simulés en laboratoire sur la QDR. Pour cela, nous avons analysé la réponse au champignon pathogène *S. sclerotiorum* de différentes accessions d'*A. thaliana* ayant été cultivées avec différentes conditions climatiques. Ces conditions climatiques ont été conçues afin de représenter une trajectoire probable d'évolution des climats selon les projections de réchauffement actuelles. Pour recréer des conditions climatiques proches de celles retrouvées dans la nature, nous avons cultivé les plantes à des températures variant entre le jour et la nuit. Ces conditions climatiques représentent la moyenne de la météo du mois d'avril sur 30 ans à 3 emplacements différents sur le globe. Dans ce chapitre nous avons ainsi montré, grâce à une technique de phénotypage automatique à résolution temporelle (Barbacci et al., 2020), que les trois accessions (Col-0, Shahdara et Rld-2) sont plus sensibles à l'infection de *S. sclerotiorum* dans le climat le plus chaud. Nous avons ensuite réalisé un séquençage d'ARN et réalisé l'analyse des gènes différentiellement exprimés par l'infection et d'autre part les gènes différentiellement exprimés entre les climats. Ces analyses nous ont permis de réaliser une sélection de 264 gènes dont l'expression est modulée à la fois par l'infection et par le climat (que nous avons appelés CAIG pour *Climate-Associated, Infection-induced Genes*). Nous avons ensuite établi un réseau de co-expression des gènes CAIG mettant en évidence 3 clusters. L'analyse des phénotypes de mutants de gènes représentant ces clusters a montré que les mutants présentaient une résistance accrue à *S. sclerotiorum* après avoir été cultivé dans le climat le plus chaud. Enfin, nous avons confirmé l'implication du gène AT3G12910 de la famille des facteurs de transcription NAC dans la réponse à *S. sclerotiorum* en fonction du climat et identifié ses cibles potentielles.

## Résultats

Les différentes accessions d'*A. thaliana* montrent un phénotype plus sensible à l'infection par *S. sclerotiorum* lorsqu'elles ont été cultivées dans le climat le plus chaud.

Afin d'étudier l'impact du climat sur la résistance d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*, nous avons choisi 3 accessions naturelles d'*A. thaliana* représentant une diversité génétique, géographique et climatique : Col-0, Rld-2 et Shahdara (Sha) (**Figure 11**). Pour définir les climats utilisés dans cette étude, nous nous sommes basés sur la classification des climats de Köppen-Geiger. Cette classification des climats fait partie des classifications les plus utilisées et permet de retranscrire la complexité des gradients climatiques en un système de classification pertinent écologiquement pour l'étude des plantes (Beck et al., 2018; Köppen, 2011; Rubel and Kottek, 2010). La classification de Köppen-Geiger se base sur les températures et les précipitations pour définir 5 grands climats (aride, tropical, tempéré, continental et polaire) divisés en 30 sous-climats définis par un code de deux ou trois lettres (**Tableau 1, Figure 11**). Nous avons attribué une catégorie de climat à chaque accession

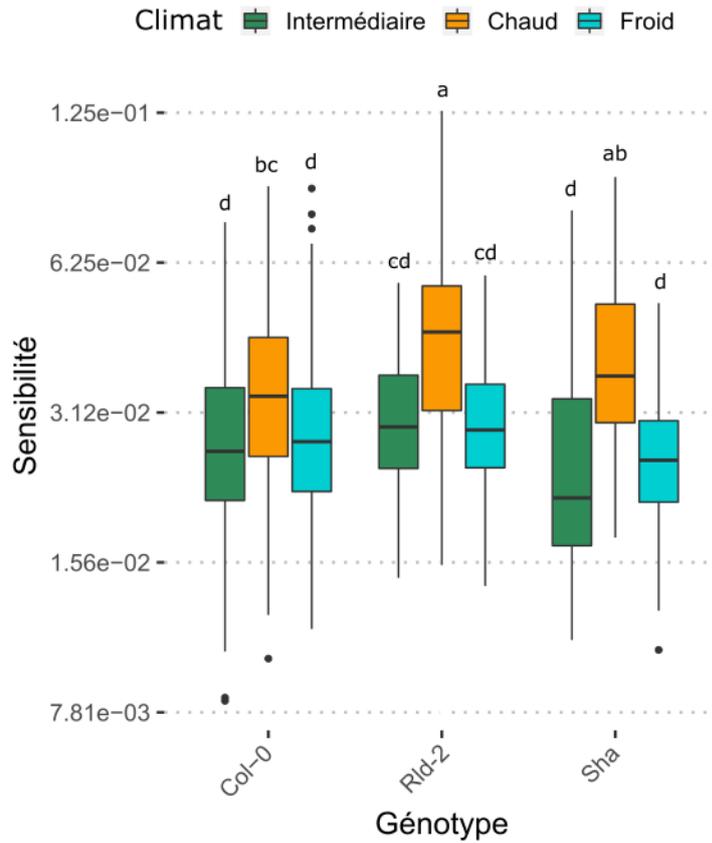


1 <sup>ère</sup> lettre	2 <sup>ème</sup> lettre	3 <sup>ème</sup> lettre	Description	Critères
A			Tropical	$T_{\min} \geq 18 \text{ °C}$
	f		Forêt tropicale	$P_{\min} \geq 60 \text{ mm}$
	m		Mousson	Pas (Af) et $P_{\text{ann}} \geq 25 (100 - P_{\min})$
	s		Savane, été sec	$P_{\min} < 60 \text{ mm}$ pendant l'été
	w		Savane, hiver sec	$P_{\min} < 60 \text{ mm}$ pendant l'hiver
B			Aride	$P_{\text{ann}} < 10 \times P_{\text{lim}}$
	S		Steppe	$P_{\text{ann}} > 5 \times P_{\text{lim}}$
	W		Désert	$P_{\text{ann}} \leq 5 \times P_{\text{lim}}$
		h	Chaud	$T_{\text{ann}} \geq 18 \text{ °C}$
		k	Froid	$T_{\text{ann}} < 18 \text{ °C}$
C			Tempéré	$-3 \text{ °C} < T_{\min} < 18 \text{ °C}$
	s		Eté sec	$P_{\text{émin}} < P_{\text{hmin}}, P_{\text{hmax}} > 3 \times P_{\text{émin}}$ et $P_{\text{émin}} < 40 \text{ mm}$
	w		Hiver sec	$P_{\text{hmin}} < P_{\text{émin}}$ et $P_{\text{émax}} > 10 \times P_{\text{hmin}}$
	f		Pas de saison sèche	Ni (Cs), ni (Cw)
		a	Eté chaud	$T_{\text{max}} \geq 22 \text{ °C}$
		b	Eté doux	Pas (a) et $T_{\text{msup10}} \geq 4$
		c	Eté froid	Ni (a), ni (b) et $1 \leq T_{\text{msup10}} < 4$
D			Continental	$T_{\min} \leq -3 \text{ °C}$
	s		Eté sec	$P_{\text{émin}} < P_{\text{hmin}}, P_{\text{hmax}} > 3 \times P_{\text{émin}}$ et $P_{\text{émin}} < 40 \text{ mm}$
	w		Hiver sec	$P_{\text{hmin}} < P_{\text{émin}}$ et $P_{\text{émax}} > 10 \times P_{\text{hmin}}$
	f		Pas de saison sèche	Ni (Ds), ni (Dw)
		a	Eté chaud	$T_{\text{max}} \geq 22 \text{ °C}$
		b	Eté doux	Pas (a) et $T_{\text{msup10}} \geq 4$
		c	Eté froid	Ni (a), ni (b), ni (d)
		d	Hiver très froid	Ni (a), ni (b) et $T_{\min} < -38 \text{ °C}$
E			Polaire	$T_{\text{max}} < 10 \text{ °C}$
	T		Toundra	$T_{\text{max}} > 0 \text{ °C}$
	F		Gelé	$T_{\text{max}} \leq 0 \text{ °C}$

**Tableau 1 : Description des symboles de la classification des climats de Köppen-Geiger et des critères de classement.**  $T_{\min}$  = moyenne de la température du mois le plus froid ;  $T_{\max}$  = moyenne de la température du mois le plus chaud ;  $T_{\text{ann}}$  = moyenne des températures annuelles ;  $T_{\text{msup}10}$  = nombre de mois pour lesquels la température moyenne dépasse 10 °C ;  $P_{\min}$  = moyenne des précipitations du mois le plus sec ;  $P_{\text{ann}}$  = moyenne des précipitations annuelles ;  $P_{\text{lim}}$  = varie en fonction de la règle suivante : si 70% de  $P_{\text{ann}}$  a lieu en hiver alors  $P_{\text{lim}} = 2 \times T_{\text{ann}}$ , si 70% de  $P_{\text{ann}}$  a lieu en été alors  $P_{\text{lim}} = 2 \times T_{\text{ann}} + 28$ , sinon  $P_{\text{lim}} = 2 \times T_{\text{ann}} + 14$  ;  $P_{\text{émin}}$  = moyenne des précipitations du mois le plus sec de l'été ;  $P_{\text{hmin}}$  = moyenne des précipitations du mois le plus sec de l'hiver ;  $P_{\text{hmax}}$  = moyenne des précipitations du mois le plus pluvieux de l'hiver ;  $P_{\text{émax}}$  = moyenne des précipitations du mois le plus pluvieux de l'été. Les critères sont tirés de Kottek et al., 2006.

utilisée dans cette étude à partir des coordonnées géographiques du lieu de prélèvement de l'accession d'*A. thaliana* (The 1001 Genomes Consortium, 2016). Col-0 provient d'un climat Cfa, Rld-2 d'un climat Dfb et Sha d'un climat Csa (**Figure 11**). Les températures de jour et de nuit utilisées pour chaque climat correspondent à une moyenne sur 30 ans des températures maximales et minimales journalières pour le mois d'avril au lieu d'origine des 3 accessions selon <https://www.meteoblue.com> (**Tableau 2**). Les plantes ont été cultivées en jour long, avec une variation de photopériode entre les climats afin de représenter la variabilité de photopériode au mois d'avril dans l'hémisphère nord (**Tableau 2**). Dans la suite de l'étude, ces climats seront appelés le climat froid pour le climat Dfb, le climat intermédiaire pour Cfa et le climat chaud pour Csa.

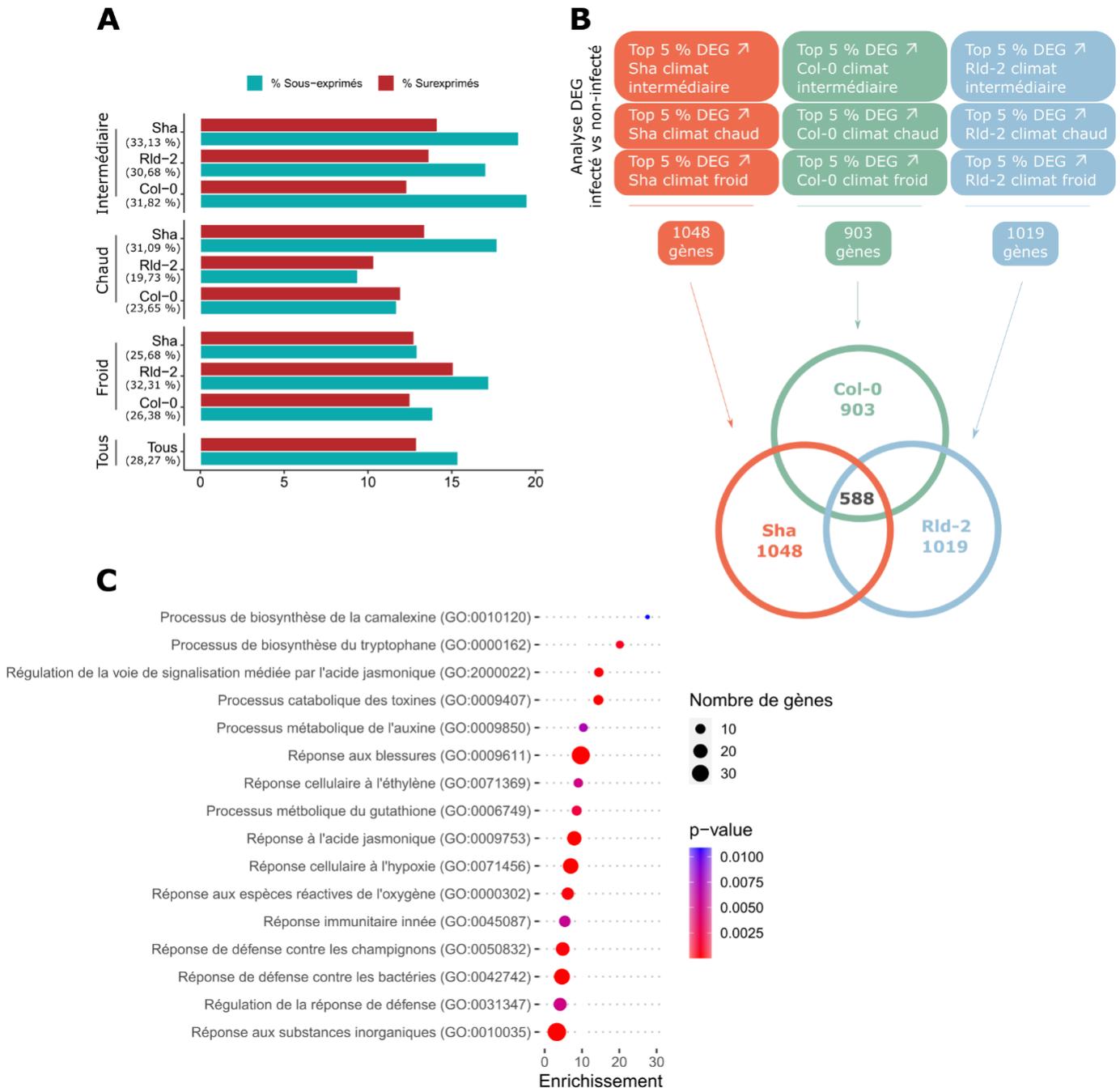
Pour déterminer comment le climat module la résistance des plantes, nous avons analysé les variations phénotypiques de résistance des trois accessions d'*A. thaliana* dans les trois climats. Chaque accession a été cultivée dans chacun des trois climats avant d'être infectée par *S. sclerotiorum*. Nous avons utilisé une technique de phénotypage automatique à résolution temporelle, adapté au pathosystème considéré afin d'évaluer la sensibilité des plantes à *S. sclerotiorum* (Barbacci et al., 2020). Les résultats ont montré que le niveau de sensibilité à *S. sclerotiorum* des différentes accessions était comparable entre les climats intermédiaire et froid et qu'elles étaient plus sensibles dans le climat chaud, comparé aux autres climats (**Figure 12**). Rld-2 était l'accession la plus sensible dans tous les climats étudiés, Col-0 et Sha avaient un niveau de sensibilité identique dans les climats intermédiaire et froid. Sha était plus sensible que Col-0 dans le climat chaud (**Figure 12**). Ces résultats montrent que génotype et climat sont des facteurs affectant la sensibilité d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum* et que, quel que soit le génotype, le climat le plus chaud cause une diminution du niveau de résistance.



**Figure 12 : Phénotype de sensibilité en réponse à l'infection par *S. sclerotiorum* en fonction du climat et du génotype.** Boite à moustache représentant le phénotype de sensibilité des accessions naturelles d'*A. thaliana* Rld-2, Sha et Col-0 face à l'infection par *S. sclerotiorum*. Le phénotype de sensibilité des plantes ayant été cultivées dans le climat Cfa est représenté en vert, celui des plantes cultivées dans le climat Csa en orange et celui des plantes cultivées dans le climat Dfb en bleu. Chaque expérience a été répétée au moins 3 fois et la significativité des résultats a été évaluée par une ANOVA suivie d'un test de Tukey HSD.

Climat	Jour	Nuit
Intermédiaire (Cfa)	21°C (13h)	9°C (11h)
Chaud (Csa)	23°C (11h)	7°C (13h)
Froid (Dfb)	10°C (14h)	1°C (10h)

**Tableau 2 : Températures et durée du jour et de la nuit utilisées pour les différents climats.**



**Figure 13 : Sélection des gènes les plus surexprimés en réponse à *S. sclerotiorum* dans toutes les accessions et tous les climats.** **A** : Pourcentage de DEG observés via l'analyse de l'expression différentielle des gènes pendant l'infection pour chaque accession et chaque climat. Les barres bleues correspondent aux gènes sous-exprimés (LFC < 1,5) et les barres rouges correspondent aux gènes surexprimés (LFC > 1,5). Sous le nom des accessions d'*A. thaliana* est indiqué le pourcentage de DEG total par condition et par accession. « Tous » représente la moyenne des DEG totaux, surexprimés ou sous-exprimés de toutes les accessions dans toutes les conditions. « Intermédiaire » correspond au climat Cfa, « Chaud » au climat Csa et « Froid » au climat Dfb. **B** : Processus de sélection des gènes les plus surexprimés en réponse à *S. sclerotiorum* dans toutes les accessions et tous les climats. DEG ↗ signifie DEG surexprimés. **C** : Analyse d'enrichissement en GO de la sélection des gènes les plus surexprimés en réponse à *S. sclerotiorum* dans toutes les accessions et tous les climats, grâce au système de classification PANTHER. La taille des points indique le nombre de gènes de la sélection associés à chaque GO, la couleur des points indique la p-value après correction par Bonferroni pour comparaisons multiples et en x est indiqué le taux d'enrichissement de chaque GO dans la sélection par rapport au génome d'*A. thaliana*.

## Analyse du séquençage d'ARN en fonction de l'infection par *S. sclerotiorum* et sélection des gènes les plus surexprimés en réponse à l'infection.

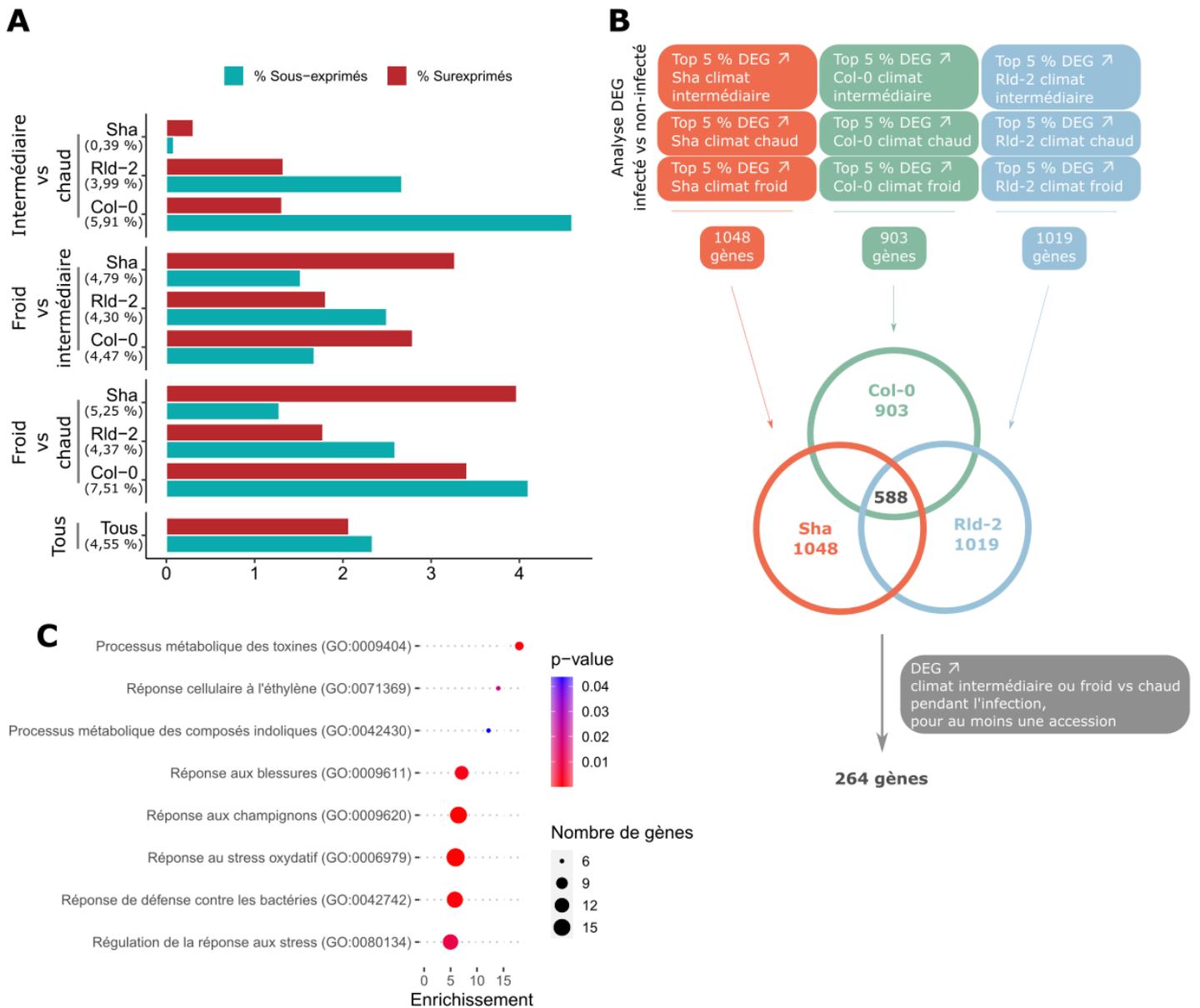
Afin d'identifier les bases génétiques à l'origine du niveau de résistance à *S. sclerotiorum* en fonction du climat, nous avons séquencé les ARN des trois accessions d'*A. thaliana* (Col-0, Sha et Rld-2) cultivées dans les trois climats, avec et sans infection par *S. sclerotiorum*. Nous nous sommes d'abord concentrés sur les gènes différentiellement exprimés pendant l'infection quel que soit le climat et quel que soit le génotype. Nous avons réalisé une analyse de l'expression différentielle des gènes pendant l'infection pour chaque accession et chaque climat (Love et al., 2013). Nous avons considéré comme DEG les gènes présentant un ratio d'expression dont le log2 de l'enrichissement (LFC) était supérieur à 1,5 et une erreur de premier ordre (p-value) ajustée (correction de Benjamin-Hochberg) inférieure à 10%. L'analyse de l'expression différentielle des gènes a montré qu'il y avait en moyenne 28,27 % du génome (9239 gènes) qui était différentiellement exprimé pendant l'infection, avec 12,90 % de gènes surexprimés et 15,37 % de gènes sous-exprimés (**Figure 13A**). Selon le modèle omnigénique, tous les gènes différentiellement exprimés pendant l'infection pourraient avoir un effet non nul sur le niveau de résistance de la plante (Boyle et al., 2017). Cependant, afin d'identifier des gènes potentiellement impliqués activement dans les mécanismes de défense de la plante en fonction du climat, nous nous sommes concentrés sur les gènes dont l'expression était induite pendant l'infection. Notre intérêt s'est donc porté sur les 5% (1633 gènes) des DEG les plus surexprimés pendant l'infection pour chaque accession et chaque climat. Parmi eux, 588 gènes étaient communs à toutes les accessions, quel que soit le climat (**Figure 13B**). Une analyse d'enrichissement a confirmé que cette sélection de 588 gènes présentait un fort enrichissement en GO des processus biologiques liés à la défense (**Figure 13C**).

## Analyse du séquençage d'ARN en fonction du climat et sélection des gènes dont l'expression est modulée par l'infection et le climat.

Nous avons ensuite cherché à identifier les gènes impliqués dans l'augmentation de la résistance d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum* dans les climats intermédiaire et froid comparé au climat chaud. Pour cela, nous avons sélectionné, parmi la sélection de 588 gènes différentiellement surexprimés pendant l'infection, les gènes dont l'expression était modulée par le climat. Nous avons ainsi réalisé, pour chaque accession, une analyse d'expression différentielle entre les climats, pendant l'infection. Ces analyses ont montré qu'en moyenne, 4,55 % des gènes d'*A. thaliana* étaient différentiellement exprimés pendant l'infection entre deux climats (**Figure 14A**). L'analyse d'expression différentielle entre les climats chaud et intermédiaire pour l'accession Sha présentait le pourcentage de DEG le plus faible (0,39 %) (**Figure 14A**). L'analyse d'expression différentielle entre les climats froid et chaud pour Col-0 présentait le pourcentage de DEG le plus élevé (7,51 %) (**Figure 14A**). Comme nous avons montré que les accessions étaient plus sensibles dans le climat chaud, nous avons sélectionné des gènes dont l'expression était corrélée à cette différence phénotypique. Ainsi, nous avons sélectionné les gènes différentiellement exprimés pendant l'infection dans au moins une des trois accessions et dans au moins un des deux climats intermédiaire ou froid par rapport au

climat chaud (LFC > 1,5 et p-value ajustée < 0,1). Cette sélection nous a permis d'isoler 3026 gènes. Parmi ces gènes, 264 faisaient partie des 5% des gènes les plus surexprimés pendant l'infection dans les 3 climats et les 3 accessions (588 gènes). Nous appellerons ces gènes les gènes CAIG (pour *Climate-Associated, Infection-induced Genes*). L'analyse de l'enrichissement en GO des gènes CAIG a montré un enrichissement en GO associées à la réponse aux stress. Nous pouvons par exemple observer les GO de la régulation de la réponse aux stress (GO :0080134), à la réponse aux champignons (GO :0009620) et à la réponse cellulaire à l'éthylène (GO :0071369) (**Figure 14B**).

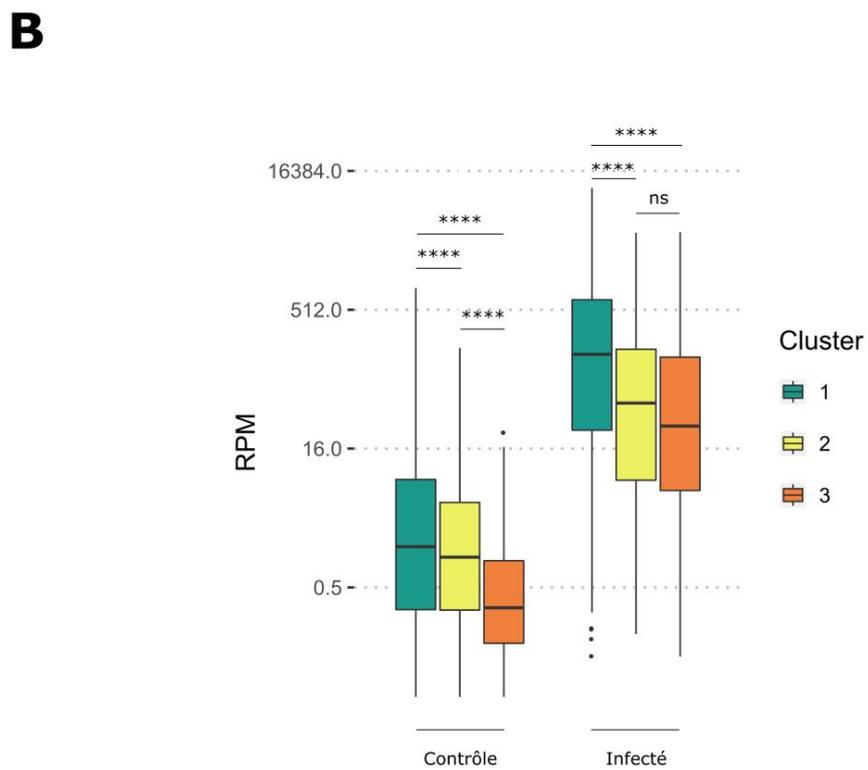
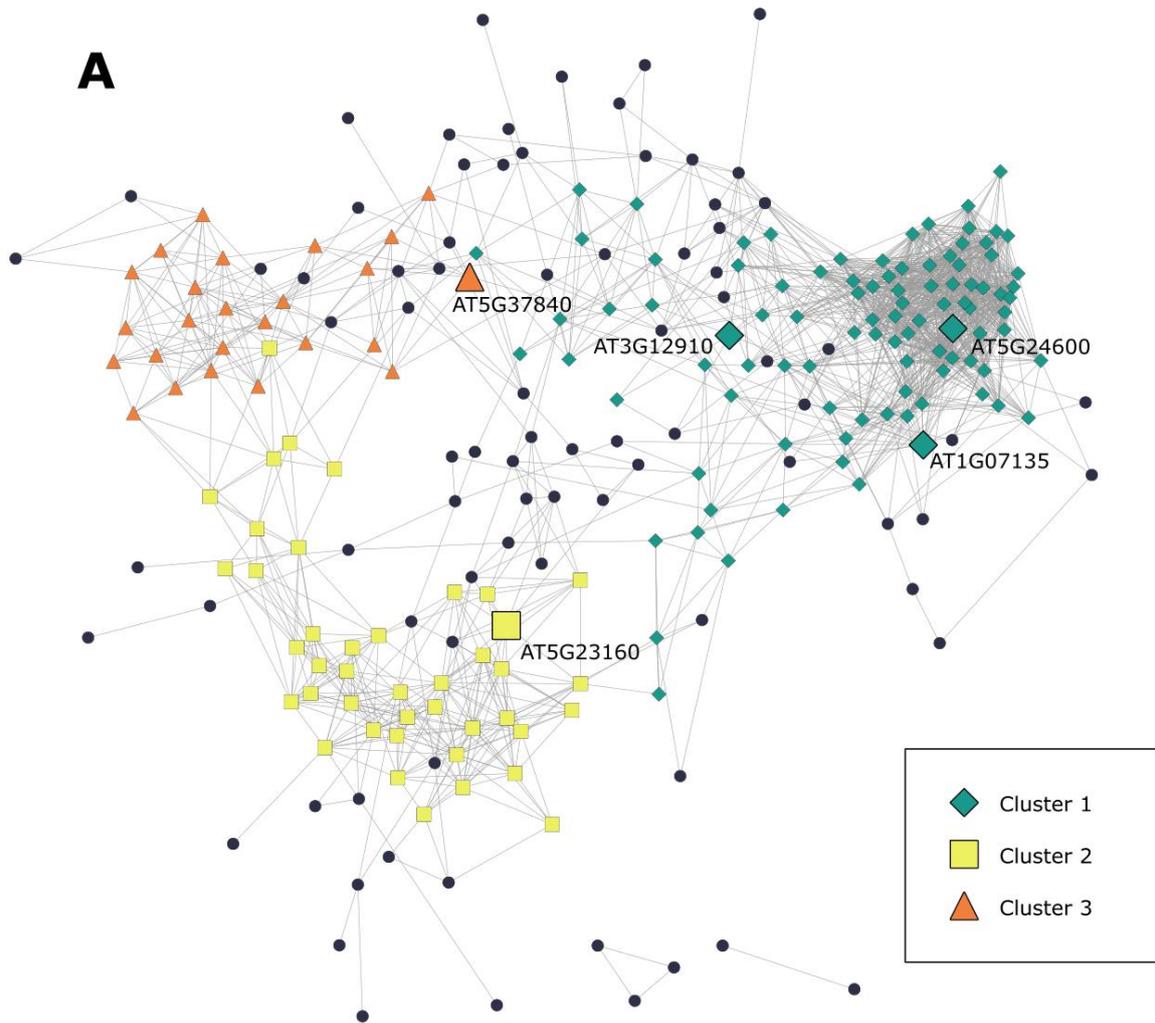
Au sein des gènes CAIG, de nombreux gènes associés à la réponse aux stress biotiques et abiotiques ont pu être identifiés. On retrouve notamment un groupe de gènes des familles BON (Bonzai) et BAP (*BON Associated Protein*), les gènes BON1, BON3 et BAP2, associés à l'inhibition de la sénescence, à la défense des plantes et à la régulation de la croissance par la température (Li et al., 2009; Yang and Hua, 2004; Yang et al., 2007, 2006), 4 gènes de la famille PADRE impliquée dans la réponse aux pathogènes fongiques (Didelon et al., 2020) et aux stress abiotiques (Leng et al., 2021; Yang et al., 2020), le gène POQR, précédemment identifié comme un acteur de la QDR à *S. sclerotiorum* (Badet et al., 2017), le gène *senescence-associated 13* impliqué dans la régulation de la sénescence et permettant une meilleure résistance au champignon nécrotrophe *B. cinerea* (Dhar et al., 2020), ainsi que des membres de familles de facteurs de transcription impliqués dans la réponse aux stress biotiques et abiotiques tels que 6 membres de la famille des facteurs de transcription ERF/AP2 (Gutterson and Reuber, 2004; Wu et al., 2015) et 3 gènes de la famille des facteurs de transcription NAC (Nuruzzaman et al., 2013). Les gènes CAIG représentent ainsi une sélection diversifiée de nombreux gènes induits en réponse à *S. sclerotiorum* et dont l'expression est modulée par le climat.



**Figure 14 : Analyse différentielle de l'expression des gènes en fonction du climat et analyse d'enrichissement en GO de la sélection de gènes.** **A** : Pourcentage de DEG observés via l'analyse de l'expression différentielle des gènes pendant l'infection, en comparant les plantes ayant été cultivées dans différents climats, pour chaque accession. Les barres bleues correspondent aux gènes sous-exprimés ( $LFC < 1,5$ ) et les barres rouges correspondent aux gènes surexprimés ( $LFC > 1,5$ ). Sous le nom des accessions est indiqué le pourcentage de DEG total par condition et par accession. « Tous » représente la moyenne des DEG totaux, surexprimés ou sous-exprimés de toutes les accessions dans toutes les conditions. « Intermédiaire » correspond au climat Cfa, « Chaud » au climat Csa et « Froid » au climat Dfb. **B** : Processus de sélection des gènes dont l'expression est modulée par l'infection et par le climat. DEG ↑ signifie DEG surexprimés. **C** : Analyse d'enrichissement en GO de la sélection de 264 gènes grâce au système de classification PANTHER. La taille des points indique le nombre de gènes de la sélection associés à chaque GO, la couleur des points indique la p-valeur après correction par Bonferroni pour comparaisons multiples et en x est indiqué le taux d'enrichissement de chaque GO dans la sélection par rapport au génome d'*A. thaliana*.

Le cluster 2 regroupe des gènes dont l'expression est modulée par le climat indépendamment du génotype.

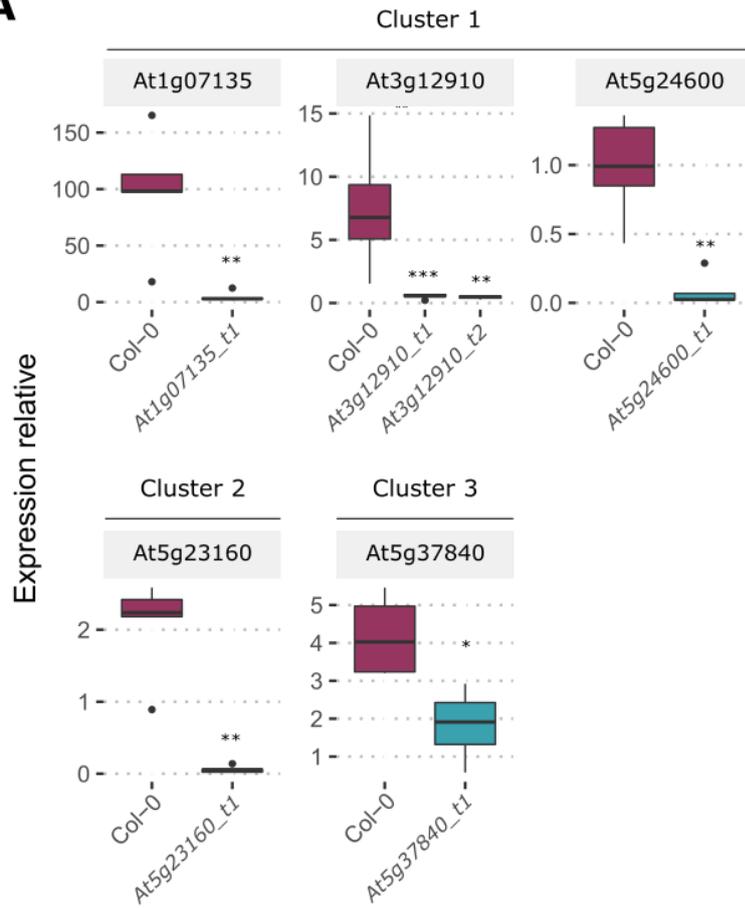
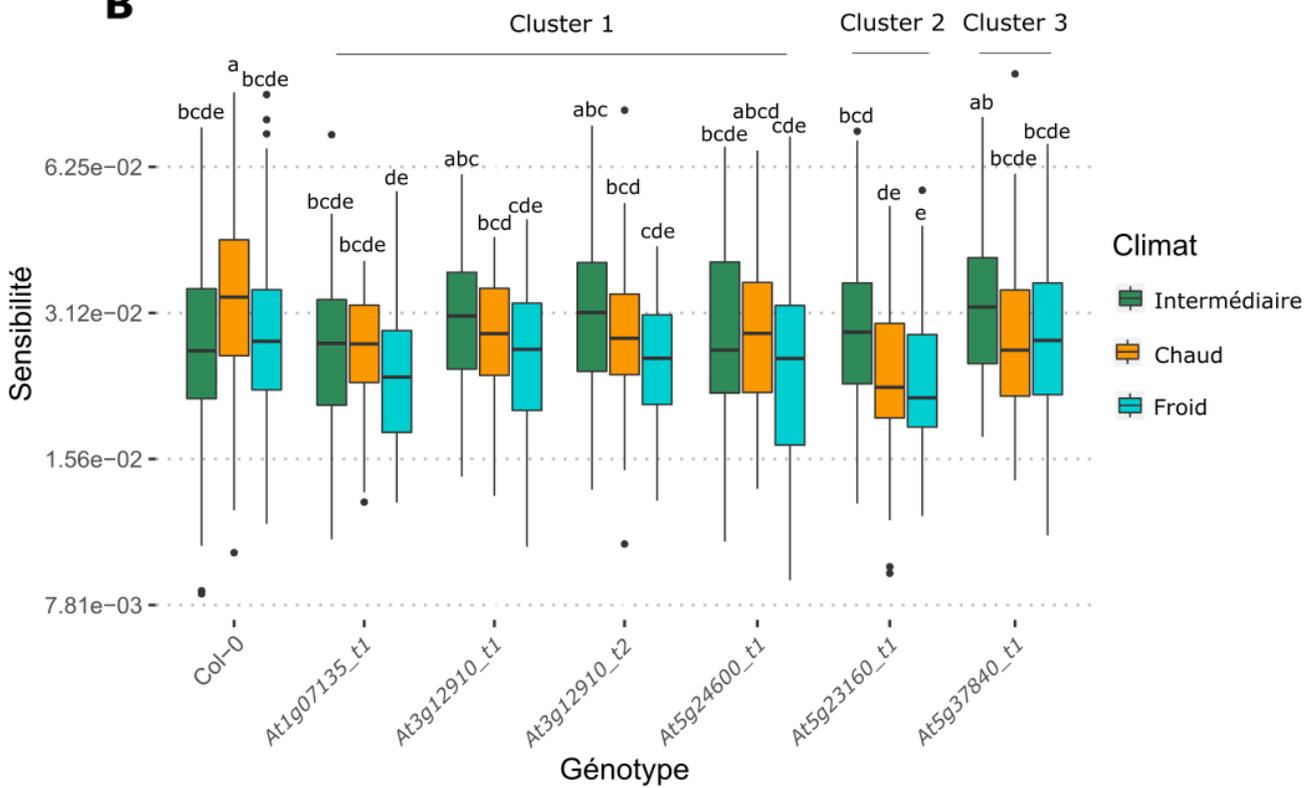
Afin de déterminer les relations d'expression entre les gènes CAIG, nous avons réalisé un réseau de co-expression. Pour cela, nous avons généré une matrice de corrélation comparant l'expression de chaque gène CAIG deux à deux. Le coefficient de corrélation de Pearson a été calculé en comparant le nombre de lectures (*reads*) des gènes dans chaque condition. Nous avons ensuite sélectionné uniquement les corrélations dont le coefficient était supérieur à 0,9. Les gènes CAIG ayant été sélectionnés notamment pour leur forte induction en réponse à l'infection, toutes les corrélations étaient positives à l'exception de deux pour lesquelles le coefficient était négatif et proche de 0. Afin d'identifier les groupes de gènes dont les expressions sont similaires, nous avons réalisé un *clustering* hiérarchique des gènes grâce à l'algorithme HCPIN de l'extension Cytocuster de Cytoscape (Li et al., 2017). Nous avons ainsi généré un réseau de corrélation organisé autour de 3 clusters principaux (nombre de gènes > 10) (**Figure 15A**). Par construction, les gènes composant un cluster ont des expressions plus corrélées que celles des gènes des autres clusters. Le cluster 1 était le cluster contenant le plus de gènes avec 97 gènes, le cluster 2 contenait 42 gènes et le cluster 3 en contenait 25. Afin de comprendre les caractéristiques réunissant les gènes dans chacun des clusters, nous avons réalisé une ANOVA de type III. Les clusters 1 et 3 apparaissent composés de gènes dont l'expression est induite par l'infection ( $p$ -value =  $7,82 \cdot 10^{-154}$  et  $1,07 \cdot 10^{-34}$ , respectivement) et modulée par le climat ( $p$ -value =  $2,68 \cdot 10^{-8}$  et  $1,37 \cdot 10^{-10}$ , respectivement), différemment dans chaque génotype ( $p$ -value intersection génotype et climat =  $5,74 \cdot 10^{-4}$  et  $5,84 \cdot 10^{-4}$ , respectivement). Le cluster 2, quant à lui, est composé de gènes dont l'expression est induite par l'infection ( $p$ -value =  $1,30 \cdot 10^{-64}$ ) et modulée par le climat ( $p$ -value =  $8,60 \cdot 10^{-8}$ ) de manière similaire pour les trois génotypes ( $p$ -value intersection génotype et climat > 0,05). Par ailleurs, l'observation des RPM (*Reads Per Million*) des gènes de chaque cluster en fonction de l'infection montre que les gènes du cluster 1 étaient fortement plus exprimés que ceux du cluster 3 à la fois dans les tissus non-infectés et infectés (**Figure 15**). Ainsi, ces résultats nous permettent d'identifier le cluster 2, comme un sous-groupe des gènes CAIG dont l'expression est modulée par le climat indépendamment du génotype. Les gènes du cluster 2 seraient des gènes d'un mécanisme global de défense dépendant du climat.



**Figure 15 : Le réseau de corrélation s'organise en 3 clusters principaux. A :** Réseau de corrélation des gènes. Chaque nœud représente un gène. Chaque arête représente une corrélation d'expression entre deux gènes dont le coefficient de corrélation est supérieur à 0,9, la longueur de l'arête correspond à la valeur du coefficient de corrélation. Les gènes du cluster 1 sont représentés par des losanges verts, les gènes du cluster 2 par des carrés jaunes, les gènes du cluster 3 par des triangles oranges et les gènes du réseau qui ne font pas partie d'un cluster sont représentés par un point noir. Les gènes candidats pour la suite de l'étude sont indiqués par un nœud de plus grande taille et leur nom. **B :** Comparaison des RPM entre le cluster 1 (en vert), le cluster 2 (en jaune) le cluster 3 (en orange). L'axe y représente les RPM en log2 pour les trois accessions et les trois climats. La significativité des résultats a été évaluée avec le test de Wilcoxon : \* :  $p \leq 0,05$  ; \*\* :  $p \leq 0,01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$  ; \*\*\*\* :  $p \leq 0,0001$  ; ns :  $p > 0,05$ .

Les gènes CAIG candidats sont des gènes de sensibilité à *S. sclerotiorum* dans le climat le plus chaud.

Afin d'étudier le rôle des gènes CAIG de chaque cluster de co-expression sur la résistance d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum* en fonction du climat, nous avons choisi trois gènes dans le cluster 1 (*At1g07135*, *At3g12910* et *At5g24600*), un gène dans le cluster 2 (*At5g23160*) et un gène dans le cluster 3 (*At5g37840*) (**Figure 15A**). Pour chaque gène, nous avons sélectionné un ou plusieurs mutants par insertion d'ADN-T de la librairie SALK dans l'accession Col-0. La validation de chaque mutant par insertion s'est faite par mesure de l'expression relative des gènes candidats pendant l'infection par *S. sclerotiorum* par RT-qPCR. Tous les mutants présentaient une expression relative réduite du gène candidat muté par rapport à Col-0 (**Figure 16A**). Nous avons ensuite analysé le phénotype de sensibilité des mutants en réponse à *S. sclerotiorum* en fonction du climat grâce à la technique de phénotypage automatique à résolution temporelle (Barbacci et al., 2020). Tous les mutants ont montré un phénotype significativement plus sensible que l'accession Col-0 à *S. sclerotiorum* après avoir été cultivés dans le climat chaud (**Figure 16B**). Les phénotypes de sensibilité étaient plus diversifiés concernant les climat intermédiaire et froid. Dans le climat intermédiaire, les mutants de deux des gènes du cluster 1 (*At1g07135* et *At5g24600*) avaient un phénotype de sensibilité identique à celui de Col-0 (**Figure 16B**). Les mutants des gènes du cluster 2, du cluster 3 et *At3g12910* (cluster 1) étaient plus sensibles que Col-0 (**Figure 16B**). Dans le climat froid, les mutants des gènes des clusters 1 et 2 étaient plus résistants que Col-0. Le mutant du gène du cluster 3 avait un phénotype de sensibilité identique à celui de Col-0 (**Figure 16B**). Selon les résultats, les gènes candidats sont tous des facteurs de sensibilité à *S. sclerotiorum* dans le climat chaud. Les gènes représentants des clusters 1 et 2 sont également de potentiels facteurs de sensibilité à *S. sclerotiorum* pour les plantes ayant été cultivées dans le climat froid. Enfin, les gènes représentants des clusters 2 et 3, et *At3g12910* (cluster 1) sont de potentiels facteurs de résistance à *S. sclerotiorum* pour les plantes ayant été cultivées dans le climat intermédiaire. De plus, deux mutants étaient disponibles pour le gène *At3g12910* (cluster1),

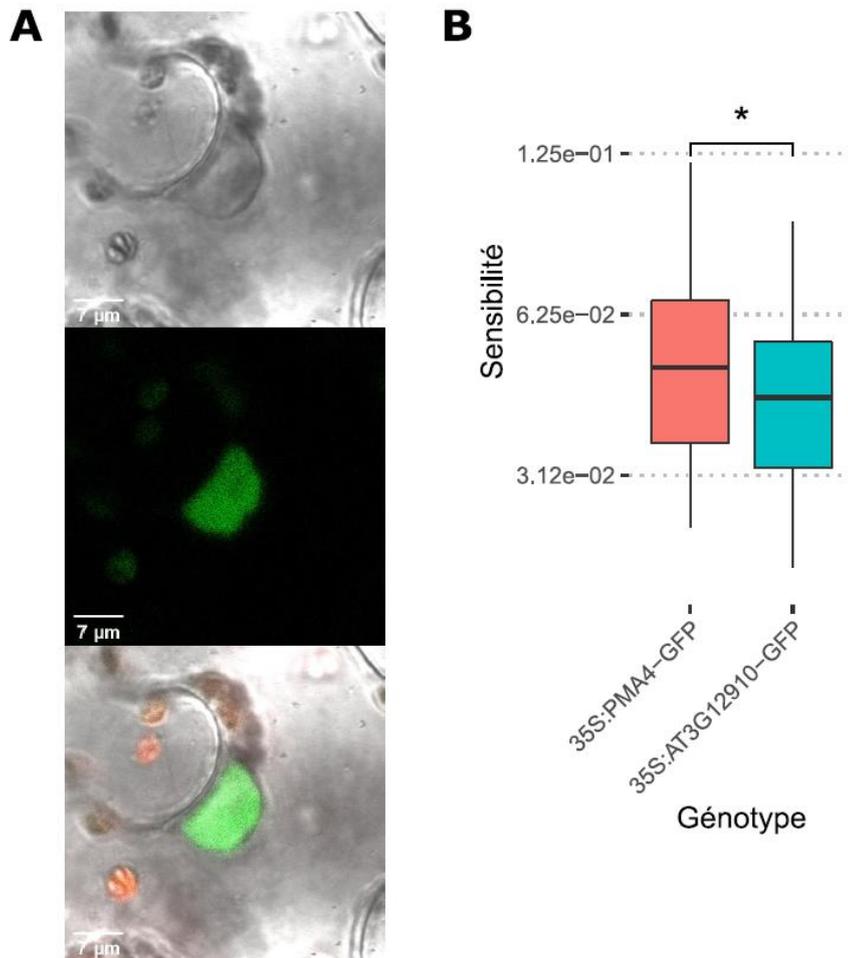
**A****B**

**Figure 16 : Les mutants des gènes candidats sont tous plus résistants après avoir été cultivés dans le climat chaud. A :** Expression relative des gènes par rapport au gène de référence *At2g28390*. Expression relative dans l'accension sauvage Col-0 en violet et dans les lignées mutantes par insertion d'ADN-T SALK en bleu. La significativité des résultats a été évaluée avec le test de Wilcoxon : \* :  $p \leq 0,05$  ; \*\* :  $p \leq 0,01$  ; \*\*\* :  $p \leq 0,001$ . **B :** Boîte à moustaches représentant le phénotype de sensibilité de l'accension sauvage Col-0 et des lignées mutantes par insertion d'ADN-T SALK en réponse à l'infection par *S. sclerotiorum*. Le phénotype de sensibilité des plantes ayant été cultivées dans le climat Cfa est représenté en vert, celui des plantes cultivées dans le climat Csa en orange et celui des plantes cultivées dans le climat Dfb en bleu. Chaque expérience a été répétée au moins 3 fois et la significativité des résultats a été évaluée par une ANOVA suivie d'un test de Tukey HSD. « Intermédiaire » correspond au climat Cfa, « Chaud » au climat Csa et « Froid » au climat Dfb.

*At3g12910\_t1* et *At3g12910\_t2*. Les deux mutants avaient le même phénotype de sensibilité en réponse à l'infection par *S. sclerotiorum* (**Figure 16B**), ce qui valide l'impact du gène *At3g12910* dans le phénotype de sensibilité de Col-0 en réponse à l'infection par *S. sclerotiorum*. Ces résultats montrent ainsi d'une part que tous les gènes testés, quel que soit leur cluster d'appartenance, sont impliqués dans la réponse à *S. sclerotiorum* et qu'en fonction du climat des phénotypes différents sont observés pour les mutants de chaque cluster. Les résultats montrent d'autre part que tous les gènes sélectionnés pour représenter les différents clusters sont impliqués dans la diminution de la résistance quantitative des plantes en réponse à l'augmentation des températures.

AT3G12910 est localisé dans le noyau chez *N. benthamiana* et sa surexpression entraîne une meilleure résistance à l'infection par *S. sclerotiorum*

Parmi les gènes représentant les clusters de co-expression, nous avons pu valider l'implication du gène *At3g12910* (cluster 1) grâce au phénotypage de deux mutants (*At3g12910\_t1* et *At3g12910\_t2*). Étonnamment, les phénotypes des mutants étaient plus résistants dans les climats les plus extrêmes (chaud et froid) mais plus sensibles dans le climat intermédiaire (**Figure 16B**). Ces résultats suggèrent une implication différentielle d'*At3g12910* dans la résistance en fonction du climat. De plus, ce gène appartient à la famille des facteurs de transcription NAC, dont plusieurs autres membres sont impliqués dans les mécanismes de réponse aux pathogènes et aux stress abiotiques (Nuruzzaman et al., 2013). Son homologue le plus proche est ANAC042, impliqué dans la tolérance au chaud et à la sécheresse (Ebrahimian-Motlagh et al., 2017; Shahnejat-Bushehri et al., 2012), dans les mécanismes de sénescence (Wu et al., 2012; Zhang et al., 2021) et dans la résistance à *A. brassicicola* via la voie de biosynthèse de la camalexine (Saga et al., 2012). Ces données



**Figure 17 : Localisation nucléaire de AT3G12910-GFP et augmentation de la résistance à *S. sclerotiorum*.** **A** : Observation au microscope confocal (X 25) d'un tissu épidermique de *N. benthamiana* exprimant la construction 35S:AT3G12910-GFP. L'image du haut représente le tissu sous lumière blanche, l'image du milieu la GFP et l'image du bas est la fusion de la lumière blanche, de la GFP et de l'auto-fluorescence des cellules. **B** : Phénotype de sensibilité de feuilles de *N. benthamiana* exprimant la construction 35S:AT3G12910-GFP ou la 35S:PMA4-GFP pour le contrôle négatif, en réponse à l'infection par *S. sclerotiorum*. L'expérience a été répétée trois fois, une des expériences est représentée ici pour illustration. La significativité des résultats a été évaluée par un test de Wilcoxon, \* :  $p < 0,05$ .

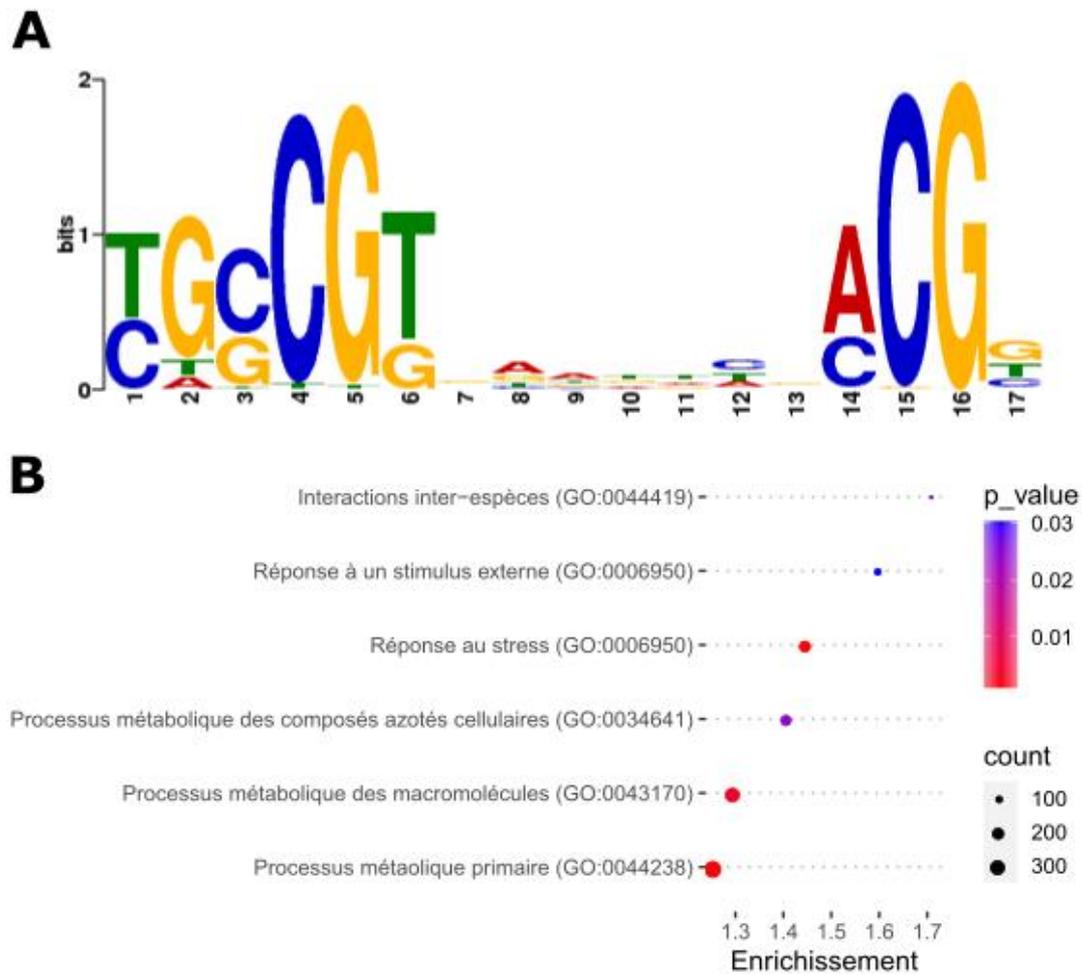
présentent ainsi *At3g12910* comme un candidat de choix pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la modulation de la résistance quantitative en fonction du climat.

Afin de comprendre les mécanismes impliquant *At3g12910* dans la résistance quantitative dépendante du climat, nous avons créé des plasmides permettant d'exprimer constitutivement *in planta* une protéine de fusion entre AT3G12910 et une étiquette GFP (*Green Fluorescence Protein*) en N-terminal ou en C-terminal. Les feuilles de *N. benthamiana* ont ensuite été agro-infectées avec les *Agrobacterium tumefaciens* possédant les plasmides permettant l'expression de la protéine de fusion. L'observation des feuilles de *N. benthamiana* au microscope confocal (X 25) a montré que la protéine de fusion AT3G12910-GFP était localisée dans le noyau (**Figure 17A**). Les feuilles de *N. benthamiana* exprimant la protéine de fusion AT3G12910-GFP ont par ailleurs été infectées avec *S. sclerotiorum*. L'analyse des phénotypes a montré que les feuilles de *N. benthamiana* surexprimant la protéine de fusion AT3G12910-GFP étaient plus résistantes à l'infection par *S. sclerotiorum* que celles du contrôle négatif (35S : PMA4-GFP) (**Figure 17B**). Ces résultats montrent d'une part que la protéine de fusion AT3G12910-GFP a une localisation nucléaire. Ceci est cohérent avec la putative fonction de facteur de transcription de la protéine AT3G12910. Ces résultats valident d'autre part l'implication d'AT3G12910 dans les mécanismes de défense de la plante en réponse à *S. sclerotiorum*.

### Les cibles potentielles d'AT3G12910 sont des gènes associés aux stress.

Par homologie, AT3G12910, est décrit comme un membre de la famille des facteurs de transcription NAC. Le cistrome est l'ensemble des sites de liaison à l'ADN (éléments cis) des facteurs de transcription d'un organisme. Dans le but de définir le cistrome d'*A. thaliana*, une étude a réalisé un DAP-seq (*DNA Affinity Purification sequencing*) déterminant ainsi le motif de liaison à l'ADN d'un grand nombre des facteurs de transcription d'*A. thaliana*, dont AT3G12910 (O'Malley et al., 2016b)(**Figure 18A**). Afin de connaître les cibles potentielles d'AT3G12910, nous avons identifié tous les sites de liaison potentiels d'AT3G12910 dans les promoteurs (1 kb avant le codon d'initiation de la traduction) des gènes d'*A. thaliana* selon le motif identifié par O'Malley et al et grâce à l'outil FIMO (Grant et al., 2011). FIMO est un outil permettant de scanner une base de données de séquences afin d'identifier chacune des correspondances avec le motif de liaison à l'ADN fourni. L'analyse a extrait un total de 2276 sites de liaisons potentiels dans 1795 promoteurs de gènes différents. Un maximum de 5 sites de liaison potentiels a été identifié par promoteur. Afin de discerner une tendance dans les mécanismes dans lesquels sont impliqués les cibles potentielles d'AT3G12910, nous avons réalisé une analyse d'enrichissement en GO des gènes dont le promoteur est ciblé par AT3G12910. Cette analyse nous a montré que les gènes ciblés étaient impliqués dans la réponse aux stress et aux stimuli externes (GO : 0044419 et 0006950) ainsi qu'à des processus métaboliques (GO : 00334641, 0043170 et 0044238) (**Figure 18B**). Parmi les 1795 gènes identifiés comme potentiels cibles d'AT3G12910, 9 gènes faisaient partie du réseau de co-expression des gènes CAIG (**Figure 15A**), dont 4 appartenant au cluster 1, 2 au cluster 2 et 3 n'appartenant à aucun des trois clusters (**Tableau 3**). Parmi les gènes cibles appartenant au cluster 1 on distingue une LRR kinase (*At1g56130*), une bêta-1,4-xylosidase et deux gènes du

cytochrome P450 dont un particulièrement décrit pour son implication dans les voies de biosynthèse de l’auxine, de la camalexine et des glucosinolates d’indole (*At3g26200* et *At4g39950*, Glawischnig et al., 2004; Mikkelsen et al., 2000; Zhao et al., 2002). Nous pouvons donc imaginer qu’AT3G12910 régule l’expression de gènes impliqués à la fois dans la perception et dans des voies métaboliques permettant une résistance en fonction du climat.



**Figure 18 : Les cibles potentielles d’AT3G12910 sont impliquées dans la réponse au stress et dans le métabolisme.** A : Motif de liaison à l’ADN d’AT3G12910. Source : O’Malley et al., 2016. B : Analyse d’enrichissement en GO des potentiels gènes cibles d’AT3G12910 grâce au système de classification PANTHER. La taille des points indique le nombre de gènes de la sélection associés à chaque GO, la couleur des points indique la p-valeur après correction par Bonferroni pour comparaisons multiples et en x est indiqué le taux d’enrichissement de chaque GO dans la sélection par rapport au génome d’*A. thaliana*.

Gène	Début	Fin	Brin	P. value	Séquence	Cluster	Nom : Description
At1g07795	2414153	2414169	-	5.20E-05	TTCCGGGTCGTCT CCGT	X	Protéine forkhead box G1
At1g10040	3278987	3279003	-	3.58E-05	TGTCGTGCTTTCG ACGT	2	Alpha/beta-hydrolase
At1g10040	3278651	3278667	-	5.04E-05	TGGCGTTCAACG ACGA	2	Alpha/beta-hydrolase
At1g10040	3278649	3278665	+	9.01E-05	TGTCGTGTTGAA ACGC	2	Alpha/beta-hydrolase
At1g56130	21001131	21001147	+	3.05E-05	TGCTGTGTCAACG ACGG	1	Kinase transmembranaire LRR ( <i>Leucin-Rich Repeat</i> )
At3g09010	2749357	2749373	+	2.45E-05	CAGCGTAGTGAT GACGT	2	Kinase
At3g19210	6659287	6659303	-	9.03E-06	CGGCGGCGCGGC AACGG	X	AtRAD54 : ATPase participant à la réparation de l'ADN par recombinaison homologue.
At3g19210	6659285	6659301	+	6.75E-05	CTCCGTTGCCGCG CCGC	X	AtRAD54 : ATPase participant à la réparation de l'ADN par recombinaison homologue.
At3g19615	6815831	6815847	-	1.55E-05	TGGCGTGCCACT GACGC	1	Bêta-1,4-xylosidase
At3g19615	6815829	6815845	+	6.46E-05	TTGCGTCAGTGGC ACGC	1	Bêta-1,4-xylosidase
At3g26200	9588983	9588999	-	2.63E-05	CACCGTCATATCT CCGT	1	CYP71B22 : Protéine putative du cytochrome P450.
At4g39950	18524163	18524179	-	9.68E-06	CGCCGTTTAAGCT CCGT	1	CYP79B2 : Protéine du cytochrome 450 impliquée dans le métabolisme du tryptophane.
At5g65510	26185402	26185418	+	7.87E-05	CTCCGTTTCACG CCGG	X	AIL7

**Tableau 3 : Sites de liaison à l'ADN de AT3G12910 dans les promoteurs des gènes du réseau de co-expression.**

## Discussion

Une simulation du réchauffement climatique a montré une augmentation de la sensibilité des plantes dans un climat chaud.

Beaucoup de recherches étudiant l'impact du changement climatique sur les plantes et leur résistance aux pathogènes simule le réchauffement climatique par une augmentation temporaire des températures. Dans ce chapitre nous avons simulé le réchauffement climatique. Pour cela nous avons établi des conditions de culture représentant une évolution des températures jour/nuit en accord avec les prédictions du réchauffement climatique. L'analyse des modifications de la répartition des climats de Köppen-Geiger dues au réchauffement climatique a montré que depuis les années 1980, les climats tempérés avec un été sec (Cs) ont graduellement remplacé des zones au climat tempéré humide (Cf) (Cui et al., 2021a). Le climat tempéré humide avec des étés chauds (Cfa) reste le climat tempéré le plus représenté aujourd'hui. Selon les prédictions, le climat Cfa pourrait remplacer une partie des climats boréaux humides (Df) d'ici la fin du siècle (Beck et al., 2018; Cui et al., 2021a). Enfin, une grande partie des climats tempérés aux étés froids (Csc, Cwc et Cfc) devrait être remplacée par des climats tempérés aux étés chauds (Csa, Cwa et Cfa) (Mahlstein et al., 2013; Rohli et al., 2015). Nous avons ainsi choisi de simuler 3 climats représentant ces changements, les climats Dfb, Cfa et Csa (froid, intermédiaire et chaud) avec des températures de jour et de nuit correspondant aux moyennes sur 30 ans du mois d'avril dans des localisations possédant ces climats (**Tableau 2**). Le réchauffement climatique induit un décalage géographique des climats vers les pôles. Des décalages significatifs ont été observés pour les climats tempérés (C), boréaux (D) et polaires (E) avec des moyennes de respectivement 35,4, 16,2 et 12,6 km.décennie<sup>-1</sup> (ou respectivement 0,32, 0,15 et 0,11 ° de latitude.décennie<sup>-1</sup>). Les prédictions indiquent une accélération de ces décalages géographiques dans les prochaines décennies (Chan and Wu, 2015; Cui et al., 2021a). Ainsi, afin de représenter les variations de photopériode au sein d'un climat et celles induites par les décalages des climats vers les pôles, nous avons implémenté des variations de durée de jour et de nuit entre les différentes conditions de culture représentatives des différents climats (**Tableau 2**).

L'analyse phénotypique des trois accessions naturelles d'*A. thaliana* Col-0, Sha et Rld-2 après avoir été cultivées dans les trois climats et infectées par *S. sclerotiorum* a montré que les trois accessions étaient plus sensibles à l'infection après avoir été cultivées dans le climat chaud (**Figure 12**). Avec les données à notre disposition, nous ne pouvons pas affirmer si cette différence de phénotype est liée aux températures diurnes, aux températures nocturnes, à la photopériode utilisée ou à une combinaison des trois. Des climats intermédiaires pourraient être imaginés afin de comprendre l'impact de chacun de ces facteurs individuellement. Nos résultats permettent actuellement toutefois de conclure que dans les conditions moyennes d'un mois d'avril, le climat tempéré aux étés chauds et secs (Csa) induit une plus grande sensibilité des accessions d'*A. thaliana* observées à *S. sclerotiorum*. Les prédictions annoncent une augmentation de l'aire géographique du climat Csa d'ici la fin du siècle, due au réchauffement climatique (Cui et al., 2021b). Ainsi, il est urgent d'améliorer notre compréhension des mécanismes de défense des plantes dépendants du climat.

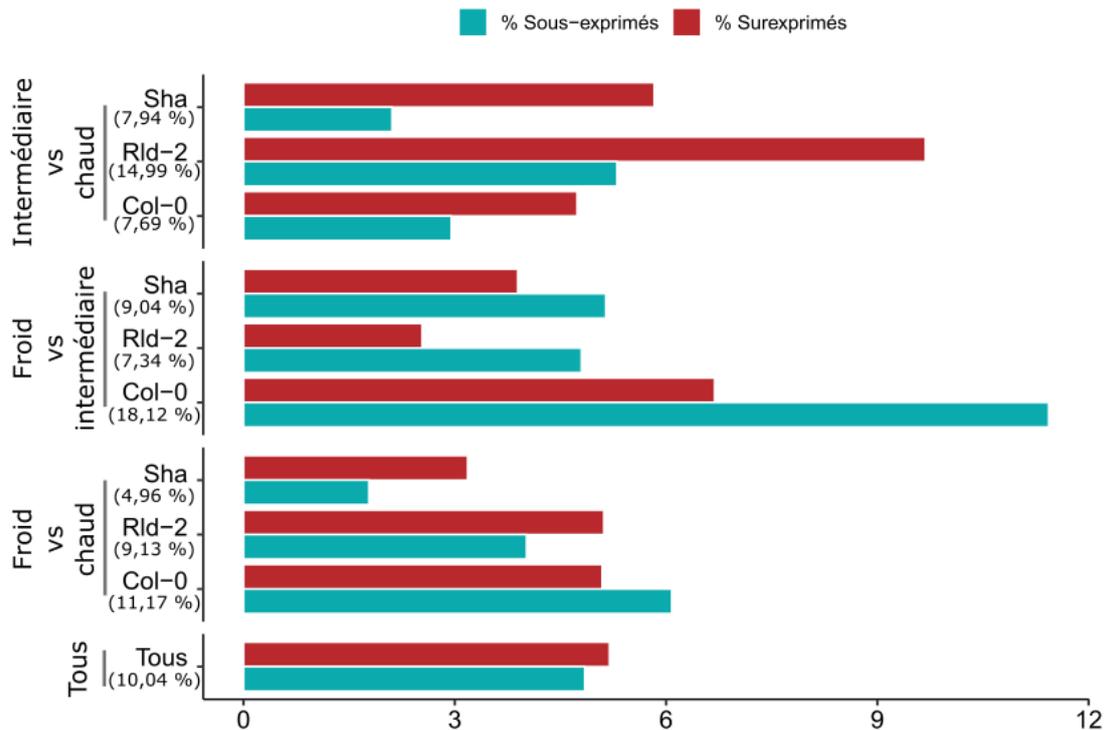
L'infection entraîne une reprogrammation transcriptomique plus importante que le climat.

Un séquençage des ARN a été réalisé sur les trois accessions naturelles d'*A. thaliana* après avoir été cultivées dans les trois climats, avec des échantillons de feuilles contrôles ou infectées par *S. sclerotiorum*. Une double analyse d'expression différentielle des gènes nous a permis d'évaluer indépendamment l'effet de l'infection et celui du climat. Ces analyses ont montré que l'infection entraînait en moyenne 28,27 % de DEG (**Figure 13A**) tandis que la comparaison de la réponse à l'infection entre les climats entraînait en moyenne 4,55 % de DEG (**Figure 14A**). A titre de comparaison, nous avons également réalisé l'analyse d'expression différentielle des échantillons contrôle entre les climats. Une moyenne de 10,04 % de DEG est observée (**Figure 19**). Ces résultats montrent ainsi que l'infection entraîne une reprogrammation transcriptionnelle beaucoup plus large que le climat dans lequel les plantes sont cultivées.

Par ailleurs, on observe que les trois accessions d'*A. thaliana* présentaient un pourcentage de DEG similaire en réponse à l'infection après avoir été cultivées dans le climat intermédiaire, tandis que Sha présentait un pourcentage de DEG supérieur à Col-0 et Rld-2 dans le climat chaud (respectivement 31,09 % contre 23,65 % et 19,73 %, **Figure 13A**) et que Rld-2 présentait un pourcentage de DEG supérieur à Col-0 et Sha en réponse à l'infection après avoir été cultivées dans le climat froid (respectivement 32,31 % contre 26,38 % et 25,68 %, **Figure 13A**). Sachant que Sha est originaire d'une région de climat chaud et Rld-2 d'une région de climat froid, on peut alors imaginer que le pourcentage de DEG en réponse à l'infection est plus faible lorsque les plantes ont été cultivées dans des conditions drastiquement éloignées de leur climat d'origine. En suivant cette logique, les conditions de cultures utilisées pour le climat intermédiaire pourraient être considérées comme accommodantes pour la réponse à l'infection à *S. sclerotiorum* pour les trois accessions.

La sélection des gènes les plus surexprimés en réponse à l'infection par *S. sclerotiorum* dans toutes les accessions et dans tous les climats nous a permis d'obtenir une liste de 588 gènes (**Figure 13B**). L'analyse des enrichissements en GO de cette sélection de gènes a mis en évidence un grand nombre d'enrichissement en GO associées à la défense (**Figure 13C**). Les GO les plus enrichis sont celles de la biosynthèse de la camalexine (GO : 0010120) et du tryptophane (GO : 0000162). La camalexine est un métabolite secondaire antifongique produit par *A. thaliana* (Kusch et al., 2022; Stotz et al., 2011). Le tryptophane et le glutathion (GO : 0006749) sont des précurseurs de la camalexine et d'autres composés toxiques impliqués dans la défense d'*A. thaliana* (Dubreuil-Maurizi and Poinssot, 2012; Frerigmann et al., 2016; Geu-Flores et al., 2011; Glawischnig, 2007; Kosaka et al., 2021; Parisy et al., 2007; Sanchez-Vallet et al., 2010; Su et al., 2011). Parmi les GO enrichies on retrouve également 4 GO associées aux phytohormones (GO : 2000022, 0009850, 0071369 et 0009753), et 5 associées aux mécanismes généraux de la défense (GO : 0009611, 0045087, 0050832, 0042742 et 0031347). Ainsi, cette sélection des gènes les plus surexprimés en réponse à

l'infection par *S. sclerotiorum* dans toutes les accessions et dans tous les climats semble effectivement regrouper un grand nombre de gènes associés à la défense d'*A. thaliana*.



**Figure 19 : Analyse différentielle de l'expression des gènes en fonction du climat dans les échantillons contrôles.** Pourcentage de DEG observés via l'analyse de l'expression différentielle des gènes pendant l'infection, en comparant les plantes ayant été cultivées dans différents climats, pour chaque accession. Les barres bleues correspondent aux gènes sous-exprimés (LFC < 1,5) et les barres rouges correspondent aux gènes surexprimés (LFC > 1,5). Sous le nom des accessions est indiqué le pourcentage de DEG total par condition et par accession. « Tous » représente la moyenne des DEG totaux, surexprimés ou sous-exprimés de toutes les accessions dans toutes les conditions. « Intermédiaire » correspond au climat Cfa, « Chaud » au climat Csa et « Froid » au climat Dfb.

### Le réseau de co-expression des gènes CAIG est organisé en 3 clusters

La création d'un réseau de co-expression des gènes CAIG nous a permis d'observer les relations de co-expression existantes entre les gènes en fonction du climat, de l'infection et des accessions. Le regroupement de gènes partageant des similarités dans leur expression avec une méthode de clustering hiérarchique nous a permis de distinguer trois groupes (clusters) principaux (**Figure 15A**). Nous avons pu montrer que dans les 3 clusters l'expression des gènes dépendait de l'infection, de l'accession et du climat. Dans les clusters 1 et 3 l'expression des gènes était modulée par le climat en fonction du génotype tandis que dans le cluster 2, l'expression des gènes en fonction du climat était indépendante du génotype. La différence entre le cluster 1 et le cluster 3 se situait dans le niveau d'expression des gènes,

avec les gènes du cluster 1 globalement plus fortement exprimés que ceux du cluster 3 (**Figure 15B**). Une étude récente a montré qu'il existait un fort biais dans les analyses de co-expression de gènes, où les gènes fortement exprimés ont plus de chances d'être fortement corrélés (Wang et al., 2020). Cette étude propose alors une normalisation permettant de contourner ce biais. Ainsi, il serait intéressant de mettre en place cette normalisation dans ce réseau d'expression afin d'affiner la précision des corrélations décrites.

Les gènes candidats sont des facteurs de sensibilité à *S. sclerotiorum* dans le climat le plus chaud.

Cinq gènes candidats ont été sélectionnés afin de représenter les différents clusters de co-expression et d'étudier leur rôle dans les mécanismes de défense d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum* en fonction du climat. Nous avons choisi d'étudier plus en détail les gènes *At1g07135*, *At3g12910* et *At5g24600* pour le cluster 1, le gène *At5g23160* pour le cluster 2 et le gène *At5g37840* pour le cluster 3. L'analyse du phénotype de sensibilité des mutants des gènes candidats a montré que tous les gènes CAIG candidats sont des facteurs de sensibilité à *S. sclerotiorum* dans le climat chaud. Les gènes des clusters 1 et 2 sont également des facteurs de sensibilité à *S. sclerotiorum* dans le climat froid. A contrario, les gènes des clusters 2, 3 et *At3g12910* sont des facteurs de résistance à *S. sclerotiorum* dans le climat intermédiaire (**Figure 16B**). Cette analyse met en évidence que des gènes participant à la résistance dans un climat peuvent avoir un effet délétère sur la résistance dans un autre climat. Ceci est notamment observé pour *At3g12910* (cluster 1) et les gènes du cluster 2 qui sont des facteurs de résistance dans le climat intermédiaire mais qui sont des facteurs de sensibilité dans les climats les plus extrêmes.

Parmi les gènes CAIG candidats du cluster 1 nous avons *At1g07135*, apparaissant comme un facteur de sensibilité dans les climats les plus extrêmes (chaud et froid) (**Figure 16B**). *AT1G07135* est une protéine riche en glycine fortement associée aux GO de la défense (Depuydt and Vandepoele, 2021). L'expression d'*AT1G07135* est induite par le facteur de transcription MYB60 (Cominelli et al., 2005). L'expression de MYB60 est induite notamment en réponse au chaud et permet la régulation de l'ouverture des stomates (Cominelli et al., 2005; Oh et al., 2011; Song et al., 2014). Ainsi, le phénotype de résistance observé pour le mutant *At1g07135\_t1* après avoir été cultivé dans le climat le plus chaud (Csa) pourrait être expliqué par une altération de l'ouverture des stomates, impactant l'entrée de *S. sclerotiorum* dans le tissu végétal (Bolton et al., 2006; Jamaux et al., 1995; Lumsden, 1979). Cependant, nous avons observé dans nos données que le facteur de transcription MYB60 est sous-exprimé dans toutes les accessions et tous les climats en réponse à *S. sclerotiorum*. Par ailleurs, le facteur de transcription HY5 (*Elongated Hypocotyl 5*) est également capable d'induire l'expression d'*AT1G07135* (Lee et al., 2007). HY5 impliqué dans les mécanismes de défense d'*A. thaliana* à l'oomycète pathogène *Hyaloperonospora arabidopsidis* responsable du mildiou (Chen et al., 2021b; Lee et al., 2007). Nous avons cependant observé que HY5 n'était pas induit en réponse à *S. sclerotiorum* dans l'accession Col-0. Nous en concluons ainsi que l'expression climato-dépendante d'*AT1G07135* suite à l'infection par *S. sclerotiorum* dépend probablement d'un autre facteur de transcription, non identifié à ce jour. *At3g12910* est

également un des gènes candidats du cluster 1. Il apparaît comme un facteur de résistance dans le climat intermédiaire mais comme un facteur de sensibilité dans les climats les plus extrêmes (**Figure 16B**). AT3G12910 est une protéine de la grande famille des facteurs de transcription NAC. Son plus proche homologue est ANAC42, facteur de transcription NAC capable de conférer une meilleure tolérance au chaud et à la sécheresse (Ebrahimian-Motlagh et al., 2017; Shahnejat-Bushehri et al., 2012), de participer à la résistance à *A. brassicicola* en étant impliqué dans la biosynthèse de la camalexine (Saga et al., 2012) et de moduler les mécanismes de sénescence (Wu et al., 2012; Zhang et al., 2021). Nous pouvons ainsi imaginer que, comme ANAC42, AT3G12910 régule la transcription de gènes impliqués dans la défense mais d'une manière climato-dépendante. Enfin, At5g24600 est le dernier gène candidat du cluster 1. Il apparaît comme un facteur de sensibilité dans les climats les plus extrêmes (**Figure 16B**). AT5G24600 est une protéine de la famille de fonction inconnue DUF599. Elle est associée aux GO de la défense face aux champignons, de la réponse à l'hypoxie, à la lumière et à la sécheresse (Depuydt and Vandepoele, 2021). Elle est surexprimée en réponse au stress salin et au froid (Ma et al., 2006; Vergnolle et al., 2005). AT5G24600 présente des similarités avec les protéines composant les canaux ioniques TRP (*Transient Receptor Potential*) dans les cellules animales. Ces canaux ioniques sont activés en réponse à une variété de modifications de l'environnement cellulaire ou extérieur comme des variations de température, de pH, de la lumière ou de forces mécaniques (Benham et al., 2003; Clapham, 2003; Clapham et al., 2001; Xiong et al., 2004). Nous pouvons donc imaginer qu'AT5G24600 soit un facteur de sensibilité à *S. sclerotiorum* impliqué dans la perception des conditions environnementales et/ou de *S. sclerotiorum*.

Le gène CAIG candidat du cluster 2 était le gène At5g23160. Il apparaît comme un facteur de sensibilité dans tous les climats étudiés, avec toutefois une variabilité de son impact en fonction du climat (**Figure 16B**). AT523160 serait une protéine transmembranaire (Araport11), non étudiée à ce jour. L'absence d'étude la concernant rend difficile la formulation d'une hypothèse expliquant son rôle dans les mécanismes de défense climato-dépendants.

Enfin, le gène CAIG candidat du cluster 3 était le gène At5g37840. Il apparaît comme un facteur de résistance dans le climat intermédiaire et comme un facteur de sensibilité dans le climat chaud. (**Figure 16B**). AT5G37840 est une protéine de la famille PADRE, impliquée dans la réponse à *S. sclerotiorum* et aux stress abiotiques (Didelon et al., 2020; Yang et al., 2020). AT5G37840 est surexprimé en réponse au chaud et à plusieurs pathogènes tels que *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *Verticillium dahliae*, *A. brassicicola* et *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (Didelon et al., 2020). Nous pouvons ainsi formuler l'hypothèse que AT5G3740 est une protéine impliquée dans les mécanismes de défense climato-dépendant contre *S. sclerotiorum* et putativement d'autres pathogènes.

Le phénotypage des mutants des gènes CAIG candidats a montré que tous les gènes candidats étaient des facteurs de sensibilité à *S. sclerotiorum* dans le climat le plus chaud. Tous les gènes candidats sont des gènes pas ou peu étudiés. Afin de confirmer l'implication de ces gènes dans les mécanismes de défense climato-dépendants et de comprendre leur mode d'action, des constructions génétiques sont en cours de création. Comme pour *At3g12910*,

nous allons créer des plasmides afin de pouvoir analyser l'effet d'une surexpression de protéines de fusion (avec la GFP) de ces gènes sur la résistance et d'observer leur localisation subcellulaire.

### Les polymorphismes dans les gènes CAIG sont associés à des climats spécifiques

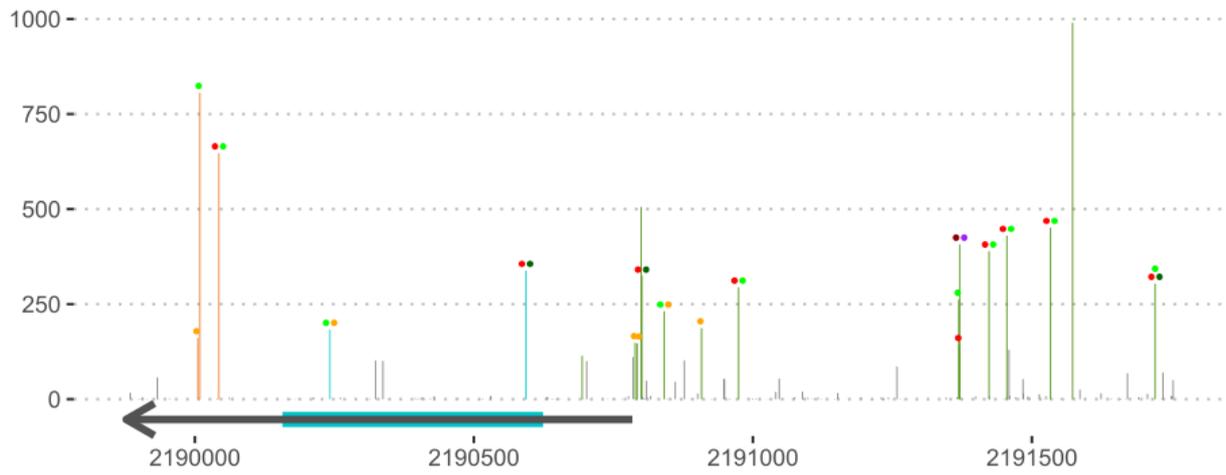
L'évolution tend à sélectionner les allèles de gènes apportant un avantage sélectif à une population. Ainsi, au cours de l'évolution des allèles différents peuvent être sélectionnés pour deux populations différentes vivant dans des environnements différents. *A. thaliana* est une espèce de plante largement répandue sur le globe et vivant sous une grande variété de climats différents. On peut ainsi imaginer que l'évolution a mené à la sélection d'allèles différents selon les climats sous-lesquels vivent différentes populations d'*A. thaliana*. Nous avons ainsi choisi d'explorer la diversité génétique des gènes candidats du réseau de co-expression CAIG afin de déterminer s'ils présentaient des preuves d'une sélection dirigée en fonction du climat. Nous avons ainsi réalisé une analyse préliminaire en vue de déterminer si les gènes candidats présentaient des polymorphismes associés à des climats. Pour cela, nous avons analysé les polymorphismes des gènes candidats pour 1131 accessions d'*A. thaliana* (Polymorph 1001, projet 1001 génomes, The 1001 Genomes Consortium, 2016), en les associant au climat de leur site de prélèvement (Köppen, 2011; Rubel and Kottek, 2010). Pour chaque polymorphisme présent dans au moins 10% des accessions, nous avons réalisé un test de proportions afin de déterminer si un des climats était surreprésenté au sein de ces polymorphismes (**Figure 20**). Les mutations synonymes dans la région codante des gènes ont été ignorées. Ces résultats mettent en évidence une variation du nombre de polymorphismes entre les gènes, avec le gène *At5g23160* comme étant celui en possédant le moins et *At5g37840* comme étant celui en possédant le plus. La majeure partie des polymorphismes présents dans plus de 10% des accessions présentait au moins un climat surreprésenté. Grâce à un second test de proportions, nous avons pu identifier que pour certains gènes, un des climats était majoritairement surreprésenté au sein des polymorphismes. Il s'agissait du climat Cfb pour *At3g12910* (cluster 1), du climat Dfb (climat froid) pour *At5g24600* (cluster 1) et Dfa pour *At5g37840* (cluster 3) (**Tableau 4**). Ces résultats indiquent que ces trois gènes pourraient avoir évolué des allèles spécifiques à certains climats. Il serait donc intéressant de tester l'effet de ces différents allèles en réponse à *S. sclerotiorum* dans différents climats. Le gène *At5g23160* présentait étonnamment très peu de polymorphismes avec seulement 5 polymorphismes présents dans plus de 10% des accessions dont 4 pour lesquels un climat était surreprésenté (**Figure 20**). Le gène *At5g23160* représente le cluster 2, cluster pour lequel l'expression des gènes en fonction du climat ne dépendait pas de l'accession. Un faible taux de polymorphismes entre les accessions pour les gènes du cluster 2 pourrait donc expliquer l'indépendance de l'expression en fonction du climat pour les accessions. Pour confirmer cette théorie, il serait intéressant d'observer le taux de polymorphismes pour les autres gènes des différents clusters afin de déterminer si les gènes du cluster 2 présentent significativement moins de polymorphismes que les gènes des autres clusters. Par ailleurs, le gène *At5g37840* présente étonnamment beaucoup (8) de polymorphismes sous la forme de SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) faux-sens (impliquant une modification d'un acide aminé de la protéine) (**Figure 20**). Ceci pourrait être le signe d'une dispensabilité du gène (Hirsh and

Fraser, 2001), cependant le gène semble être toujours actif, du moins chez l'accèsion Col-0 où le mutant présente un phénotype différent pendant l'infection par *S. sclerotiorum* (**Figure 16B**). Ces résultats nous permettent d'observer la représentation de chacun des polymorphismes dans les différents climats. La limite de cette analyse se situe dans la répartition non équilibrée des accessions au sein des climats. En effet les climats surreprésentés pour un polymorphisme peuvent être dus à une proximité géographique des accessions. Ces accessions ont alors plus de chances de partager un grand nombre de polymorphismes, influant sur le résultat de la surreprésentation des climats.

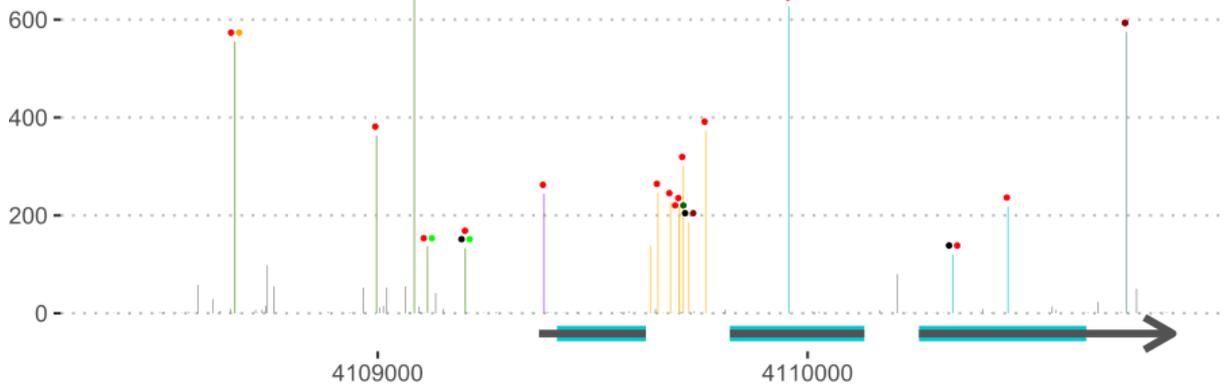
Gène (Cluster)	Polymorphismes	Polymorphismes avec climat surreprésenté	Promoteur	5' UTR	Exons	Introns	3'UTR	Climat surreprésenté
<b>At1g07135 (1)</b>	21	18	13	-	2	-	3	-
<b>At3g12910 (1)</b>	18	17	5	1	3	7	1	Cfb (p-value = $2,83.10^{-5}$ )
<b>At5g24600 (1)</b>	51	51	15	5	1	23	5	Dfb (p-value = $2,78.10^{-2}$ )
<b>At5g23160 (2)</b>	5	4	2	-	1	-	1	-
<b>At5g37840 (3)</b>	43	39	11	-	8	12	8	Dfa (p-value = $2,20.10^{-3}$ )

**Tableau 4 : Distribution des polymorphismes dans les gènes CAIG candidats.**

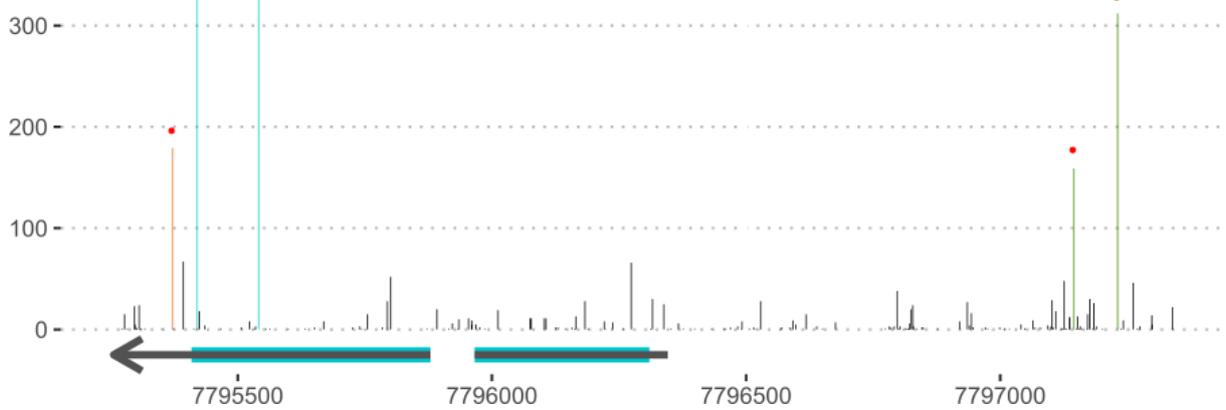
### At1g07135

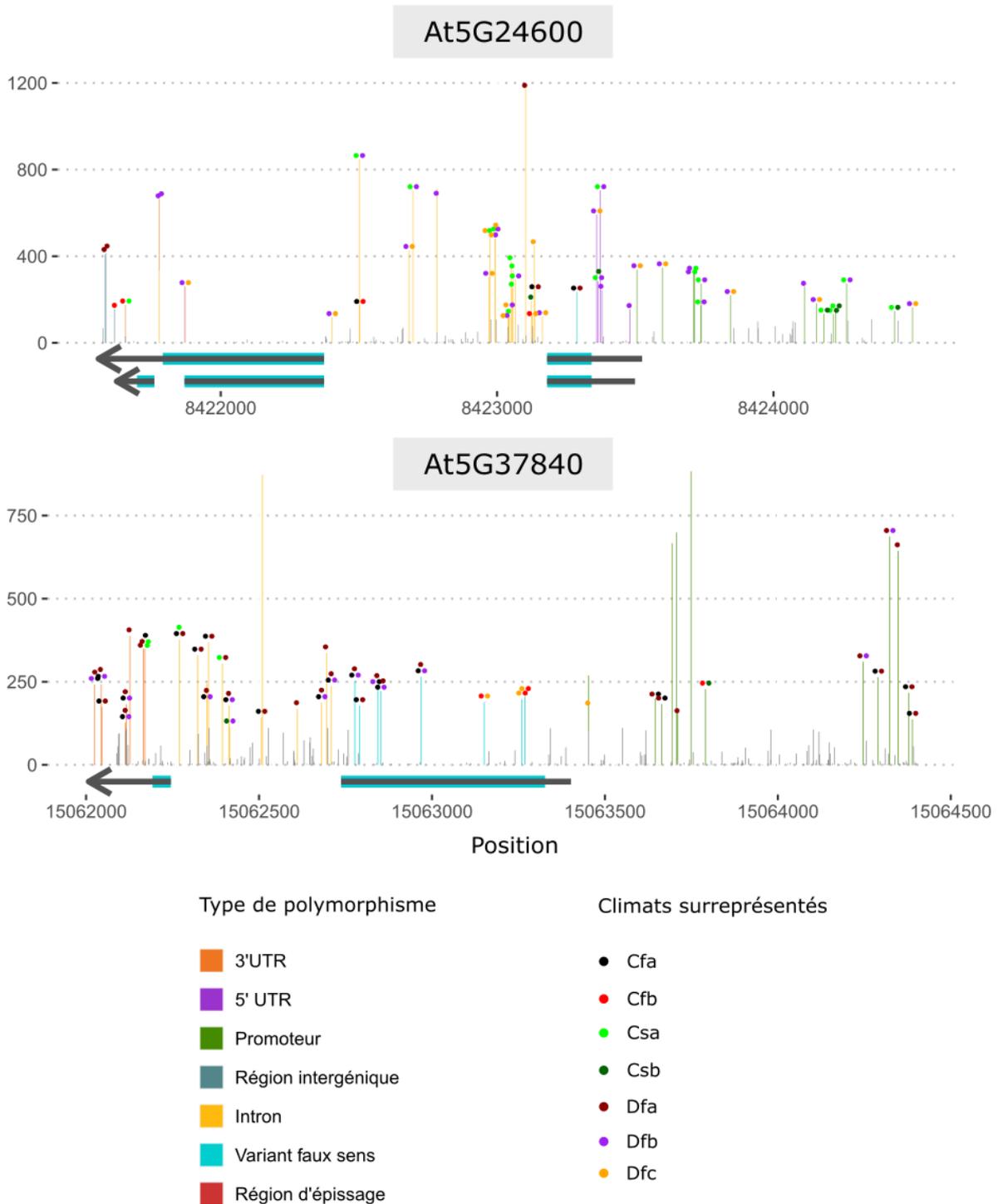


### At3g12910



### At5g23160





**Figure 20 : Surreprésentation des climats dans les polymorphismes.** Représentation des polymorphismes de séquence dans les gènes *At1g07135*, *At3g12910*, *At5g23160*, *At5G24600* et *At5g37840* au sein d'une population de 1131 accessions naturelles d'*A. thaliana* avec comme référence le génome de l'accession Col-0. Le graphique en barre représente en y l'occurrence des polymorphismes parmi les 1131 accessions naturelles et en x leur position dans le génome. La couleur des barres indique le type de polymorphisme. Les polymorphismes sous la forme de mutations synonymes dans la région codante des gènes ne sont pas représentés. Le type des polymorphismes dont l'occurrence est inférieure à 10% de la population n'est pas indiqué. Les points, en fonction de leur couleur, indiquent les climats surreprésentés.

La famille de facteurs de transcription NAC est impliquée dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques.

Les premiers gènes découverts qui contenaient un domaine NAC sont les gènes NAM (*No Apical Meristem*), ATAF1 et 2 et CUC2 (*Cup-shaped Cotyledon*) (Aida et al., 1997; Souer et al., 1996), l'acronyme du nom de ces gènes a donné naissance au nom de la famille des gènes NAC. Les protéines NAC sont typiquement composées d'un domaine NAC très conservé en N-terminal d'environ 150 acides aminés et d'une partie C-terminale très variable. Le domaine NAC est divisé en 5 sous-domaines (A à E) avec des fonctions spécifiques telles que la formation de dimères pour le sous-domaine A, la liaison à l'ADN pour les sous-domaines C et D et la divergence fonctionnelle du domaine NAC pour les sous-domaines B et E (Chen et al., 2011; Ernst et al., 2004; Jensen et al., 2010; Puranik et al., 2012). La partie en C-terminal est très variable mais contient des motifs conservés au sein de certains groupes de protéines NAC (Shen et al., 2009). Cette partie permet la divergence entre les différentes protéines NAC et régule la liaison à d'autres protéines. Elle permet notamment des activités d'activation ou de répression transcriptionnelles (Delessert et al., 2005; Fang et al., 2008; Kim et al., 2007a; Yamaguchi et al., 2010).

Les protéines de la famille NAC sont des facteurs de transcription impliqués dans une large diversité de mécanismes. On les retrouve impliqués dans des mécanismes du développement comme la formation du méristème apical (Souer et al., 1996), le développement des graines (Sperotto et al., 2009) ou la sénescence (Guo and Gan, 2006), par exemple. Beaucoup de NAC sont également impliqués dans la réponse des plantes aux stress biotiques ou abiotiques. Les NAC sont souvent impliqués à la fois dans la réponse aux stress biotiques, celle aux stress abiotiques et dans des mécanismes de développement, comme en témoigne ANACO42, qui confère une meilleure tolérance au chaud et à la sécheresse (Ebrahimian-Motlagh et al., 2017; Shahnejat-Bushehri et al., 2012), participe à la résistance à *A. brassicicola* en étant impliqué dans la biosynthèse de la camalexine (Saga et al., 2012) et est impliqué dans les mécanismes de sénescence (Wu et al., 2012; Zhang et al., 2021).

AT3G12910 fait partie de la famille des gènes NAC. Sa localisation nucléaire est cohérente avec une potentielle activité en tant que facteur de transcription (**Figure 17A**). Dans le but de caractériser le cistrome d'*A. thaliana*, une étude a réalisé un DAP-seq permettant d'identifier les sites de liaison à l'ADN de 529 facteurs de transcription (O'Malley et al., 2016b). Cette étude nous a permis d'obtenir le site de liaison à l'ADN d'AT3G12910 (**Figure 18A**). Afin de comprendre les mécanismes impliquant AT3G12910 dans la défense climato-dépendante, nous avons identifié les cibles putatives d'AT3G12910 dans le génome d'*A. thaliana*. Cette analyse nous a permis d'identifier 1795 gènes cibles au sein du génome d'*A. thaliana* (**Tableau 3**). Nous avons montré que les gènes cibles d'AT3G12910 étaient des gènes impliqués dans le métabolisme et la réponse au stress (**Figure 18B**). Ces résultats sont cohérents avec la régulation des gènes impliqués dans la réponse de défense climato-dépendante. Nous pouvons cependant noter que le taux d'enrichissement pour chacune des GO est assez faible (1,7 au maximum) (**Figure 18B**). Une explication pour ce faible taux d'enrichissement serait que nous ne connaissons pas le sens d'action d'AT3G12910.

Dans notre analyse nous avons considéré toutes les cibles potentielles, présentes au sein des 1000 paires de bases précédant un codon d'initiation de la traduction, sans considérer l'orientation et la position du motif de liaison. En effet, l'activité régulatrice de la transcription de certains facteurs de transcription est influencée par l'orientation et la distance au codon d'initiation des sites de liaison à l'ADN (Beer and Tavazoie, 2004; Erives and Levine, 2004). Ainsi, des biais d'orientation et de position des sites de liaison à l'ADN peuvent être observés (Elemento et al., 2007; Roy et al., 2013). Dans l'hypothèse où l'activité d'AT3G12910 serait dépendante de l'orientation et/ou de la position des sites de liaison à l'ADN, un grand nombre des potentiels gènes cibles ne seraient alors que des artefacts, diluant les réelles cibles d'AT3G12910. Il serait alors intéressant de déterminer s'il existe un biais d'orientation ou de position des sites de liaison à l'ADN d'AT3G12910. Parmi les gènes cibles, 9 appartiennent au réseau des gènes CAIG (**Tableau 3**). 4 appartiennent au cluster 1, comme *At3g12910*, 2 appartiennent au cluster 2 et 3 n'appartiennent à aucun cluster. Ainsi, AT3G12910 pourrait réguler l'expression de gènes impliqués dans la résistance climato-dépendante de manière accession-spécifique et globale. Parmi les gènes cibles du cluster 1, deux sont associés avec des GO de la défense (*At3g26200* et *At4g39950*). *At4g39950* (*Cyp79b2* pour *Cytochrome P450 family 79 subfamily B polypeptide 2*) code une enzyme impliquée dans le métabolisme du tryptophane. Elle convertit le tryptophane en indo-3-acétaldoxime (IAOx), un précurseur de l'auxine, de la camalexine et des glucosinolates d'indole (Glawischnig et al., 2004; Mikkelsen et al., 2000; Zhao et al., 2002). CYP79B2 est par conséquent fortement impliquée dans la régulation de la réponse aux stress biotiques et abiotiques, ainsi que dans la régulation de la sénescence (Crane et al., 2019; Frerigmann et al., 2016; Julkowska et al., 2017; Tao et al., 2021; Yu et al., 2021; Zhao et al., 2015).

Ces expériences nous ont ainsi permis de montrer l'implication d'AT3G12910 dans les mécanismes de défense climato-dépendants et d'identifier *in silico* les cibles de ce facteur de transcription. Afin de valider les cibles d'AT3G12910 *in planta*, une expérience d'immunoprécipitation de la chromatine couplée à un séquençage des fragments récoltés (CHIP-seq) pourrait être réalisée. Les lignées mutantes pour *At3g12910* (*At3g12910\_t1* et *At3g12910\_t2*) ont récemment été complémentées par insertion de la construction permettant la surexpression de la protéine de fusion AT3G12910-GFP. Ces lignées complémentées pourraient ainsi être utilisées pour réaliser l'expérience de CHIP-seq. Par ailleurs, afin de comprendre les mécanismes régulés par AT3G12910, il serait intéressant de réaliser un séquençage des ARN des mutants *At3g12910\_t1* et *At3g12910\_t2* en réponse à *S. sclerotiorum* après avoir été cultivés dans les différents climats



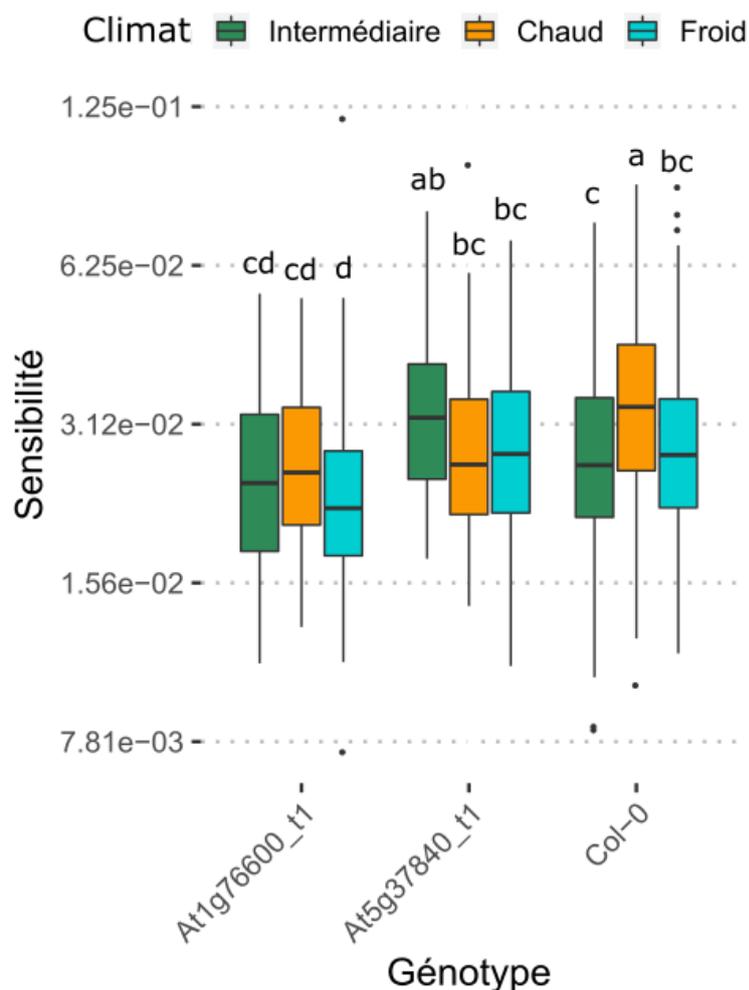
# Chapitre II : Plusieurs membres de la famille PADRE influencent négativement la résistance d'*A. thaliana* face à *S. sclerotiorum* en fonction du climat

## Introduction

La QDR est un mécanisme de défense des plantes face à leurs pathogènes. Ce mécanisme induit une résistance partielle caractérisée par une distribution continue de phénotypes de résistance allant du plus sensible au plus résistant. La QDR est hautement multigénique et fait intervenir de nombreux gènes aux fonctions variées, souvent pléiotropes, participant à la régulation de multiples processus biologiques. Cependant, de nombreux gènes de la QDR sont encore de fonction inconnue. Dans le chapitre précédent, nous avons étudié les gènes impliqués dans la réponse d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum* en fonction du climat. Pour cela nous avons réalisé une sélection de 264 gènes dont l'expression était à la fois modulée par l'infection par *S. sclerotiorum* et par le climat. Nous avons appelé les gènes de cette sélection les gènes CAIG. Parmi les gènes CAIG, 20,5 % étaient des gènes dont le produit est caractérisé comme « protéine inconnue » selon TAIR10 ou contient un domaine de fonction inconnue (DUF, pour *Domain of Unknown Function*) selon Interpro. Parmi ces gènes, nous avons retrouvé 4 gènes contenant un domaine DUF4228 (*At1g28190*, *At2g01340*, *At5g12340* et *At5g37840*), sur 28 présents dans le génome d'*A. thaliana*. Selon un test de proportion, les gènes DUF4228 sont donc surreprésentés au sein des gènes CAIG ( $p\text{-value} = 6,2 \cdot 10^{-11}$ ). Les gènes contenant un domaine DUF4228 ont récemment été liés à la réponse des plantes aux stress abiotiques (Yang et al., 2020). Yang et al ont étudié la phylogénie des gènes DUF4228 et suggèrent qu'il s'agit d'une famille de gènes qui serait apparue au moment de la colonisation de la Terre par les plantes. Ils montrent également que l'expression de plusieurs des gènes DUF4228 est induite ou réprimée en réponse à différents stress abiotiques tels que le froid, le stress osmotique ou le stress salin (Yang et al., 2020).

Dans ce chapitre, nous étudions la famille de gènes DUF4228. Selon les informations fonctionnelles récoltées via des homologies de séquence, des analyses transcriptomiques et des études de tiers, nous proposons de référer à cette famille de gènes comme la famille PADRE pour la famille de la réponse aux Pathogènes et stress Abiotiques, tolérance au cadmium et contenant des REGions désordonnées (PADRE). Dans cet article nous montrons que la famille PADRE était surreprésentée dans la réponse à *S. sclerotiorum* avec 13 gènes PADRE faisant partie des 10% des gènes dont l'expression est la plus induite en réponse à *S. sclerotiorum*. Des analyses phylogénétiques ont montré que la famille PADRE était spécifique

aux plantes et qu'on pouvait la diviser en 10 sous-familles. Des analyses d'expression pangénomiques des gènes PADRE chez *A. thaliana*, le ricin et la tomate ont montré que leur expression en réponse à *S. sclerotiorum* variait en fonction des sous-familles mais de manière cohérente entre les différentes espèces. Enfin, nous avons analysé les profils d'expression des gènes PADRE en réponse à de multiples stress et étudié le réseau de co-expression associé aux gènes PADRE. Ces analyses ont mis en évidence que l'expression des gènes PADRE était associée à la réponse à divers pathogènes ainsi qu'à la biosynthèse de l'anthocyane et aux réponses à la chitine et à l'hypoxie. Ainsi, ces résultats mettent en lumière la famille PADRE comme famille d'intérêt pour une meilleure compréhension des mécanismes de défense des plantes aux champignons pathogènes.



**Figure 21 : Des gènes PADRE sont impliqués dans la réponse à *S. sclerotiorum* en fonction du climat.** Boite à moustaches représentant le phénotype de sensibilité de l'accension sauvage Col-0 et des lignées mutantes de gènes PADRE par insertion d'ADN-T SALK en réponse à l'infection par *S. sclerotiorum*. Le phénotype de sensibilité des plantes ayant été cultivées dans le climat Cfa est représenté en vert, celui des plantes cultivées dans le climat Csa en orange et celui des plantes cultivées dans le climat Dfb en bleu. Chaque expérience a été répétée au moins 3 fois et la significativité des résultats a été évaluée par une ANOVA suivie d'un test de Tukey HSD.



# Patterns of Sequence and Expression Diversification Associate Members of the *PADRE* Gene Family With Response to Fungal Pathogens

Marie Didelon, Mehdi Khafif, Laurence Godiard, Adelin Barbacci and Sylvain Raffaele\*

Université de Toulouse, Laboratoire des Interactions Plantes Micro-organismes (LIPM), Institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE) – Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Castanet-Tolosan, France

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Takaki Maekawa,  
Max Planck Institute for Plant  
Breeding Research, Germany

### Reviewed by:

Thomas Griebel,  
Freie Universität Berlin, Germany  
Bilal Okmen,  
University of Cologne, Germany  
Andrea Ghelfi,  
Kazusa DNA Research Institute,  
Japan

### \*Correspondence:

Sylvain Raffaele  
sylvain.raffaele@inrae.fr

### Specialty section:

This article was submitted to  
Evolutionary and Population Genetics,  
a section of the journal  
Frontiers in Genetics

**Received:** 15 January 2020

**Accepted:** 20 April 2020

**Published:** 29 May 2020

### Citation:

Didelon M, Khafif M, Godiard L,  
Barbacci A and Raffaele S (2020)  
Patterns of Sequence and Expression  
Diversification Associate Members  
of the *PADRE* Gene Family With  
Response to Fungal Pathogens.  
*Front. Genet.* 11:491.  
doi: 10.3389/fgene.2020.00491

Pathogen infection triggers extensive reprogramming of the plant transcriptome, including numerous genes the function of which is unknown. Due to their wide taxonomic distribution, genes encoding proteins with Domains of Unknown Function (DUFs) activated upon pathogen challenge likely play important roles in disease. In *Arabidopsis thaliana*, we identified thirteen genes harboring a DUF4228 domain in the top 10% most induced genes after infection by the fungal pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. Based on functional information collected through homology and contextual searches, we propose to refer to this domain as the pathogen and abiotic stress response, cadmium tolerance, disordered region-containing (*PADRE*) domain. Genome-wide and phylogenetic analyses indicated that *PADRE* is specific to plants and diversified into 10 subfamilies early in the evolution of Angiosperms. *PADRE* typically occurs in small single-domain proteins with a bipartite architecture. *PADRE* N-terminus harbors conserved sequence motifs, while its C-terminus includes an intrinsically disordered region with multiple phosphorylation sites. A pangenomic survey of *PADRE* genes expression upon *S. sclerotiorum* inoculation in *Arabidopsis*, castor bean, and tomato indicated consistent expression across species within phylogenetic groups. Multi-stress expression profiling and co-expression network analyses associated *AtPADRE* genes with the induction of anthocyanin biosynthesis and responses to chitin and to hypoxia. Our analyses reveal patterns of sequence and expression diversification consistent with the evolution of a role in disease resistance for an uncharacterized family of plant genes. These findings highlight *PADRE* genes as prime candidates for the functional dissection of mechanisms underlying plant disease resistance to fungi.

**Keywords:** plant disease resistance, diversification, DUF4228, intrinsic disorder, pathogenesis-related, gene expression profiling

## INTRODUCTION

Wild plants and crops suffer from recurrent attacks by pathogenic microbes, threatening biodiversity and food production. Molecular and genetic studies revealed that plants possess an elaborate immune system able to detect pathogens and activate genetic pathways to mount effective defense responses (Dodds and Rathjen, 2010). Specific defense responses allow plants

to cope with microbial pathogens of diverse lifestyles and genotypes that target diverse plant organs (Glazebrook, 2005). In most cases, the activation of plant responses requires extensive transcriptional reprogramming, covering for instance up to 25% of the whole genome in *Arabidopsis thaliana* (Eulgem, 2005). In nature, one of the most frequent forms of plant immunity is designated as quantitative disease resistance (QDR) (Poland et al., 2009; Roux et al., 2014). QDR leads to a full continuum of disease resistance phenotypes in natural plant populations, from very susceptible to largely resistant, and generally involves a large number of genetic loci. Every gene adds a small contribution to form the overall resistance (Roux et al., 2014). Current knowledge of the molecular bases of QDR in plants remains very incomplete, but a few general properties have emerged. First, the molecular functions of QDR genes are very diverse, including for instance transporters (Krattinger et al., 2009), kinases (Derbyshire et al., 2019), proteases (Badet et al., 2017), and genes of unknown function (Fukuoka et al., 2009). Second, the function of QDR genes may not be limited to disease resistance and can include activity in cell morphology (Rajarammohan et al., 2018; Badet et al., 2019), metabolism (Rajarammohan et al., 2018), or embryogenesis (Derbyshire et al., 2019) in certain contexts. Third, QDR responses to a given pathogen species may involve hundreds or even thousands of genes (Corwin et al., 2016; Fordyce et al., 2018). Therefore, pathogen infection triggers extensive reprogramming of the plant transcriptome, including numerous genes the molecular function of which is currently unknown.

Recent progress in high-throughput omics techniques enabled the determination of the sequence of genes and proteins at an unprecedented pace. Homology relationships allow to rapidly transfer functional information from one sequence to another but suffer limitations (Pearson and Sierk, 2005), and our capacity to generate new sequences far exceeds our ability to interpret them. Sequence conservation across large evolutionary distances can identify previously unknown functional domains in proteins, such as in the case of the VAST domain (PF16016) (Khafif et al., 2014, 2017; Gatta et al., 2015). The Protein Family Database (Pfam) gathers protein families by their homology of sequence (El-Gebali et al., 2019). In 2019, the latest Pfam release (32.0) counted 17,929 entries, 3,961 (22%) of them being Domains of Unknown Function (DUFs). DUFs are protein families for which no member has an experimentally characterized function. Systematic structural analyses of DUF proteins revealed that a significant part of DUF proteins likely originate from extreme diversification and neofunctionalization of known protein domains (Jaroszewski et al., 2009). Due to their wide taxonomic distribution and their evolutionary sequence conservation, many DUFs are expected to compose essential proteins (Goodacre et al., 2013). Widely distributed genes encoding proteins with DUFs activated upon pathogen challenge are promising sources of new insight into the evolution and molecular mechanisms of plant disease resistance.

*Sclerotinia sclerotiorum* is a devastating fungal plant pathogen from the Ascomycota division with a necrotrophic lifestyle. It is responsible for the white and stem mold diseases on more than 400 plant species, including crops of high agricultural value like

sunflower, soybean, rapeseed, and tomato, among others (Boland and Hall, 1994; Hegedus and Rimmer, 2005). The host range of *S. sclerotiorum* also includes plants from the *Brassicaceae* family, such as the plant model *A. thaliana*. Resistance to *S. sclerotiorum* is typically quantitative with no complete resistance (Perchepped et al., 2010; Mbengue et al., 2016). The molecular bases of QDR to *S. sclerotiorum* are beginning to be elucidated, notably thanks to studies on *A. thaliana*, but remain very patchy (Mbengue et al., 2016). Global gene expression profiling by RNA sequencing revealed 4,703 *A. thaliana* genes significantly induced upon leaf inoculation with *S. sclerotiorum* (Badet et al., 2017), including several genes harboring a DUF4228 domain. Here, we took a survey of DUF4228 homologs across the plant kingdom and identified a few experimental insights into the function of these genes. We propose to refer to this domain as the pathogen and abiotic stress response, cadmium tolerance, disordered region-containing (PADRE) domain to facilitate future reference. We used phylogenetic analyses to document the extent diversity of PADRE sequences and infer scenarios for their evolution. PADRE proteins lack sequence similarity to characterized proteins but harbor a bipartite architecture with conserved motifs in the N-terminal region and a C-terminal region rich in phosphorylated residues and predicted to be intrinsically disordered. Pangenomic expression profiling in thale cress (*A. thaliana*), tomato (*Solanum lycopersicum*), and castor bean (*Ricinus communis*) plants inoculated by *S. sclerotiorum* identified groups of PADRE genes that respond to this fungal pathogen in a consistent manner across species. Finally, *AtPADRE* gene expression upon diverse stress treatments and co-expression network reconstruction suggests that several PADRE genes could function synergistically in plant defense. Our study reveals that responsiveness to fungal pathogen attack is conserved at the interspecific level in groups of PADRE genes and provides insights into the evolutionary history and functional diversification in this poorly characterized plant gene family.

## RESULTS

### Genes From the DUF4228 Family Are Over-Represented Among Genes Induced Upon *S. sclerotiorum* Inoculation

To get insights into plant processes activated during colonization by the fungal pathogen *S. sclerotiorum*, we analyzed RNA-Seq data for *A. thaliana* plants inoculated by *S. sclerotiorum*. Specifically, we focused on protein domains overrepresented among plant genes differentially expressed upon inoculation. To this end, we exploited the RNA sequencing data generated in Badet et al. (2017) (GSE106811). Differential expression analysis identified 4,703 genes significantly induced ( $\log_2$  fold change (LFC) > 1.5, adjusted *p*-value (padj) < 0.01) and 5,812 genes significantly down-regulated (LFC < -1.5, padj < 0.01) in *A. thaliana* during infection by *S. sclerotiorum*. We annotated genes by their protein domains using the Pfam database. Using a proportion *Z*-test (*p*-value < 0.01), we counted 53 protein

domains significantly overrepresented among induced genes with at least 10 occurrences in *A. thaliana* genome (**Supplementary Table S1** and **Figure 1**). The ubiquitin-like domain PF14560 showed the strongest enrichment in induced genes (induced/total ratio = 0.83,  $p$ -val =  $4.41e^{-05}$ ), and the protein kinase domain PF00069 had the most significant enrichment in induced genes (ratio 0.25,  $p$ -val  $5.02e^{-10}$ ). Gene Ontology terms associated with the 74 overrepresented protein domains included defense mechanism and immune response in 64.5% of cases. For instance, 27 out of 72 genes harboring a WRKY domain (PF03106) were induced upon infection by *S. sclerotiorum* (ratio = 0.375,  $p$ -val  $1.43 e^{-04}$ ). Other protein domains enriched in induced genes included ubiquitin-like domains (PF10302, PF14560, PF11976, and PF00240), transport-related domains (PF01105, PF08449, and PF03105), calcium binding (PF14658), and heat shock response (PF00011) (**Supplementary Table S1**).

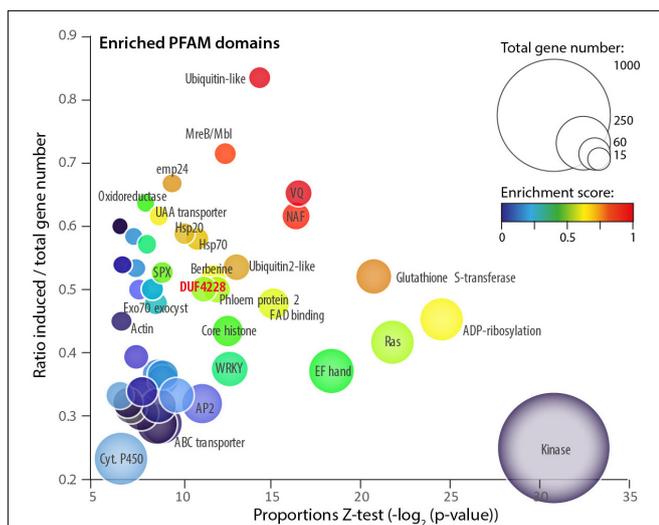
One domain enriched in induced genes had no known molecular function and was identified as Domain of Unknown Function DUF4228 (ratio 0.5,  $p$ -val  $3.86e^{-04}$ ). We identified 28 genes with a DUF4228 domain in the genome of *A. thaliana* (hmmscan e-value <  $1E-10$ , **Supplementary Table S2**), 19 of them being differentially expressed upon infection by *S. sclerotiorum* (14 induced and 5 down-regulated). The DUF4228 gene AT5G37840 was induced over 1,000 times (LFC 10.22,  $p$ -val  $1.45e^{-47}$ ), and 13 genes harboring a DUF4228 domain were in the top 10% most induced genes after infection by *S. sclerotiorum* in *A. thaliana* (LFC > 4.04, **Supplementary Table S2**). Because of their dramatic induction pattern and

although uncharacterized to date, some DUF4228 genes could function in plant defense responses.

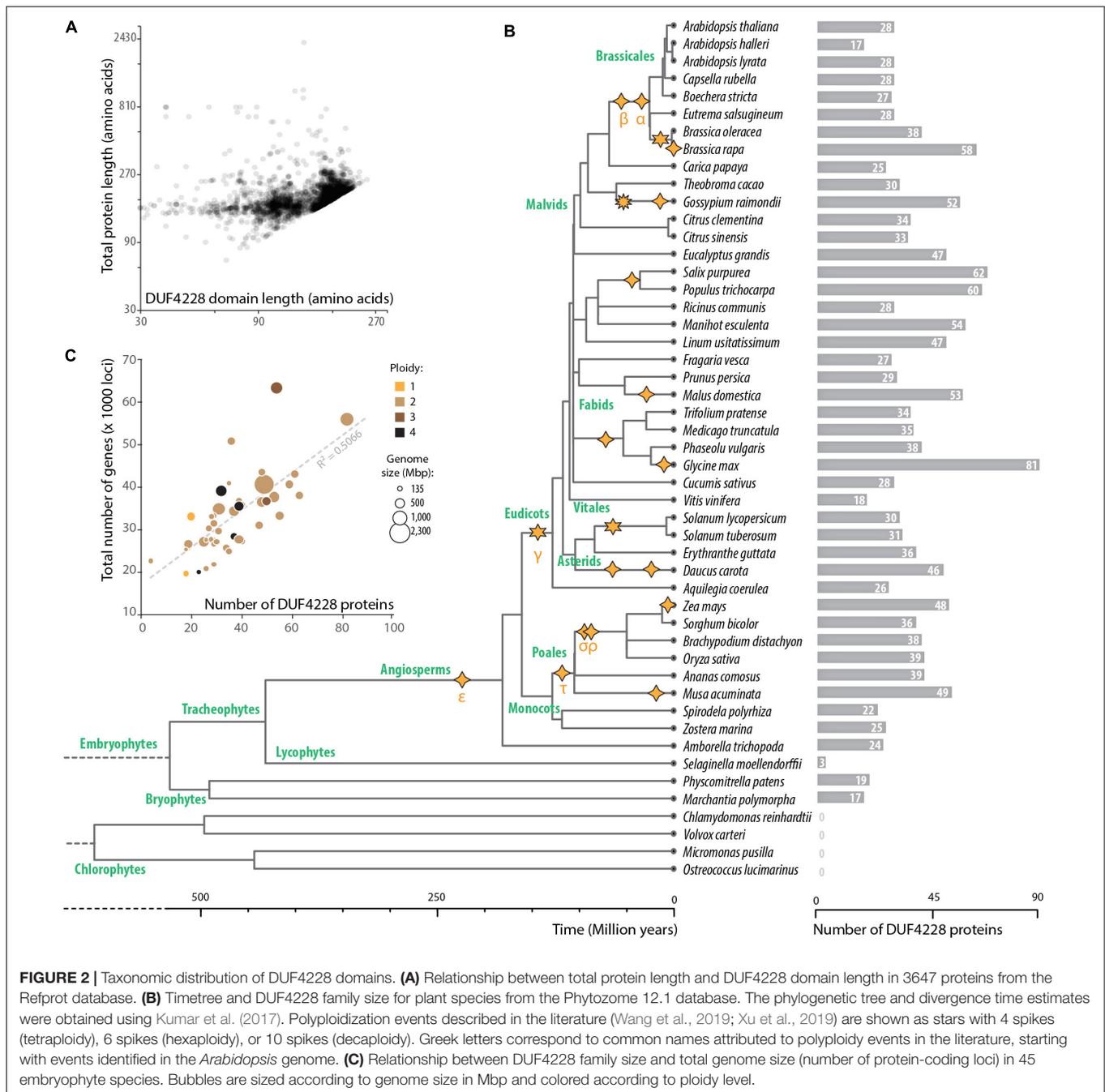
## Taxonomic Distribution of the DUF4228/PADRE Domain

To document the taxonomic distribution of the DUF4228 domain across the tree of life, we performed a HMM search against the Refprot database of UniProtKB with an alignment of *A. thaliana* DUF4228 proteins as input (**Supplementary Datasheet S1**). We retrieved 3647 hits distributed in 98 species. As recently reported (Yang et al., 2020), DUF4228 appeared restricted to plants, including mosses, liverworts, and monocot and dicot species. The average size of DUF4228 domains detected in these proteins was  $149.7 \pm 40.3$  amino acids, for proteins of  $159.7 \pm 37.6$  amino acids long (**Figure 2A**). In good agreement, only 8.4% of proteins harboring a DUF4228 domain were multi-domain proteins. To identify the complete repertoire of DUF4228 in plant proteomes, we performed a HMM search against the Phytozome 12.1 database. Out of the 64 plant proteomes available at the time of our analysis, only the seven Chlorophyte proteomes did not show a single DUF4228 domain, indicating that the emergence of the DUF4228 domain occurred at least 450 million years ago (**Figure 2B**). Next, we used Timetree to relate the number of DUF4228-containing proteins with time of speciation in 49 plant species. In embryophytes, the number of DUF4228-containing proteins ranged from three (*Selaginella moellendorffii*) to 81 (*Glycine max*) (**Figure 2B**). A majority of embryophytes (28/45) had between 20 and 40 DUF4228-containing proteins, and there was no striking expansion of DUF4228 in a specific plant lineage. Recent whole genome duplication events were often associated with expanded DUF4228 repertoires, such as in *Brassica rapa*, *Malus domestica*, *G. max*, *Zea mays*, and *Musa acuminata*. Overall, the size of the DUF4228 family was well correlated ( $R^2 = 0.5066$ ) with the total number of genes per genome across embryophyte species (**Figure 2C**).

Through homology and keyword searches, we found experimental insights into function for DUF4228 proteins. The *A. thaliana* AT4G37240 protein was identified as interacting with calmodulin proteins CAM4, 6, 7, 8, and 9 (Popescu et al., 2007). In addition, *A. thaliana* AT1G66480 was identified as interacting with Arabidopsis Response Regulator 14 (ARR14) in a yeast two-hybrid screen (Dortay et al., 2008). However, these protein-protein interactions have not been validated by independent approaches. In *Nicotiana tabacum*, the homolog of *A. thaliana* AT1G76600 was found responsive to tobacco mosaic virus and wounding and the corresponding protein designated as Pathogenesis-related protein of 23kDa (NtPRp23) (Akiyama et al., 2005). Its ortholog in *N. sylvestris* (LOC104235934) conferred tolerance to cadmium when expressed in yeast (Zhang et al., 2016). Recent work by Yang et al. (2020) revealed that several DUF4228 genes are responsive to drought, cold, or salt abiotic stress. Our analyses reported in this study indicated that several DUF4228 genes are responsive to infection by the fungal pathogen *S. sclerotiorum* and that *A. thaliana* DUF4228 proteins harbor intrinsically disordered regions. Based on this partial functional information and to facilitate further



**FIGURE 1 |** Protein domains enriched among *A. thaliana* genes upregulated upon *S. sclerotiorum* inoculation. Each bubble shows one of 54 PFAM domains significantly enriched (proportion test  $p$ -value < 0.01) in induced genes (LFC > 1.5,  $p$ -value < 0.01). Bubbles are sized according to the total number of genes containing the domain in the *A. thaliana* genome. Enrichment is shown as the  $p$ -value of a proportion Z-test for enrichment (X-axis), the ratio between the number of induced/total genes (Y-axis) and a composite enrichment score (color scale, see the section “Materials and Methods”). The DUF4228 domain is labeled in bold red. Associated raw data corresponds to *Arabidopsis thaliana* samples from GEO accession number GSE106811.

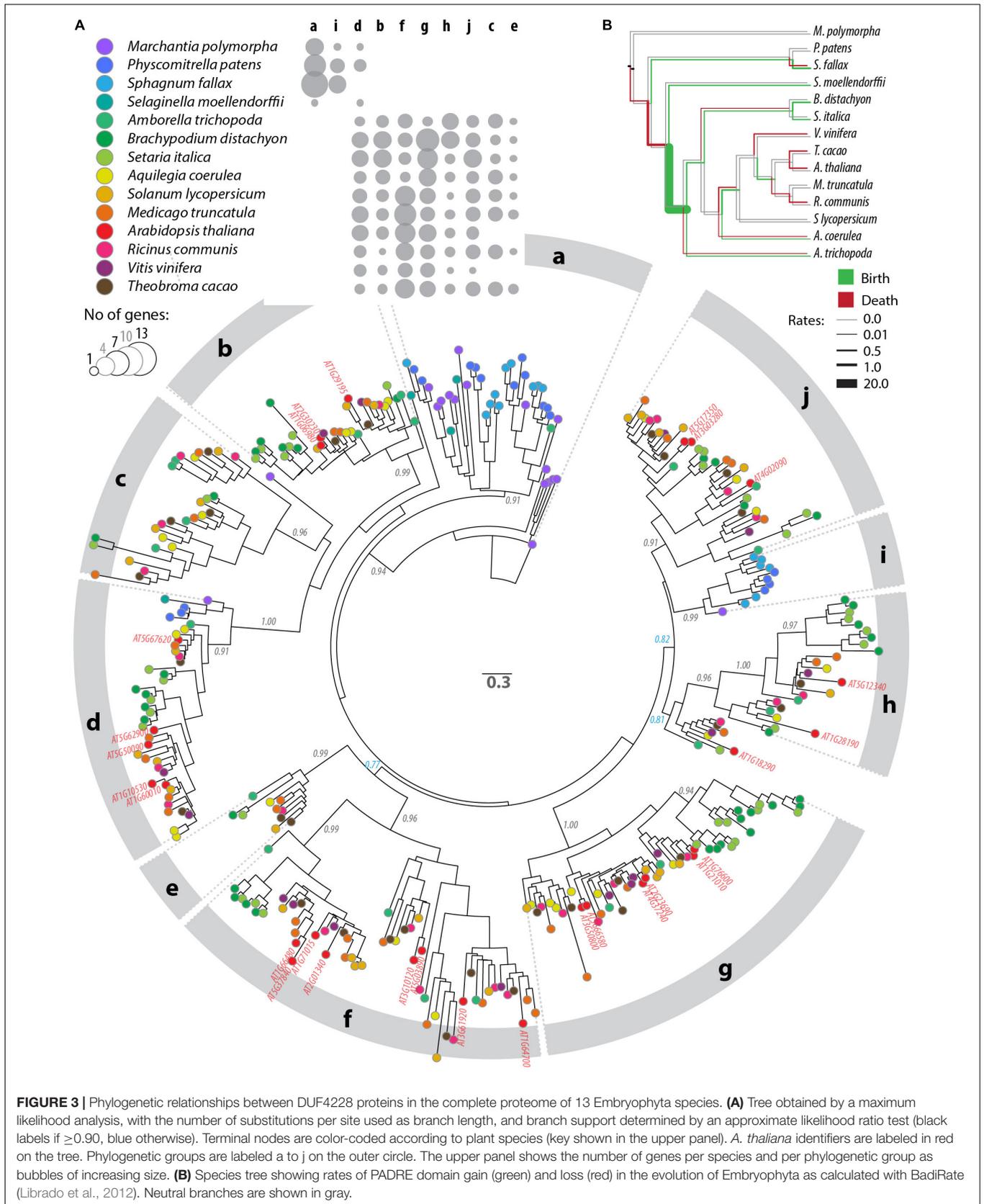


reference, we propose to refer to this family as the pathogen and abiotic stress response, cadmium tolerance, disordered region-containing (PADRE) family.

### Sequence Diversification of the PADRE Domain

To analyze patterns of sequence diversification among PADRE proteins, we selected 13 plant genomes representative of the major Embryophyta lineages and constructed a phylogenetic tree of PADRE proteins from these species (see the section

“Materials and Methods”). For this, we generated a multiple protein alignment including 344 sequences and 116 informative sites located within the PADRE domain (Supplementary Datasheet S2, S3). We used maximum likelihood methods to represent phylogenetic relationships between these 354 PADRE domains as a tree (Figure 3A and Supplementary Datasheet S4). PADRE proteins classified into 10 monophyletic groups (a to j) supported by posterior probabilities  $\geq 0.90$  and encompassing 10 (clade e) to 55 (clade g) proteins. PADRE sequences diversified strongly since the divergence between Lycophytes and Angiosperms: groups a and i were restricted to Bryophytes



and Lycophytes, while groups b, c, e, f, g, h, and j were restricted to Angiosperms. Group d was represented in all species analyzed except *Sphagnum fallax*. Groups b, c, e, f, g, h, and j were represented in all Angiosperm species analyzed, with the exception of groups c and e that were absent from *Arabidopsis thaliana* and *Vitis vinifera*. This suggests that seven PADRE groups existed in the common Angiosperm ancestor and that groups c and e were lost in *A. thaliana* and *V. vinifera*. The number of PADRE groups expanded more rapidly in Angiosperms (reaching 6 and 8 distinct clades per species) than in Bryophytes and Lycophytes (2 or 3 clades per species), indicative of strong diversification of PADRE genes early in the evolution of Angiosperms. To estimate rates of domain birth and death in the PADRE family, we analyzed the species distribution of PADRE phylogenetic group with BadiRate (Librado et al., 2012) (Figure 3B). This revealed two major domain gain events during the emergence of Angiosperms and of core Eudicots and several lineage-specific gain events. Loss events mostly corresponded to the emergence of Tracheophytes and to terminal branches in the Fabids and Malvids clades.

## PADRE Is a Bipartite Domain Including Disordered and Phosphorylated C-Termini

PADRE proteins do not display clear homology to functionally characterized proteins. In our alignment of PADRE proteins from 13 Tracheophyta species, sequence conservation appeared limited to four short motifs of 10 amino acids or less (Figure 4A). These conserved motifs correspond to motifs 1, 3, and 6 identified by Yang et al. (2020). As noted by Yang et al. (2020), additional short sequence motifs were restricted to specific PADRE groups. To get insights into PADRE protein sequence signatures and their potential functional implications, we scanned *A. thaliana* PADRE proteins with the ELM, PhosPhat, PrDOS, and Grantham Polarity calculation tools. First, we used the eukaryotic linear motif (ELM) resource to identify motifs similar to known functional sites in proteins (Gouw et al., 2018) (Figure 4B). Among motifs identified robustly in multiple AtPADRE proteins was an N-myristoylation motif, corresponding to the well-conserved GNXXX motif found at the very N-terminus of PADRE proteins. *In vitro* myristoylation provided experimental for N-myristoylation of AT4G37240 (group G) and AT1G10530 (group D) (Boisson et al., 2003, unpublished result available<sup>1</sup>). Furthermore, AT1G21010 (group G) and ATGG17350 (group J) were identified in plasma-membrane fractions as expected if N-myristoylated (Majeran et al., 2018). The conserved LXXG motif of PADRE proteins overlapped with a WH2 motif for interaction with actin (LIG\_Actin\_WH2). The conserved YFLLP motif overlapped with a Tyrosine-based signal for interaction with the adaptor protein complex (TRG\_ENDOCYTTIC\_2), a LIR motif for binding to the autophagy protein Atg8 (LIG\_LIR\_Gen\_1), and a protein phosphatase interacting motif (DOC\_PP1\_RVXF\_1). Basic nuclear localization signals were detected at the C-terminus

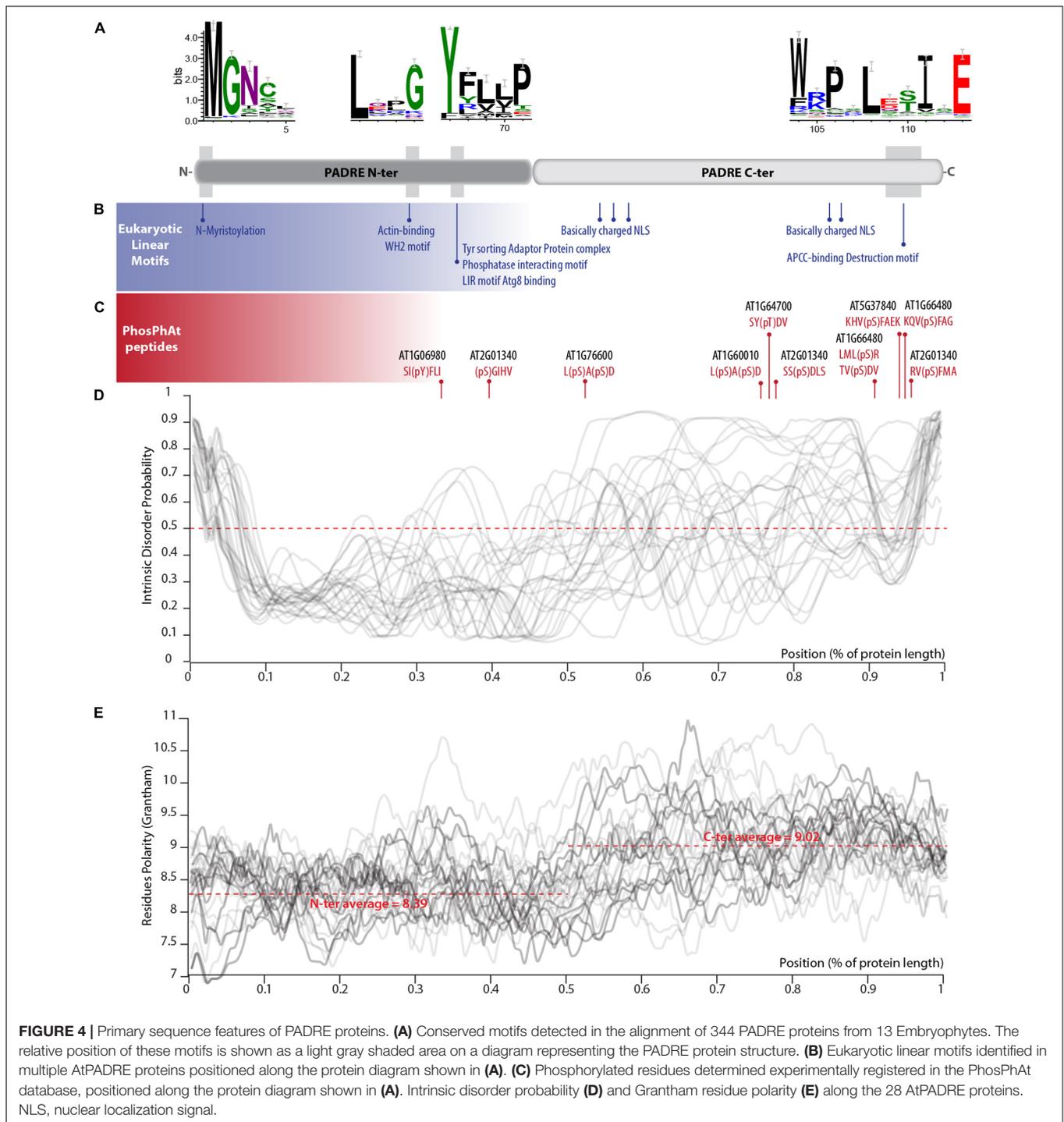
of several PADRE proteins. The C-terminal WRPXLXXIXE motif overlapped with an APCC-binding Destruction motif required for targeting to ubiquitin-mediated proteasome-dependent degradation (DEG\_APCC\_DBOX\_1). ELM also detected numerous putative phosphorylation sites at the C-terminus of PADRE proteins. We took advantage of the PhosPhat 4.0 database to search for experimentally determined phospho-peptides in PADRE proteins (Durek et al., 2009). We retrieved phospho-peptides from seven AtPADRE proteins from group B (AT1G06980), D (AT1G60010), F (AT1G64700, AT1G66480, AT2G01340, AT5G37840), and G (AT1G76600) (Figure 4C). A large majority of the phosphorylated residues resided in the C-terminal half of the PADRE domain.

We used the PrDOS server (Ishida and Kinoshita, 2007) to predict natively disordered regions in the 28 AtPADRE proteins (Figure 4D). All AtPADRE proteins showed a relatively consistent pattern of disorder probability, indicating a short (~5 amino acids) N-terminal disordered region followed by an ordered region of ~60 amino acids and a C-terminal half with high probability of intrinsic disorder. To test whether the structural state of PADRE regions was associated with contrasted amino acid usage at the N and C terminus, we calculated the Grantham Polarity index (Grantham, 1974) along 28 AtPADRE proteins (Figure 4E). In average, the PADRE C-terminal region harbors more polar residues (average index 9.02) than the N-terminal region (average index 8.39).

## Responsiveness to *S. sclerotiorum* Varies Across PADRE Phylogenetic Groups

The clear delineation of phylogenetic groups in the PADRE family and recent investigations of AtPADRE gene expression upon abiotic stress (Yang et al., 2020) suggested that PADRE genes could have acquired several distinct functions over evolution. Here, we set to investigate whether responsiveness to the fungal pathogen *S. sclerotiorum* contrasts across PADRE phylogenetic groups and whether responsiveness to fungal infection is consistent across plant species. To this end, we analyzed the expression of the PADRE gene repertoire of *A. thaliana*, *Solanum lycopersicum*, and *Ricinus communis* by RNA-sequencing in leaves of healthy plants and upon inoculation by *S. sclerotiorum*. We detected the expression of 74 PADRE genes, including 28 AtPADRE, 26 SiPADRE, and 23 RcPADRE (Figure 5 and Supplementary Table S3). Among them, 31 were significantly induced, 11 were significantly down-regulated, and 32 were not differentially expressed. PADRE genes highly expressed in healthy leaves were frequent in groups d and h and a subgroup of group f. Group h was very homogenous with all four genes significantly induced upon *S. sclerotiorum* infection, and groups j and f included mostly induced genes, with group d that included a majority of down-regulated genes. To determine whether PADRE gene induction differs significantly between phylogenetic groups or between species, we performed ANOVA on expression LFC for the 74 PADRE genes. In a one-way ANOVA, the phylogenetic group effect was found highly significant ( $p$ -value 0.0052) while the species was not significant ( $p$ -value 0.68). In a two-way

<sup>1</sup><https://www.i2bc.paris-saclay.fr/maturation/Myristoylome.html>

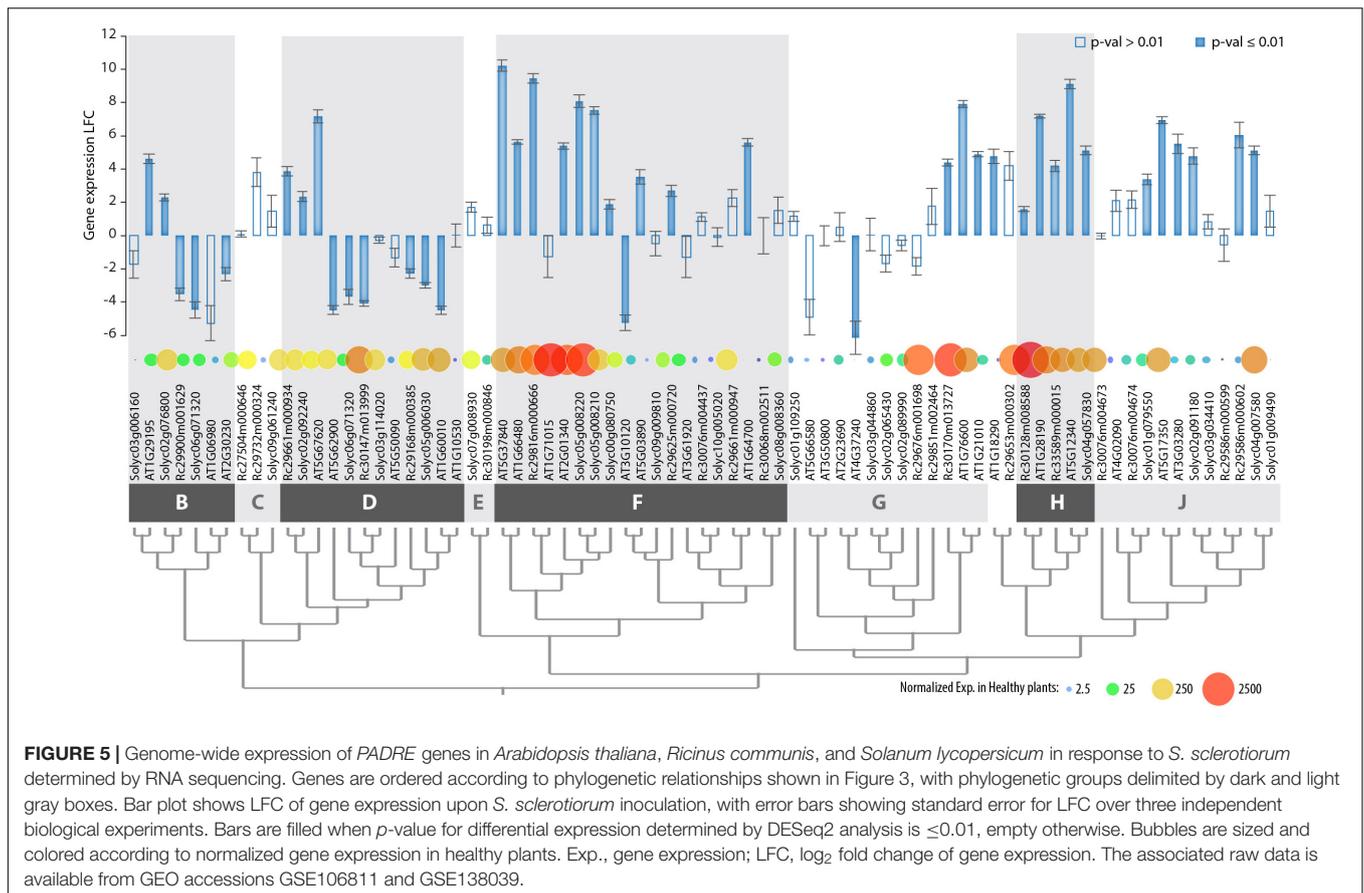


**FIGURE 4 |** Primary sequence features of PADRE proteins. **(A)** Conserved motifs detected in the alignment of 344 PADRE proteins from 13 Embryophytes. The relative position of these motifs is shown as a light gray shaded area on a diagram representing the PADRE protein structure. **(B)** Eukaryotic linear motifs identified in multiple AtPADRE proteins positioned along the protein diagram shown in **(A)**. **(C)** Phosphorylated residues determined experimentally registered in the PhosPhAt database, positioned along the protein diagram shown in **(A)**. Intrinsic disorder probability **(D)** and Grantham residue polarity **(E)** along the 28 AtPADRE proteins. NLS, nuclear localization signal.

ANOVA, the phylogenetic group effect was significant ( $p$ -value 0.018); the species effect and group  $\times$  species interaction effect was not significant ( $p$ -value 0.72 and 0.99, respectively). We conclude that *PADRE* gene expression upon *S. sclerotiorum* inoculation differs between phylogenetic groups in a consistent manner across plant species.

Through a synteny analysis, we identified five pairs (AT1G06980/AT2G30230, AT1G10530/AT1G60010, AT1G210

10/AT1G76600, AT3G03280/AT5G17350, and AT3G10120/AT5G03890) and two quartets AT1G71015/AT2G01340/AT1G66480/AT5G37840, AT2G23690/AT4G37240/AT5G66580/AT3G50800) of *PADRE* genes associated as paralogs in the *A. thaliana* genome. In all instances, groups of paralogs belonged to the same phylogenetic group. The divergence in expression of the *PADRE* genes was limited within most of the paralog groups (**Supplementary Figure S1**). Only the pair of paralogs

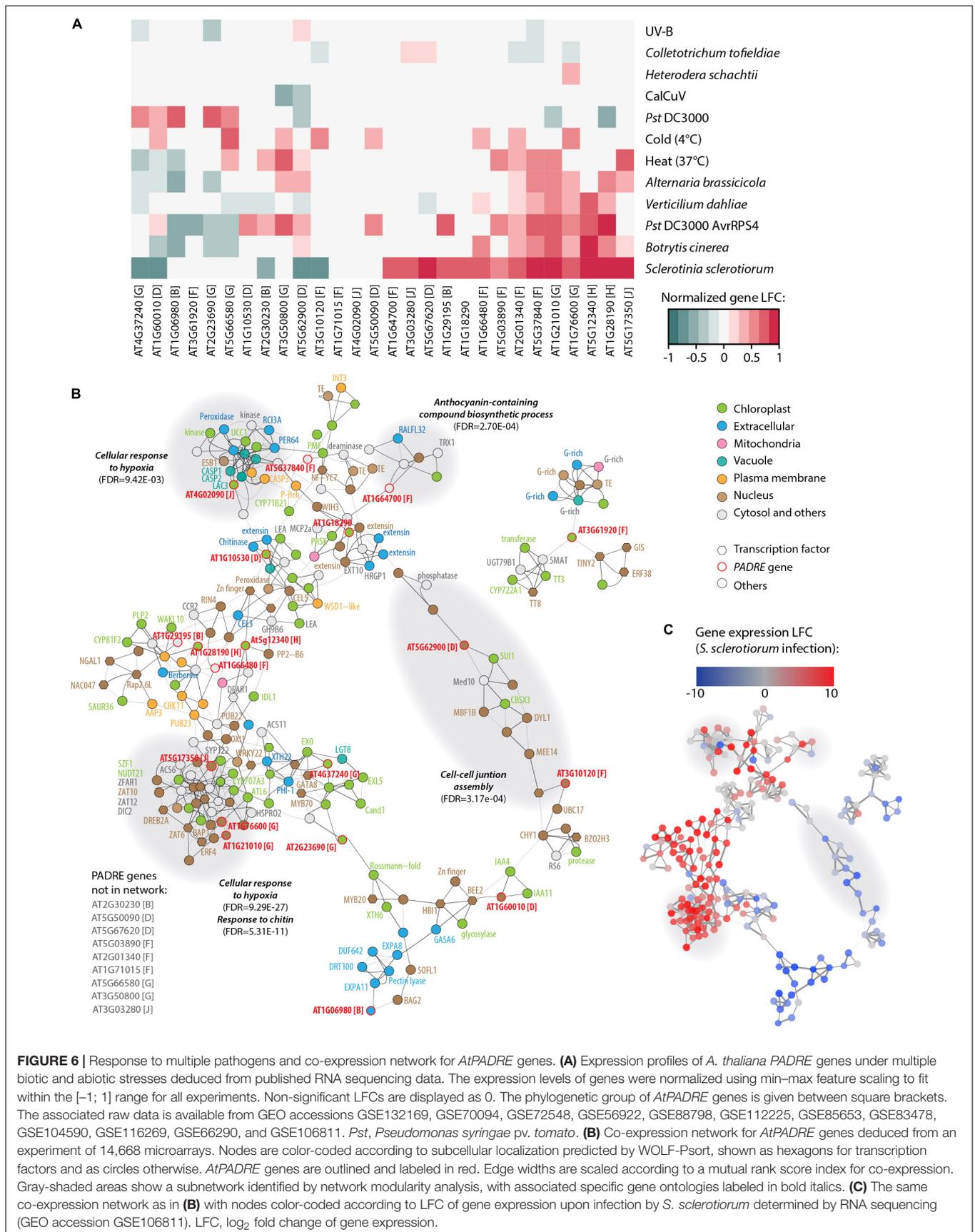


AT3G10120-AT5G03890 (group f) showed significant divergence in expression (LFC-5.23 and 3.53, respectively), possibly due to their low basal level of expression. Altogether, our gene expression analysis suggests that responsiveness to pathogens was acquired early in the evolution of Angiosperms by specific groups or subgroups of *PADRE* genes.

### **A. thaliana PADRE Genes Respond to Multiple Stress and Associate With Plant Defense Ontologies**

The finding that some *AtPADRE* genes are responsive to abiotic stresses (Yang et al., 2020) prompted us to investigate their expression under a range of biotic stresses. For this, we analyzed RNA sequencing data available in the Gene Expression Omnibus database (Figure 6A), collecting expression data for *A. thaliana* inoculated by the fungal pathogens *S. sclerotiorum* (Badet et al., 2017), *Botrytis cinerea* (Liu et al., 2015), *Alternaria brassicicola* (Rausch, 2016), and *Verticillium dahliae* (Scholz et al., 2018), the bacterial pathogen *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) DC3000 (Mine et al., 2018) and DC3000 expressing the effector *AvrRps4* (Bhandari et al., 2019), the Cabbage Leaf Curl Virus (CaLCuV) (Zorzatto et al., 2015), and the nematode *Heterodera schachtii* (Shanks et al., 2016). To serve as a reference, we also analyzed RNA sequencing data for plants inoculated with the endophytic fungus *Colletotrichum*

*tofieldiae* (Hacquard et al., 2016) and submitted to heat stress (Albihlal et al., 2018), cold stress (Zuther et al., 2019), and UV-B treatment (Tavridou et al., 2020). The analysis of *PADRE* gene differential expression revealed a cluster of six *PADRE* genes induced by multiple pathogens: *AT1G28190*, *AT5G12340*, *AT1G76600*, *AT1G21010*, *AT5G37840*, and *AT2G01340* are significantly induced in response to *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *Pst* DC3000 *AvrRPS4*, and *V. dahliae*. Out of these six genes, five are also induced upon infection by *A. brassicicola*, three under heat stress. Three of them are down-regulated in root response to the non-pathogenic fungus *C. tofieldiae*. By contrast, a cluster of five *PADRE* genes (*AT4G37240*, *AT1G60010*, *AT1G06980*, *AT2G23690*, and *AT5G66580*) was down-regulated in response to pathogens and heat stress. The response of *PADRE* genes to heat stress shared more similarities with their response to pathogens than to other abiotic stimuli. *PADRE* genes were not responsive to all signals. Indeed, only *AT2G01340* was differentially expressed in response to the nematode *H. schachtii*, *AT3G50800* and *AT5G62900* upon infection by the virus CaLCuV, *AT1G76600*, *AT1G21010*, *AT2G01340*, and *AT3G10120* in response to *C. tofieldiae*, and *AT4G37240*, *AT3G61920*, *AT2G23690*, and *AT1G76600* to UV-B. To test for the relationship between phylogenetic clades and the response of *PADRE* genes to diverse stresses, we performed a two-way ANOVA. We found a significant effect of the phylogenetic group (*p*-value 0.042) and type of stress (*p*-value  $4.15 \cdot 10^{-5}$ ) on *PADRE*



**FIGURE 6 |** Response to multiple pathogens and co-expression network for *AtPADRE* genes. **(A)** Expression profiles of *A. thaliana* *PADRE* genes under multiple biotic and abiotic stresses deduced from published RNA sequencing data. The expression levels of genes were normalized using min-max feature scaling to fit within the [-1; 1] range for all experiments. Non-significant LFCs are displayed as 0. The phylogenetic group of *AtPADRE* genes is given between square brackets. The associated raw data is available from GEO accessions GSE132169, GSE70094, GSE72548, GSE56922, GSE88798, GSE112225, GSE85653, GSE83478, GSE104590, GSE116269, GSE66290, and GSE106811. *Pst*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. **(B)** Co-expression network for *AtPADRE* genes deduced from an experiment of 14,668 microarrays. Nodes are color-coded according to subcellular localization predicted by WOLF-Psort, shown as hexagons for transcription factors and as circles otherwise. *AtPADRE* genes are outlined and labeled in red. Edge widths are scaled according to a mutual rank score index for co-expression. Gray-shaded areas show a subnetwork identified by network modularity analysis, with associated specific gene ontologies labeled in bold italics. **(C)** The same co-expression network as in **(B)** with nodes color-coded according to LFC of gene expression upon infection by *S. sclerotiorum* determined by RNA sequencing (GEO accession GSE106811). LFC, log<sub>2</sub> fold change of gene expression.

gene expression. Using a Tukey HSD test, we found that the phylogenetic group effect is due to contrasted expression patterns of genes from groups h and d ( $p$ -value 0.022). A Tukey HSD test on the stress variable indicated that the stress effect is due to *S. sclerotiorum* infection triggering PADRE gene expression significantly different from every other stresses ( $p$ -value < 0.05), except for *Pst* DC3000 *AvrRPS4* infection and heat stress ( $p$ -values 0.361 and 0.097, respectively). Therefore, we detected an association (i) between two PADRE phylogenetic groups and responsiveness to multiple stresses and (ii) between the expression of PADRE genes and infection by *S. sclerotiorum*. In addition, visual inspection of **Figure 6A** suggested that *S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *Pst* DC3000 *AvrRPS4*, *V. dahliae*, *A. brassicicola*, and heat stress induced similar transcriptional responses in PADRE genes.

To get insights into genes functioning in the same processes as PADRE genes, we retrieved a co-expression network for *AtPADRE* genes from the ATTED-II database covering 14,668 microarray samples (Obayashi et al., 2018) (**Supplementary Datasheet S5 and Figure 6B**). The network was composed of 225 nodes and 523 undirected edges, including 19 *AtPADRE* genes. We mapped LFC of gene expression upon *S. sclerotiorum* inoculation obtained from our RNA sequencing analysis onto this network, revealing one major sector including predominantly highly induced genes and another sector including mostly down-regulated genes (**Figure 6C**). To emphasize biological processes involving *AtPADRE* genes, we performed a modularity analysis based on the network topology (Blondel et al., 2008) to compute subnetworks and test next if every subnetwork corresponded to gene ontology. The modularity analysis identified 12 subnetworks, four of which were significantly associated with a specific biological function (**Figures 6B,C**). A subnetwork, strongly overexpressed during *S. sclerotiorum* infection (**Figure 6C**), was involved in the perception of the fungus cell wall and in the response to chitin (FDR = 5.3E-11). Response to hypoxia (FDR = 9.45E-3, FDR = 9.29E-27) was overexpressed during infection by *S. sclerotiorum* whereas genes involved in the cell-cell junction assembly were downregulated (**Figure 6C**). The subnetwork grouping genes associated with the biosynthesis of anthocyanin (FDR = 2.7E-4), secondary metabolites with antifungal activity (Kumar Sudheeran et al., 2019), appeared overexpressed during infection. To test further the role played by *AtPADRE* genes in the topology of the network, we computed the local centrality (or degree) of every gene (**Supplementary Figure S2**). Despite the high centrality of the *At5g17350* gene, centralities of *AtPADRE* genes did not differ significantly from other genes of the network (mean degree *AtPadre* 4.63, others 4.65, Wilcoxon's test  $p$ -value = 0.53).

## DISCUSSION

Plant genomes harbor a remarkably large number of gene families that are not found in other life kingdoms, several of which function in cell signaling (Yamasaki et al., 2013) and defense (Tenhaken et al., 2005; Raffaele et al., 2007; Weidenbach et al., 2016). Through contextual searches, we identified experimental

evidence that DUF4228 genes are involved in pathogen and abiotic stress response, cadmium tolerance, disordered region-containing family (Zhang et al., 2016; Yang et al., 2020), and we propose to refer to this family as the PADRE family to reflect these functional and architectural information. Naming domains based on the first functional clues is unlikely to reflect all or the most prominent function of gene families but can foster further research on the function of these genes (Doerks et al., 2000; Habermann, 2004; Tenhaken et al., 2005). Some PADRE genes are responsive to environmental stimuli such as wounding and viruses (Akiyama et al., 2005), drought, cold, and salt (Yang et al., 2020), pointing toward yet uncharacterized molecular functions.

## Insights Into the Evolutionary History of the PADRE Domain

We identified 344 high-quality PADRE protein sequences across 13 plant genomes and used this information in a phylogenetic analysis to explore the dynamics of the PADRE domain evolution. Analysis of the extent diversity of PADRE proteins suggests that they originated before the divergence between Bryophyta and Tracheophyta, like an estimated ~50% of plant-specific domains (Kersting et al., 2012). We classified PADRE proteins into 10 phylogenetic groups, corresponding approximately to subdivisions of the three groups proposed by Yang et al. (2020). In our analysis, the phylogenetic signal was too weak to infer a common ancestor to several groups and combine them with confidence. The BadiRate analysis highlighted a strong radiation of the PADRE domain at the base of the Angiosperms, around ~350 to 175 million years ago. It should be noted that our dataset does not include sequences from the Pinophyta and Pteridophyta lineages, so that the burst of PADRE diversification may date back to the divergence of these groups or to the Angiosperm most recent common ancestor. The recent duplication of PADRE genes from groups b, d, f, g, and j in *A. thaliana* is well supported by the phylogeny and synteny analysis and consistent with Yang et al. (2020). Recent duplications in these groups are also likely in *M. truncatula*, *S. lycopersicum*, and *A. coerulea*. However, PADRE domain births remained limited or null within the core Eudicot clade, where domain loss seemed predominant. This could indicate selection toward some degree of functional specialization in the PADRE family, favoring the expansion of a few clades to the detriment of the overall domain diversity. Our pangenomic expression analysis supported somewhat consistent patterns of PADRE gene expression upon *S. sclerotiorum* inoculation within phylogenetic groups and across species. This suggests that responsiveness to fungal infection was acquired by PADRE groups f, g, h, and j early in the evolution of core Eudicots. Nevertheless, there was striking contrast in expression within groups f and g, which may indicate some degree of neo- or subfunctionalization.

## A Probable Bipartite Architecture With Structured and Disordered Regions

Sequence analysis pointed toward a bipartite architecture for the PADRE domain, with a combination of structured and intrinsically disordered regions. Intrinsically disordered

**TABLE 1** | List of experiments used to analyze the response of *A. thaliana* PADRE to multiple biotic and abiotic stresses, with the corresponding GEO accession numbers.

Plants and treatment	Plant age	Time post treatment	GEO accession
<i>A. thaliana</i> and <i>S. lycopersicum</i> inoculated by <i>S. sclerotiorum</i>	4 weeks	48 h	GSE106811
<i>R. communis</i> inoculated by <i>S. sclerotiorum</i>	4 weeks	50 h	GSE138039
<i>A. thaliana</i> inoculated by <i>Botrytis cinerea</i>	4 weeks	14 h	GSE66290
<i>A. thaliana</i> inoculated by <i>Alternaria brassicicola</i>	NA	NA	GSE83478
<i>A. thaliana</i> inoculated by <i>Verticillium dahlia</i>	14 days	24 h	GSE104590
<i>A. thaliana</i> inoculated by <i>Colletotrichum tofieldiae</i>	10 days	10 days	GSE70094
<i>A. thaliana</i> inoculated by <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	30 days	24 h	GSE88798
<i>A. thaliana</i> inoculated by <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000 AvrRPS4	4 weeks	24 h	GSE116269
<i>A. thaliana</i> inoculated by <i>Heterodera schachtii</i>	10 days	10 days	GSE72548
<i>A. thaliana</i> inoculated by CaLCuV	7 leaf stage	20 days	GSE56922
Heat-treated (37°C) <i>A. thaliana</i> Col-0	5 weeks	30 min	GSE85653
Cold-treated (4°C) <i>A. thaliana</i> Col-0	28 days	3 days	GSE112225
UV-B-treated <i>A. thaliana</i> Col-0	4 days	6 h	GSE132169

NA, not available.

regions (IDRs) are flexible protein regions lacking a stable 3D fold in solution, which may transition to an ordered state upon binding to natural ligands (Uversky, 2013). Proteins with IDRs are abundant in eukaryotic genomes and are depleted in hydrophobic residues and enriched in polar and charged residues. We found higher amino acid polarity at the C-terminus of PADRE proteins, in agreement with high disorder probability in this region. The peculiar composition and folding properties of IDRs confer specific functional properties (Sun et al., 2013; Uversky, 2013). First, IDRs are generally able to establish protein-protein interactions with multiple partners and are commonly found in hub proteins in eukaryotic networks. One paradigmatic example in plant immunity is RPM1-interacting protein 4 (RIN4) which interacts with multiple plant resistance proteins and bacterial effectors (Sun et al., 2014). In line with this property, PADRE proteins were shown experimentally to interact with calmodulins (Popescu et al., 2007) and response regulators (Dortay et al., 2008). Our co-expression network also suggests a high degree of connectivity for PADRE genes. Screening for protein-protein interactions involving PADRE proteins should prove an insightful avenue for future research. Second, IDRs are highly accessible regions and can therefore undergo complex regulations by post-translational modifications. For instance, Remorins are plant-specific proteins with a role in plant immunity (Raffaele et al., 2009; Bozkurt et al., 2014) containing structured and disordered regions, with their IDRs harboring multiple phosphorylation sites (Marín and Ott, 2012; Marín et al., 2012; Perraki et al., 2018). RIN4 also undergoes multiple post-translational modifications and regulation by proteolysis (Toruño et al., 2019). Similarly, we identified multiple phosphorylated residues in the C-terminal region of PADRE proteins, as well as degradation signals. Third, the ability to undergo a disorder-to-order transition can confer transient functionality to IDRs, such as membrane binding in Remorins (Perraki et al., 2012), cytotoxic activity of *Bordetella* CyaA toxin (O'Brien et al., 2018), and protein complex formation by cAMP response element-binding (CREB)

protein (Arai et al., 2015). We could then speculate that every PADRE protein could adopt several functions according to their cellular environment.

## Toward a Functional Understanding of PADRE Family

We report the significant induction of 31 PADRE genes upon inoculation by *S. sclerotiorum*, including 14 *AtPADRE*, 7 *RcPADRE*, and 10 *SIPADRE* genes. Radiation of the PADRE family into 10 phylogenetic groups could provide the basis for some degree of functional diversification. In line with hypothesis, Yang et al. (2020) identified 3 *AtPADRE* genes induced upon osmotic stress, 4 upon salt stress, and 5 upon cold stress. Our work revealed an intrinsically disordered region in PADRE proteins, suggesting that PADRE gene function could be context-dependent. This could explain why Yang et al. (2020) found several *AtPADRE* genes mis-regulated by salt while none were significantly responding to NaCl in the RNA sequencing dataset we analyzed (Suzuki et al., 2016). The identification of multiple subcellular localization signals in PADRE proteins (N-myristoylation, NLS, endocytic vesicles) prevents predictions regarding the site of PADRE action. The use of fluorescent protein reporter fusions in a structure-function analysis will be required to this end. This approach shall be challenging given the presence of targeting signals at both ends of the PADRE domain. We found six *AtPADRE* genes induced upon inoculation by several fungal pathogens with a necrotrophic lifestyle (*S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, and *A. brassicicola*), a bacterial pathogen (*P. syringae* pv. *tomato*), and a hemibiotrophic root-infecting fungus (*V. dahliae*), indicating that pathogens are very potent inducers of *AtPADRE* genes. The PADRE co-expression network included several important players in plant immunity such as the syntaxin SYP122 (Zhang et al., 2007), the C2-domain protein BAP1 (Yang et al., 2006), the patatin-like protein 2 PLP2 (La Camera et al., 2009), members of the RPM1-interacting protein 4 RIN4 (At3g48450), wall-associated kinase-like WAKL10 (At1g79680), and the nematode resistance protein-like HSPRO2 (At2g40000).

These findings are consistent with a role for members of the PADRE family in disease resistance.

## MATERIALS AND METHODS

### Pfam Domain Annotation and Enrichment Analyses

Pfam domains were annotated using hmmscan 3.1b1 with e-value threshold  $1E-10$  against the Pfam-A 32.0 database. Enrichment of Pfam domains among genes induced after *S. sclerotiorum* infection was analyzed using a two-proportion Z-test in R. *Arabidopsis thaliana* gene expression from GEO accession GSE106811 (Badet et al., 2017) was used in this analysis. Briefly, total RNA was extracted from the edge of developed necrotic lesions of leaves from 4-week-old plants inoculated by *S. sclerotiorum* strain 1980, as described in Peyraud et al. (2019). Samples were collected in triplicates from three plants in independent inoculation experiments. RNA sequencing was performed on an Illumina HiSeq 2500 instrument as described in Badet et al. (2017). A composite enrichment score taking into account the significance of the Z-test and the enrichment ratio was calculated with the formula  $R_Z(i) * R_r(i)$ , where  $R_Z(i)$  is the normalized rank of domain  $i$  for the Z-test  $p$ -value and  $R_r(i)$  is the normalized rank of domain  $i$  for the enrichment ratio.

### RNA Sequencing Data Analysis

Raw data for RNA sequencing experiments used in this work is available in the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database with accession numbers provided in **Table 1**. All raw datasets were processed separately with DESeq2 to calculate normalized read counts (Basemean) and  $\log_2$  fold change (LFC) of expression and identify genes differentially expressed between control and treated samples. Genes were considered differentially expressed for  $LFC \geq 1.5$  and adjusted  $p$ -value  $\leq 0.01$ . In the multiple stress analysis, raw data were used for statistical analysis and LFC values were normalized for the heatmap, as follows:  $(\pm)\log_2(1 + |LFC|)$ .

### Taxonomic Distribution of PADRE Proteins

We used MAFFT Version 7.407 (Katoh et al., 2002) to align the *Arabidopsis thaliana* DUF4228 protein sequences using default parameters. After manual curation, 24 *A. thaliana* DUF4228 proteins expressed in our RNA sequencing data (GSE106811) were kept for further analysis. This alignment (**Supplementary Datasheet S1**) was used in a phmmer search on the HMMER webserver<sup>2</sup> (Potter et al., 2018) against the UniProt References Proteomes in UniProtKB (The Uniprot Consortium, 2019). The search was carried out using parameters  $-E\ 1e-10\ -domE\ 1\ -incE\ 1e-10\ -incdomE\ 0.03\ -seqdb\ uniprotrefprot$  identifying 3467 significant sequence hits. The 'target length' and length of the target alignment from the output of the HMM search were used to compare total protein length and DUF4228 domain length (**Figure 2A**). Genome sizes and total number of genes per genomes were obtained from the Phytozome 12.1 database

(Goodstein et al., 2011). Ploidy levels were obtained from the Plant DNA C-values Database on the Kew Royal Botanic Gardens website (Plant DNA C-values Database | Royal Botanic Gardens, Kew) and from the original genome papers. The timetree was generated on <http://www.timetree.org/> (Kumar et al., 2017) using species names as input. Polyploidization events described in the literature were collected from Wang et al. (2019) and Xu et al. (2019). DUF4228 proteins in complete plant genomes were identified using hmmsearch against a local instance of the Phytozome 12.1 proteome database, using the same parameters as previously.

### Phylogenetic Analysis of PADRE Proteins

We extracted DUF4228 proteins from *Marchantia polymorpha*, *Physcomitrella patens*, *Sphagnum fallax*, *Selaginella moellendorffii*, *Amborella trichopoda*, *Brachypodium distachyon*, *Setaria italica*, *Aquilegia coerulea*, *Solanum lycopersicum*, *Medicago truncatula*, *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis*, *Vitis vinifera*, and *Theobroma cacao* from our hmmsearch against Phytozome 12.1. Prior to alignment, we removed sequence Pp3c24\_13210 for having <40 amino acids and truncated the 650, 650, and 1650 N-terminal amino acids from Solyc05g013500, Thecc1EG010515, and Medtr8g069400, respectively. A first sequence alignment was performed in ClustalO (Madeira et al., 2019), and 10 sequences were removed for being too divergent, leaving 344 sequences (**Supplementary Datasheet S2**). These sequences were aligned with ClustalO, and the alignment was manually edited in Jalview to keep positions with no gap in at least 172/344 sequences, yielding a final alignment of 116 amino acids long (**Supplementary Datasheet S3**). Phylogenetic relationships were determined by a maximum likelihood approach using PhyML (Guindon et al., 2010) with aLRT branch support in phylogeny.fr (Dereeper et al., 2008), with no alignment and no alignment curation steps (**Supplementary Datasheet S4**), using the LG substitution model (Le and Gascuel, 2008) and a gamma distribution with four categories. The resulting tree had a log-likelihood of  $-48028.9$  and gamma shape parameter 1.720. The tree was rooted on *M. polymorpha* Mapoly0024s0004 and rendered with FigTree<sup>3</sup> v1.4.3. Phylogenetic groups were defined based on the most ancestral branch with support  $\geq 0.9$ . The rates of birth and death of PADRE domains were calculated using BadiRate 1.35 (Librado et al., 2012) with parameters  $-bmodel\ FR\ -ep\ CML\ -family$ .

### Bioinformatics Analyses of PADRE Sequence Features

Conserved motifs were identified in the 28 *A. thaliana* PADRE proteins using the alignment provided in **Supplementary Datasheet S3** and rendered using WebLogo 3 (Crooks et al., 2004). ELMs were identified using the ELM webserver (Gouw et al., 2018) with *A. thaliana* as species and subcellular localization not specified. Phosphorylated peptides were identified with a 'Basic search' in 'Experiment data' in the PhosPhAt 4.0 database (Durek et al., 2009). Intrinsic disorder probability was calculated using the PrDOS webserver

<sup>2</sup><https://www.ebi.ac.uk/Tools/hmmer/>

<sup>3</sup><http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

(Ishida and Kinoshita, 2007) with a false-positive rate of 5%. Grantham residue polarity was determined using the ProtScale tool in ExPASy (Gasteiger et al., 2005) with a window size of 9.

## Reconstruction of PADRE Co-expression Network

The co-expression network was built using the NetworkDrawer tool in ATTED-II version 9.2 (Obayashi et al., 2018) using the Ath-m version C7.1 platform including 14,668 microarray samples, with the Coex option “Add many genes” and PPI option “Add a few genes.” The resulting network was rendered in Cytoscape 3.6.1 (Shannon et al., 2003). Gene expression LFC upon *S. sclerotiorum* corresponds to the *A. thaliana* RNA sequencing data from Badet et al. (2017) (GSE106811), with LFC values provided as node attribute table in Cytoscape (Shannon et al., 2003). The modularity of the network was computed by the algorithm proposed by Blondel et al. (2008). Gene ontologies associated with subnetworks were determined using the GO enrichment analysis online tools<sup>4</sup>. Cutoff on FDR was set at 1E-2.

## DATA AVAILABILITY STATEMENT

RNA sequencing read datasets are available from the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database with accession numbers GSE106811, GSE138039, GSE66290, GSE83478, GSE104590, GSE70094, GSE116269, GSE72548, GSE56922, and GSE72806. The datasets generated by the analyses presented in this study are included in the article **Supplementary Material**.

## AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD, MK, and SR performed phylogenetic analyses. MD, LG, and SR performed gene expression analyses. AB and SR performed co-expression network analysis. SR conceived and designed the study. All authors contributed to writing the manuscript draft, reviewed the manuscript, and approved the final article.

## FUNDING

This work was supported by a Ph.D. grant from INRAE SPE Division to MD, and the French Laboratory of Excellence Project TULIP (Grants ANR-10-LABX-41 and ANR-11-IDEX-0002-02).

<sup>4</sup>geneontology.org

## REFERENCES

- Akiyama, K., Ueda, H., Yoda, H., and Sano, H. (2005). A novel basic pathogenesis-related protein from tobacco plants. *Plant Biotechnol.* 22, 157–159. doi: 10.5511/plantbiotechnology.22.157
- Albahlal, W. S., Obomighie, I., Blein, T., Persad, R., Chernukhin, I., Crespi, M., et al. (2018). *Arabidopsis* HEAT SHOCK TRANSCRIPTION FACTOR1b regulates multiple developmental genes under benign and stress conditions. *J. Exp. Bot.* 69, 2847–2862. doi: 10.1093/jxb/ery142
- Arai, M., Sugase, K., Dyson, H. J., and Wright, P. E. (2015). Conformational propensities of intrinsically disordered proteins influence the mechanism of

The funders had no role in the study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank the INRAE SPE division and Labex TULIP community for stimulating discussions and support.

## SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2020.00491/full#supplementary-material>

**FIGURE S1** | Genomic distribution and synteny analysis of DUF4228 genes in *A. thaliana*. For each gene, the phylogenetic clade and the level of expression ( $\log_2$  fold change) upon infection by *S. sclerotiorum* is provided. Genes significantly differentially expressed upon infection are indicated with a star (\*). Lines in the center of the graph show PADRE synteny blocks. The quartet AT2G23690/AT4G37240/AT5G66580/AT3G50800 is reported as two gene pairs in Yang et al. (2020), the quartet AT1G71015/AT2G01340/AT1G66480/AT5G37840 was not associated with gene duplication by Yang et al. (2020).

**FIGURE S2** | Modularity of genes included in the AtPADRE co-expression network. Genes with values higher than average are labeled on the graph. Boxplots show first and third quartiles (box), median (thick line) and the most dispersed values within 1.5 times the interquartile range (whiskers).

**TABLE S1** | PFAM domains enriched in genes induced upon *S. sclerotiorum* inoculation.

**TABLE S2** | Expression of 24 PADRE genes from *A. thaliana* under a range of biotic and abiotic stress, with mention of their inclusion in the list of genes upregulated upon *S. sclerotiorum* inoculation, down-regulated upon *S. sclerotiorum* inoculation and top 10% most induced genes after infection by *S. sclerotiorum*.

**TABLE S3** | Expression of 74 PADRE genes from *A. thaliana*, *S. lycopersicum* and *R. communis* upon *S. sclerotiorum* inoculation determined by RNA sequencing.

**DATASHEET S1** | Sequence alignment of 24 *A. thaliana* DUF4228 proteins produced by MAFFT and used for phmmer search, in fasta format.

**DATASHEET S2** | Full-length sequence of 344 PADRE proteins from 13 Embryophyte species in fasta format.

**DATASHEET S3** | Sequence alignment of 344 PADRE proteins from 13 Embryophyte species produced by ClustalO and used for phylogenetic analyses, in fasta format.

**DATASHEET S4** | Maximum likelihood phylogenetic tree of 344 PADRE proteins from 13 Embryophyte species, in Newick format.

**DATASHEET S5** | Co-expression gene network shown in **Figures 6B,C**, in .xgmml format.

binding and folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 9614–9619. doi: 10.1073/pnas.1512799112

Badet, T., Léger, O., Barascud, M., Voisin, D., Sadon, P., Vincent, R., et al. (2019). Expression polymorphism at the ARPC 4 locus links the actin cytoskeleton with quantitative disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytol.* 222, 480–496. doi: 10.1111/nph.15580

Badet, T., Voisin, D., Mbengue, M., Barascud, M., Sucher, J., Sadon, P., et al. (2017). Parallel evolution of the POQR prolyl oligo peptidase gene conferring plant quantitative disease resistance. *PLoS Genet.* 13:e1007143. doi: 10.1371/journal.pgen.1007143

- Bhandari, D. D., Lapin, D., Kracher, B., von Born, P., Bautor, J., Niefind, K., et al. (2019). An EDS1 heterodimer signalling surface enforces timely reprogramming of immunity genes in *Arabidopsis*. *Nat. Commun.* 10:772. doi: 10.1038/s41467-019-08783-0
- Blondel, V. D., Guillaume, J.-L., Lambiotte, R., and Lefebvre, E. (2008). Fast unfolding of communities in large networks. *J. Stat. Mech. Theory Exp.* 2008:10008. doi: 10.1088/1742-5468/2008/10/P10008
- Boisson, B., Giglione, C., and Meinel, T. (2003). Unexpected protein families including cell defense components feature in the N-myristoylome of a higher eukaryote. *J. Biol. Chem.* 278, 43418–43429. doi: 10.1074/jbc.M307321200
- Boland, G. J., and Hall, R. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Plant Pathol.* 16, 93–108.
- Bozkurt, T. O., Richardson, A., Dagdas, Y. F., Mongrand, S., Kamoun, S., and Raffaele, S. (2014). The plant membrane-associated REMORIN1.3 accumulates in discrete periaustorial domains and enhances susceptibility to phytophthora infestans. *Plant Physiol.* 165, 1005–1018. doi: 10.1104/pp.114.235804
- Corwin, J. A., Copeland, D., Feussner, J., Subedy, A., Eshbaugh, R., Palmer, C., et al. (2016). The quantitative basis of the *Arabidopsis* innate immune system to endemic pathogens depends on pathogen genetics. *PLoS Genet.* 12:e1005789. doi: 10.1371/journal.pgen.1005789
- Crooks, G. E., Hon, G., Chandonia, J. M., and Brenner, S. E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res.* 14, 1188–1190. doi: 10.1101/gr.849004
- Derbyshire, M., Mbengue, M., Barascud, M., Navaud, O., and Raffaele, S. (2019). Small RNAs from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* highlight host candidate genes associated with quantitative disease resistance. *Mol. Plant Pathol.* 20, 1279–1297. doi: 10.1111/mpp.12841
- Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., et al. (2008). Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. *Nucleic Acids Res.* 36, W465–W469. doi: 10.1093/nar/gkn180
- Dodds, P. N., and Rathjen, J. P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat. Rev. Genet.* 11, 539–548. doi: 10.1038/nrg2812
- Doerks, T., Strauss, M., Brendel, M., and Bork, P. (2000). GRAM, a novel domain in glucosyltransferases, myotubularins and other putative membrane-associated proteins. *Trends Biochem. Sci.* 25, 483–485. doi: 10.1016/s0968-0004(00)01664-9
- Dortay, H., Gruhn, N., Pfeifer, A., Schwerdtner, M., Schmülling, T., and Heyl, A. (2008). Toward an interaction map of the two-component signaling pathway of *Arabidopsis thaliana*. *J. Proteome Res.* 7, 3649–3660. doi: 10.1021/pr0703831
- Durek, P., Schmidt, R., Heazlewood, J. L., Jones, A., MacLean, D., Nagel, A., et al. (2009). PhosphoAT: The *Arabidopsis thaliana* phosphorylation site database. An update. *Nucleic Acids Res.* 38, D828–D834. doi: 10.1093/nar/gkp810
- El-Gebali, S., Mistry, J., Bateman, A., Eddy, S. R., Luciani, A., Potter, S. C., et al. (2019). The Pfam protein families database in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, D427–D432. doi: 10.1093/nar/gky995
- Eulgem, T. (2005). Regulation of the *Arabidopsis* defense transcriptome. *Trends Plant Sci.* 10, 71–78. doi: 10.1016/j.tplants.2004.12.006
- Fordyce, R. F., Soltis, N. E., Caseys, C., Gwinner, R., and Corwin, J. A. (2018). Digital imaging combined with genome-wide association mapping links loci to plant–pathogen interaction traits. *Plant Physiol.* 178, 1406–1422. doi: 10.1104/pp.18.00851
- Fukuoka, S., Saka, N., Koga, H., Ono, K., Shimizu, T., Ebana, K., et al. (2009). Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* 325, 998–1001. doi: 10.1126/science.1175550
- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., et al. (2005). “Protein identification and analysis tools on the ExPASy server,” in *The Proteomics Protocols Handbook*, ed. J. M. Walker (Totowa, NJ: Humana Press), 571–607. doi: 10.1385/1-59259-584-7:531
- Gatta, A. T., Wong, L. H., Sere, Y. Y., Calderón-Noreña, D. M., Cockcroft, S., Menon, A. K., et al. (2015). A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport. *eLife* 4, 1–46. doi: 10.7554/eLife.07253
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 43, 205–227. doi: 10.1146/annurev.phyto.43.040204.135923
- Goodacre, N. F., Gerloff, D. L., and Uetz, P. (2013). Protein domains of unknown function are essential in bacteria. *mBio* 5:e00744-13. doi: 10.1128/mBio.00744-13
- Goodstein, D. M., Shu, S., Howson, R., Neupane, R., Hayes, R. D., Fazo, J., et al. (2011). Phytozome: a comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res.* 40, D1178–D1186. doi: 10.1093/nar/gkr944
- Gouw, M., Michael, S., Sámano-Sánchez, H., Kumar, M., Zeke, A., Lang, B., et al. (2018). The eukaryotic linear motif resource - 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 46, D428–D434. doi: 10.1093/nar/gkx1077
- Grantham, R. (1974). Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science* 185, 862–864. doi: 10.1126/science.185.415.862
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst. Biol.* 59, 307–321. doi: 10.1093/sysbio/syq010
- Habermann, B. (2004). The BAR-domain family of proteins: a case of bending and binding? *EMBO Rep.* 5, 250–255. doi: 10.1038/sj.embor.7400105
- Hacquard, S., Kracher, B., Hiruma, K., Münch, P. C., Garrido-Oter, R., Thon, M. R., et al. (2016). Survival trade-offs in plant roots during colonization by closely related beneficial and pathogenic fungi. *Nat. Commun.* 7:11362. doi: 10.1038/ncomms11362
- Hegedus, D. D., and Rimmer, S. R. (2005). *Sclerotinia sclerotiorum*: when “to be or not to be” a pathogen? *FEMS Microbiol. Lett.* 251, 177–184. doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.040
- Ishida, T., and Kinoshita, K. (2007). PrDOS: prediction of disordered protein regions from amino acid sequence. *Nucleic Acids Res.* 35, W460–W464. doi: 10.1093/nar/gkm363
- Jaroszewski, L., Li, Z., Krishna, S. S., Bakolitsa, C., Wooley, J., Deacon, A. M., et al. (2009). Exploration of uncharted regions of the protein universe. *PLoS Biol.* 7:e1000205. doi: 10.1371/journal.pbio.1000205
- Katoh, K., Misawa, K., Kuma, K., and Miyata, T. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. *Nucleic Acids Res.* 30, 3059–3066. doi: 10.1093/nar/gkf436
- Kersting, A. R., Bornberg-Bauer, E., Moore, A. D., and Grath, S. (2012). Dynamics and adaptive benefits of protein domain emergence and arrangements during plant genome evolution. *Genome Biol. Evol.* 4, 316–329. doi: 10.1093/gbe/evs004
- Khafif, M., Balagué, C., Huard-Chauveau, C., and Roby, D. (2017). An essential role for the VAST domain of the *Arabidopsis* VAD1 protein in the regulation of defense and cell death in response to pathogens. *PLoS One* 12:e0179782. doi: 10.1371/journal.pone.0179782
- Khafif, M., Cottret, L., Balagué, C., and Raffaele, S. (2014). Identification and phylogenetic analyses of VAST, an uncharacterized protein domain associated with lipid-binding domains in Eukaryotes. *BMC Bioinformatics* 15:222. doi: 10.1186/1471-2105-15-222
- Krattinger, S. G., Lagudah, E. S., Spielmeier, W., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., et al. (2009). A Putative ABC Transporter Confers Durable Resistance to Multiple Fungal Pathogens in Wheat. *Science* 323, 1360–1363. doi: 10.1126/science.1166453
- Kumar, S., Stecher, G., Suleski, M., and Hedges, S. B. (2017). Timetree: a resource for timelines, timetrees, and divergence times. *Mol. Biol. Evol.* 34, 1812–1819. doi: 10.1093/molbev/msx116
- Kumar Sudheeran, P., Ovadia, R., Galsarker, O., Maoz, I., Sela, N., Maurer, D., et al. (2019). Glycosylated flavonoids: fruit’s concealed antifungal arsenal. *New Phytol.* 225, 1788–1798. doi: 10.1111/nph.16251
- La Camera, S., Balagué, C., Göbel, C., Geoffroy, P., Legrand, M., Feussner, I., et al. (2009). The *Arabidopsis* patatin-like protein 2 (PLP2) plays an essential role in cell death execution and differentially affects biosynthesis of oxylipins and resistance to pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22, 469–481. doi: 10.1094/MPMI-22-4-0469
- Le, S. Q., and Gascuel, O. (2008). An improved general amino acid replacement matrix. *Mol. Biol. Evol.* 25, 1307–1320. doi: 10.1093/molbev/msn067
- Leitch, I. J., Johnston, E., Pellicer, J., Hidalgo, O., and Bennett, M. D. (2019). *Plant DNA C-values database* (release 7.1, Apr 2019) Available online at: <https://cvalues.science.kew.org/>
- Librado, P., Vieira, F. G., and Rozas, J. (2012). BadiRate: estimating family turnover rates by likelihood-based methods. *Bioinformatics* 28, 279–281. doi: 10.1093/bioinformatics/btr623
- Liu, S., Kracher, B., Ziegler, J., Birkenbihl, R. P., and Somssich, I. E. (2015). Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for *Arabidopsis*

- immunity towards *Botrytis cinerea* 2100. *eLife* 4:e07295. doi: 10.7554/eLife.07295
- Madeira, F., Park, Y. M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., et al. (2019). The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 47, W636–W641. doi: 10.1093/nar/gkz268
- Majeran, W., Le Caer, J. P., Ponnala, L., Meinel, T., and Giglione, C. (2018). Targeted profiling of *Arabidopsis thaliana* subproteomes illuminates co- and posttranslationally N-terminal myristoylated proteins. *Plant Cell* 30, 543–562. doi: 10.1105/tpc.17.00523
- Marin, M., and Ott, T. (2012). Phosphorylation of intrinsically disordered regions in remorin proteins. *Front. Plant Sci.* 3:86. doi: 10.3389/fpls.2012.00086
- Marin, M., Thallmair, V., Ott, T., Marin, M., Thallmair, V., and Ott, T. (2012). The intrinsically disordered N-terminal region of AtREM1.3 remorin protein mediates protein-protein interactions. *J. Biol. Chem.* 287, 39982–39991. doi: 10.1074/jbc.M112.414292
- Mbengue, M., Navaud, O., Peyraud, R., Barascud, M., Badet, T., Vincent, R., et al. (2016). Emerging trends in molecular interactions between plants and the broad host range fungal pathogens *botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Front. Plant Sci.* 7:422. doi: 10.3389/fpls.2016.00422
- Mine, A., Seyfferth, C., Kracher, B., Berens, M. L., Becker, D., and Tsuda, K. (2018). The defense phytohormone signaling network enables rapid, high-amplitude transcriptional reprogramming during effector-triggered immunity. *Plant Cell* 30, 1199–1219. doi: 10.1105/tpc.17.00970
- Obayashi, T., Aoki, Y., Tadaka, S., Kagaya, Y., and Kinoshita, K. (2018). ATTED-II in 2018: a plant coexpression database based on investigation of the statistical property of the mutual rank index. *Plant Cell Physiol.* 59:e3. doi: 10.1093/pcp/pcx191
- O'Brien, D. P., Perez, A. C. S., Karst, J., Cannella, S. E., Enguéné, V. Y. N., Hessel, A., et al. (2018). Calcium-dependent disorder-to-order transitions are central to the secretion and folding of the CyaA toxin of *Bordetella pertussis*, the causative agent of whooping cough. *Toxicon* 149, 37–44. doi: 10.1016/j.toxicon.2018.01.007
- Pearson, W. R., and Sierk, M. L. (2005). The limits of protein sequence comparison? *Curr. Opin. Struct. Biol.* 15, 254–260. doi: 10.1016/j.sbi.2005.05.005
- Perchepied, L., Balagué, C., Riou, C., Claudel-Renard, C., Rivière, N., Grezes-Besset, B., et al. (2010). Nitric oxide participates in the complex interplay of defense-related signaling pathways controlling disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23, 846–860. doi: 10.1094/MPMI-23-7-0846
- Perraki, A., Cacas, J.-L., Crowet, J.-M., Lins, L., Castroviejo, M., German-Retana, S., et al. (2012). Plasma membrane localization of *Solanum tuberosum* Remorin from group 1, homolog 3 is mediated by conformational changes in a novel C-terminal anchor and required for the restriction of potato virus X movement. *Plant Physiol.* 160, 624–637. doi: 10.1104/pp.112.200519
- Perraki, A., Gronnier, J., Gouguet, P., Boudsocq, M., Deroubaix, A. F., Simon, V., et al. (2018). REM1.3's phospho-status defines its plasma membrane nanodomain organization and activity in restricting PVX cell-to-cell movement. *PLoS Pathog.* 14:e1007378. doi: 10.1371/journal.ppat.1007378
- Peyraud, R., Mbengue, M., Barbacci, A., and Raffaele, S. (2019). Intercellular cooperation in a fungal plant pathogen facilitates host colonization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 116, 3193–3201. doi: 10.1073/pnas.1811267116
- Poland, J. A., Balint-Kurti, P. J., Wissler, R. J., Pratt, R. C., and Nelson, R. J. (2009). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends Plant Sci.* 14, 21–29. doi: 10.1016/j.tplants.2008.10.006
- Popescu, S. C., Popescu, G. V., Bachan, S., Zhang, Z., Seay, M., Gerstein, M., et al. (2007). Differential binding of calmodulin-related proteins to their targets revealed through high-density *Arabidopsis* protein microarrays. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 4730–4735. doi: 10.1073/pnas.0611615104
- Potter, S. C., Luciani, A., Eddy, S. R., Park, Y., Lopez, R., and Finn, R. D. (2018). HMMER web server: 2018 update. *Nucleic Acids Res.* 46, W200–W204. doi: 10.1093/nar/gky448
- Raffaele, S., Bayer, E., Lafarge, D., Cluzet, S., Retana, S. G., Boubekeur, T., et al. (2009). Remorin, a solanaceae protein resident in membrane rafts and plasmodesmata, impairs potato virus X movement. *Plant Cell Online* 21, 1541–1555. doi: 10.1105/tpc.108.064279
- Raffaele, S., Mongrand, S., Gamas, P., Niebel, A., and Ott, T. (2007). Genome-wide annotation of remorins, a plant-specific protein family: evolutionary and functional perspectives. *Plant Physiol.* 145, 593–600. doi: 10.1104/pp.107.108639
- Rajarammohan, S., Pradhan, A. K., Pental, D., and Kaur, J. (2018). Genome-wide association mapping in *Arabidopsis* identifies novel genes underlying quantitative disease resistance to *Alternaria brassicae*. *Mol. Plant Pathol.* 19, 1719–1732. doi: 10.1111/mpp.12654
- Rausch, S. (2016). The function of *Arabidopsis* microRNAs in defense against the necrotrophic fungal pathogen *Alternaria brassicicola*. *Biologie* 7, 1–126. doi: 10.15496/publikation-16913
- Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., et al. (2014). Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Mol. Plant Pathol.* 15, 427–432. doi: 10.1111/mpp.12138
- Scholz, S. S., Schmidt-Heck, W., Guthke, R., Furch, A. C. U., Reichelt, M., Gershenzon, J., et al. (2018). *Verticillium dahliae*-*Arabidopsis* interaction causes changes in gene expression profiles and jasmonate levels on different time scales. *Front. Microbiol.* 9:217. doi: 10.3389/fmicb.2018.00217
- Shanks, C. M., Rice, J. H., Zubo, Y., Schaller, G. E., Hewezi, T., and Kieber, J. J. (2016). The Role of cytokinin during infection of *Arabidopsis thaliana* by the cyst nematode *heterodera schachtii*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 29, 57–68. doi: 10.1094/MPMI-07-15-0156-R
- Shannon, P., Markiel, A., Ozier, O., Baliga, N. S., Wang, J. T., Ramage, D., et al. (2003). Cytoscape: a software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 13, 2498–2504. doi: 10.1101/gr.1239303
- Sun, X., Greenwood, D. R., Templeton, M. D., Libich, D. S., McGhie, T. K., Xue, B., et al. (2014). The intrinsically disordered structural platform of the plant defence hub protein RPM1-interacting protein 4 provides insights into its mode of action in the host-pathogen interface and evolution of the nitrate-induced domain protein family. *FEBS J.* 281, 3955–3979. doi: 10.1111/febs.12937
- Sun, X., Rikkerink, E. H. A., Jones, W. T., and Uversky, V. N. (2013). Multifarious roles of intrinsic disorder in proteins illustrate its broad impact on plant biology. *Plant Cell* 25, 38–55. doi: 10.1105/tpc.112.106062
- Suzuki, N., Bassil, E., Hamilton, J. S., Inupakutika, M. A., Zandalinas, S. I., Tripathy, D., et al. (2016). ABA is required for plant acclimation to a combination of salt and heat stress. *PLoS One* 11:e0147625. doi: 10.1371/journal.pone.0147625
- Tavidou, E., Pireyre, M., and Ulm, R. (2020). Degradation of the transcription factors PIF4 and PIF5 under UV-B promotes UVR8-mediated inhibition of hypocotyl growth in *Arabidopsis*. *Plant J.* 101, 507–517. doi: 10.1111/tpj.14556
- Tenhaken, R., Doerks, T., and Bork, P. (2005). DCD - A novel plant specific domain in proteins involved in development and programmed cell death. *BMC Bioinformatics* 6:169. doi: 10.1186/1471-2105-6-169
- The Uniprot Consortium. (2019). UniProt: a worldwide hub of protein knowledge. *Nucleic Acids Res.* 47, D506–D515. doi: 10.1093/nar/gky1049
- Toruño, T. Y., Shen, M., Coaker, G., and Mackey, D. (2019). Regulated disorder: posttranslational modifications control the RIN4 plant immune signaling hub. *Mol. Plant Microbe Interact.* 32, 56–64. doi: 10.1094/MPMI-07-18-0212-FI
- Uversky, V. N. (2013). A decade and a half of protein intrinsic disorder: biology still waits for physics. *Protein Sci.* 22, 693–724. doi: 10.1002/pro.2261
- Wang, J., Qin, J., Sun, P., Ma, X., Yu, J., Li, Y., et al. (2019). Polyploidy index and its implications for the evolution of polyploids. *Front. Genet.* 10:807. doi: 10.3389/fgene.2019.00807
- Weidenbach, D., Esch, L., Möller, C., Hensel, G., Kumlehn, J., Höfle, C., et al. (2016). Polarized defense against fungal pathogens is mediated by the jacalin-related lectin domain of modular poaceae-specific proteins. *Mol. Plant* 9, 514–527. doi: 10.1016/j.molp.2015.12.009
- Xu, X., Yang, Y., Liu, C., Sun, Y., Zhang, T., Hou, M., et al. (2019). The evolutionary history of the sucrose synthase gene family in higher plants. *BMC Plant Biol.* 19:566. doi: 10.1186/s12870-019-2181-4
- Yamasaki, K., Kigawa, T., Seki, M., Shinozaki, K., and Yokoyama, S. (2013). DNA-binding domains of plant-specific transcription factors: structure, function, and evolution. *Trends Plant Sci.* 18, 267–276. doi: 10.1016/j.tplants.2012.09.001
- Yang, H., Li, Y., and Hua, J. (2006). The C2 domain protein BAP1 negatively regulates defense responses in *Arabidopsis*. *Plant J.* 48, 238–248. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02869.x

- Yang, Q., Niu, X., Tian, X., Zhang, X., Cong, J., Wang, R., et al. (2020). Comprehensive genomic analysis of the DUF4228 gene family in land plants and expression profiling of ATDUF4228 under abiotic stresses. *BMC Genomics* 21:12. doi: 10.1186/s12864-019-6389-3
- Zhang, M., Mo, H., Sun, W., Guo, Y., and Li, J. (2016). Systematic isolation and characterization of cadmium tolerant genes in tobacco: a cDNA library construction and screening approach. *PLoS One* 11:e0161147. doi: 10.1371/journal.pone.0161147
- Zhang, Z., Feechan, A., Pedersen, C., Newman, M. A., Qiu, J. L., Olesen, K. L., et al. (2007). A SNARE-protein has opposing functions in penetration resistance and defence signalling pathways. *Plant J.* 49, 302–312. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02961.x
- Zorzatto, C., MacHado, J. P. B., Lopes, K. V. G., Nascimento, K. J. T., Pereira, W. A., Brustolini, O. J. B., et al. (2015). NIK1-mediated translation suppression functions as a plant antiviral immunity mechanism. *Nature* 520, 679–682. doi: 10.1038/nature14171
- Zuther, E., Schaarschmidt, S., Fischer, A., Erban, A., Pagter, M., Mubeen, U., et al. (2019). Molecular signatures associated with increased freezing tolerance due to low temperature memory in *Arabidopsis*. *Plant Cell Environ.* 42, 854–873. doi: 10.1111/pce.13502

**Conflict of Interest:** The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Didelon, Khafif, Godiard, Barbacci and Raffaele. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

## Résultats complémentaires et discussion

L'étude de la famille de gènes PADRE a mis en avant une famille de gènes spécifique des plantes, apparue avant la divergence entre les bryophytes et les trachéophytes, comme environ 50% des domaines spécifiques aux plantes (Kersting et al., 2012). Dans cet article nous montrons que l'expression de 31 gènes PADRE (14 AtPADRE chez *A. thaliana*, 7 chez le ricin et 10 chez la tomate) est significativement induite en réponse à l'infection par *S. sclerotiorum* (**Figure 5 de l'article**). Nous montrons également que 6 AtPADRE ont une expression significativement induite par des champignons pathogènes nécrotrophes (*S. sclerotiorum*, *B. cinerea* et *A. brassicicola*), une bactérie pathogène (*P. syringae* pv. *tomato*) et un champignon pathogène hémibiotrophe (*V. dahliae*). Ces résultats montrent que des agents pathogènes sont à l'origine de fortes inductions de gènes AtPADRE. L'expression des gènes PADRE peut également être induite par des stress abiotiques. L'expression de 9 AtPADRE est significativement induite par le chaud (37°C) et 8 sont induits par le froid (4°C) (**Figure 6 de l'article**). L'expression de 3 AtPADRE est significativement induite par un stress osmotique et 4 par un stress salin (Yang et al., 2020). Ainsi, l'expression des gènes AtPADRE est soumise aux régulations dues aux stress biotiques et abiotiques et pour certains de ces gènes, les deux à la fois. Cette dualité entre les stress biotiques et abiotiques dans la régulation de l'expression des gènes PADRE est intéressante au regard de l'étude de l'impact du climat sur la résistance des plantes au pathogènes. Ces résultats positionnent ainsi la famille PADRE en tant que candidat de choix dans ce sujet de recherche.

Dans le cadre de l'étude de l'impact du climat sur la résistance d'*A. thaliana* au champignon pathogène *S. sclerotiorum*, exposée dans le chapitre précédent, nous avons analysé le phénotype de deux mutants de gènes AtPADRE (*At1g76600* et *At5g37840*) en réponse à l'infection *S. sclerotiorum* en fonction du climat. Pour cela nous avons cultivé les mutants *At1g76600\_1*, *At5g37840\_1* et l'accession sauvage Col-0 dans trois climats représentant une évolution du climat suite au réchauffement climatique. Nous avons ensuite analysé le phénotype de sensibilité des plantes en réponse à l'infection par *S. sclerotiorum* grâce à une technique de phénotypage automatique à résolution temporelle (Barbacci et al., 2020). Ces analyses ont montré que le mutant du gène *At1g76600* était plus résistant que l'accession sauvage Col-0 dans les trois climats observés (**Figure 21**). Le mutant du gène *At5g37840* était plus résistant que l'accession sauvage Col-0 dans le climat chaud, plus sensible que Col-0 dans le climat intermédiaire et ne présentait aucune différence de phénotype avec Col-0 dans le climat froid (**Figure 21**). Ces analyses confirment ainsi d'une part l'hypothèse que certains gènes PADRE pourraient être impliqués négativement dans les mécanismes de défense d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*. D'autre part, ces analyses montrent que le climat dans lequel les plantes ont été cultivées a un impact sur les mécanismes de défense impliquant certains gènes PADRE.

Dans l'étude de Yang et. al, l'expression de *At1g28190* est induite en réponse au froid, au sel et au stress osmotique (Yang et al., 2020). Ils montrent également qu'il existe un lien de co-expression avec des protéines impliqués dans les mécanismes de défense des plantes comme ATL6 (*Arabidopsis Toxicos en Levadura 6* ; AT3G05200) et XLG2 (*Extra-Large GTP-*

*binding 2* ; AT4G34390), impliqué dans la voie de l'acide salicylique et une protéine impliquée dans la réponse aux stress salin et osmotique ATMYB15 (AT2G23320) (Yang et al., 2020). AT5G12340 interagit également avec ATL6 (Yang et al., 2020). Enfin, 4 éléments de régulation en cis TCA, impliqués dans la réponse à l'acide salicylique, sont retrouvés dans le promoteur d'*At1g28190* (Yang et al., 2020). Bien que les voies de défense médiées par l'acide salicylique soient généralement associées à la défense face aux pathogènes biotrophes, il a été montré que l'acide salicylique est impliqué dans la défense à *S. sclerotiorum* (Guo and Stotz, 2007; Nováková et al., 2014; Wang et al., 2011). Ainsi, AT1G28190 est une protéine dont l'expression est modulée par les stress abiotiques et qui est impliquée dans les mécanismes de défense des plantes, vraisemblablement par la voie de l'acide salicylique. Ceci est cohérent avec le lien de co-expression observé avec la guanylyl cyclase WAKL10 (*Wall-Associated Kinase-Like 10*) (**Figure 6 de l'article**) impliquée dans les mécanismes de défense via son action de régulation négative de la sénescence et dont l'expression est induite en réponse à un traitement par l'acide salicylique (Bot et al., 2019; Li et al., 2021; Meier et al., 2010).

Dans le chapitre précédent, nous avons réalisé une double analyse d'expression différentielle permettant d'analyser les profils d'expression des gènes d'*A. thaliana* en réponse au climat et à l'infection par *S. sclerotiorum*. Cette analyse nous a permis de réaliser une sélection de 264 gènes dont l'expression était à la fois modulée par l'infection par *S. sclerotiorum* et par le climat, les gènes CAIG. 4 AtPADRE (*At1g28190*, *At2g01340*, *At5g12340* et *At5g37840*) étaient retrouvés parmi les gènes CAIG. Les gènes AtPADRE étaient ainsi surreprésentés parmi les gènes CAIG (test de proportion, p-value =  $6,2 \cdot 10^{-11}$ ). *At2g01340* et *At5g37840* font partie de la sous-famille AtPADRE f tandis que *At1g28190* et *At5g12340* font partie de la sous-famille h (**Figure 3 de l'article**). Dans l'analyse des profils d'expression en réponse à de multiples stress, *At2g01340* et *At5g37840* présentaient un profil d'expression similaire avec une surexpression en réponse aux 5 pathogènes (*S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *A. brassicicola*, *P. syringae* pv. *tomato* et *V. dahliae*) et au chaud (Figure 6 de l'article). *At2g01340* était également surexprimé en réponse au froid (**Figure 6 de l'article**). *At1g28190* et *At5g12340* présentaient également un profil d'expression similaire avec une surexpression en réponse à 4 des 5 pathogènes étudiés (*S. sclerotiorum*, *B. cinerea*, *P. syringae* pv. *tomato* et *V. dahliae*) pour *At5g12340* et aux 5 pathogènes pour *At1g28190*. Afin de déterminer si, comme *At5g37840* et *At1g76600*, les autres gènes AtPADRE appartenant aux gènes CAIG sont impliqués dans la défense à *S. sclerotiorum* en fonction du climat, il serait intéressant d'analyser le phénotype de sensibilité de mutants de ces gènes en réponse à *S. sclerotiorum* après avoir été cultivées dans différents climats.

A ce jour, aucune étude ne permet de formuler des hypothèses quant au mode d'action des AtPADRE dans la réponse au stress biotiques et abiotiques. Un premier pas vers la compréhension des mécanismes impliquant les protéines AtPADRE serait l'observation de leur localisation subcellulaire. Nos analyses bioinformatiques ont révélé la présence de plusieurs signaux de localisation subcellulaire dans les protéines AtPADRE (N-myristoylation, NLS (*Nuclear Localization Signal*) et vésicules d'endocytose) (Figure 4 de l'article). Ces différents signaux de localisation subcellulaire ne nous permettent donc pas de formuler d'hypothèse sur leur localisation. Afin de déterminer leur localisation subcellulaire expérimentalement, des constructions génétiques sont en cours de réalisation dans l'équipe

afin de permettre la surexpression d'AT1G76600 et AT5G37840 sous la forme de protéines de fusion avec une étiquette GFP.



# Chapitre III : Le vent, une conséquence thermique qui module la résistance d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*.

## Introduction

Le vent est une des composantes du climat. Il résulte d'un déséquilibre thermodynamique créé par un gradient thermique. Le vent est un écoulement d'air dirigé d'une zone de basse température et de haute pression vers une zone de haute température et faible pression dont la vitesse devient nulle lorsque température et pression sont les mêmes. Il existe une grande disparité géographique de la vitesse du vent à la surface de la Terre qui est de l'ordre de grandeur de  $3,6 \text{ km.h}^{-1}$  ( $< 36 \text{ km.h}^{-1}$ ). Les prédictions concernant l'impact du réchauffement climatique sur la vitesse du vent à la surface de la Terre prédisent une diminution de la vitesse moyenne du vent cachant de forte variabilité spatiale et temporelle (Eichelberger et al., 2008; Moemken et al., 2018).

Les effets du vent sur les plantes et leurs écosystèmes sont variés, allant de la thermorégulation à la thigmomorphogénèse, en passant par la dispersion des graines, des virus et de bactéries (de Langre, 2008). Le vent est également une source de stimulation mécanique importante pour les plantes qui participe fortement à la sélection des espèces végétales (Niklas, 1998) et à leur architecture (Eloy et al., 2017; Gardiner et al., 2016; Moulia et al., 2021). Depuis la première publication de l'étude des honamis (vagues à la surface des couverts végétaux créés par le vent) en 1955 (Inoue, 1955), de très nombreux travaux se sont intéressés aux couplages entre vent et physiologie végétale. A notre connaissance une seule étude s'est intéressée à l'effet du vent sur l'immunité du haricot en montrant que l'exposition des plants au vent modifiait la structure des lignines avec pour conséquence une meilleure protection contre diverses parasites (Cipollini Jr., 1997). Des recherches récentes réalisées dans l'équipe ont montré que les signaux mécaniques jouaient un rôle central dans la résistance des plantes en régulant spatio-temporellement la mise en place de la résistance à distance du site d'infection (Léger et al., 2021). Le vent étant une source de stimulations mécaniques majeure dans la nature, nous formulons l'hypothèse qu'il pourrait également moduler la défense des plantes à leurs pathogènes.

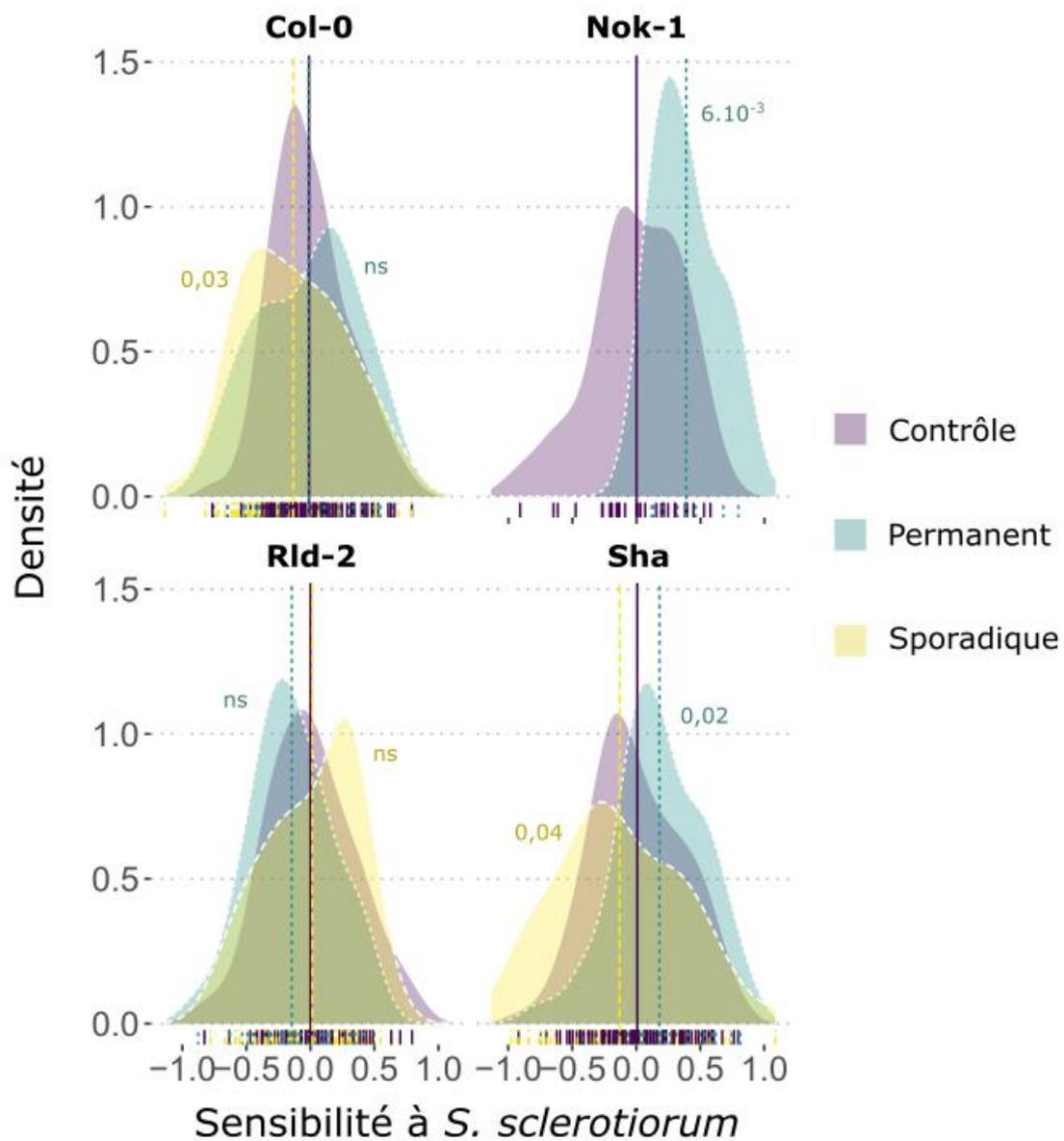
Au cours de ma thèse, j'ai réalisé les premières expériences montrant l'effet du vent sur le niveau de résistance des plantes ainsi que l'importance de la morphologie dans ce phénomène. Ces données ont permis d'obtenir un financement du métaprogramme SumCrop (Santé des cultures) et d'identifier les bases moléculaires sous-jacentes à la régulation de la QDR d'*A. thaliana* par le vent.

## Résultats

La durée du vent module différentiellement la résistance d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*.

Afin de tester les effets du vent sur la QDR des plantes, nous avons soumis différentes accessions d'*A. thaliana* à différentes conditions de vent pendant une semaine avant infection par *S. sclerotiorum*. Nous avons choisi 4 accessions naturelles d'*A. thaliana* aux propriétés morphologiques contrastées et provenant de niches écologiques dans lesquelles la vitesse moyenne du vent était contrastée. La vitesse moyenne annuelle du vent du lieu de récolte de Col-0 est de 10.8 km.h<sup>-1</sup>, 25.2 km.h<sup>-1</sup> pour Sha, 10.8 km.h<sup>-1</sup> pour Rld-2 et 18 km.h<sup>-1</sup> pour Nok-1. Pour notre expérience, la vitesse du vent a été déterminée de sorte à simuler un vent moyen de vitesse moyenne égale à 10 km.h<sup>-1</sup>. Pour tester la potentielle acclimatation (ou désensibilisation) de la plante aux signaux mécaniques (Martin et al., 2010), nous avons exposé des plants de 4 semaines à un vent permanent ou sporadique pendant une semaine avant l'infection par *S. sclerotiorum*. Le vent sporadique correspondant à une heure de vent par jour.

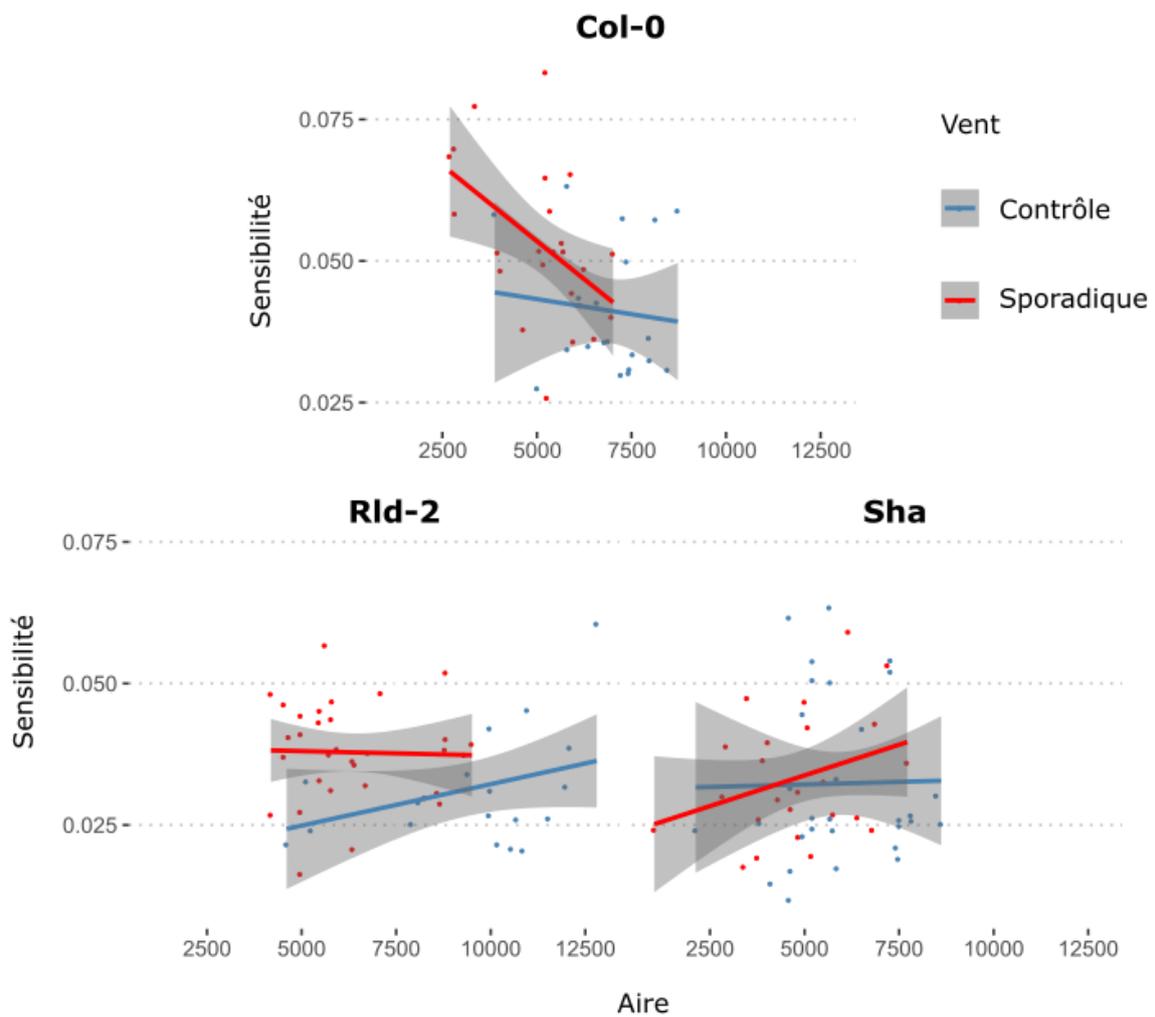
L'étude phénotypique a montré que la quantité de vent et le génotype étaient deux paramètres déterminant pour expliquer l'augmentation ou la diminution du niveau de résistance constatée. Ainsi, pour Sha et Nok1 le vent permanent augmentait significativement la sensibilité à *S. sclerotiorum* alors qu'elle la diminuait chez Rld-2. Le vent sporadique, au contraire, entraînait une diminution de la sensibilité de Col-0 et Sha (**Figure 22**). Ces résultats montrent que le vent module fortement le niveau de résistance en fonction du génotype mais aussi de la quantité de signaux mécaniques créés par le vent.



**Figure 22 : Effet de la fréquence du vent sur la sensibilité d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*.** Phénotype de sensibilité à *S. sclerotiorum* des accessions naturelles d'*A. thaliana* Col-0, Nok-1, Rld-2 et Sha après exposition pendant une semaine à du vent permanent (en bleu), sporadique (1 h par jour, en jaune) ou sans vent (en violet). La significativité des résultats a été évaluée avec le test de Wilcoxon. La p-value est indiquée en bleu pour la comparaison entre le vent permanent et le contrôle sans vent et en jaune pour la comparaison entre le vent sporadique et le contrôle sans vent, ns : p-value > 0,05.

L'impact du vent sur la résistance d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum* dépend de la quantité de signaux mécaniques perçue par la plante.

Afin de mieux comprendre les effets du vent sur les plantes, la quantification du signal mécanique généré dans la plante par le vent est requise (Mouliia et al., 2015). Coutand et Mouliia (2000) ont montré que ce qui était réellement perçu par la plante n'était pas la force de trainée créée par le vent mais la déformation cellulaire qu'engendrait cette force (Coutand and Mouliia, 2000). Ce résultat expérimental solidement établi depuis 2000, s'explique aisément au niveau cellulaire. La membrane plasmique, solidaire de la paroi dans les cellules turgescentes, porte la charge mécanique de la paroi. Les canaux mécanosensibles (MSL, MCA, TPK, PIEZO) enchâssés dans la membrane, sont donc ouverts lors de la mise sous tension de la paroi. D'un point de vue biomécanique, la cellule végétale est assimilée à un solide creux rempli d'eau qui est un liquide incompressible. Les déformations associées aux contraintes dans la paroi causent donc la mise sous tension de la membrane et l'ouverture des canaux lorsque la déformation est suffisante. D'un point de vue théorique, le calcul exact de la déformation créée par le vent demanderait de connaître des paramètres à différentes échelles spatiales difficilement mesurables telles que la morphologie cellulaire et la résistance mécanique de la paroi. Pour évaluer la relation potentielle entre la quantité de signaux et le phénotype de résistance d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*, nous faisons l'approximation que la déformation est proportionnelle à la surface de la feuille. Cette hypothèse implique que les propriétés mécaniques de la paroi, les propriétés morphologiques des cellules ainsi que la vitesse du vent sont supposées similaires pour chaque plante quel que soit le génotype. Nous avons ainsi mesuré l'aire de chacune des feuilles infectées par *S. sclerotiorum* et cherché une relation entre cette aire et le phénotype de résistance de la feuille, en condition de vent sporadique ou sans vent. Les résultats ont montré que pour Col-0, sans vent, la taille des feuilles n'avait pas d'effet sur le phénotype de sensibilité à *S. sclerotiorum* (ANOVA p-value  $\geq 0,05$ ), tandis que suite à la stimulation avec un vent sporadique, plus les feuilles étaient grandes, plus elles étaient résistantes à l'infection par *S. sclerotiorum* (p-value = 0,02) (**Figure 23**). Pour Sha, nous avons observé une tendance inverse, en présence de vent sporadique, plus les feuilles étaient grandes, plus elles étaient sensibles à *S. sclerotiorum* (p-value  $\geq 0,05$ ) (**Figure 23**). Enfin, pour Rld-2, la taille des feuilles n'influçait pas le phénotype de sensibilité à *S. sclerotiorum* en fonction du vent (p-value  $\geq 0,05$ ) (**Figure 23**). Ces résultats, bien que tendancielles, montrent que la modulation de la résistance par les signaux mécaniques associés au vent dépendent du génotype et de la quantité de signaux perçus par la plante c'est-à-dire des propriétés mécaniques et morphologiques.



**Figure 23 : L'impact du vent sur la résistance dépend de la taille des feuilles.** Représentation du phénotype de sensibilité d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum* après exposition au vent sporadique, en fonction de l'aire des feuilles. Le niveau de sensibilité de chaque feuille, représenté en y, a été mesuré grâce à la technique de phénotypage automatique à résolution temporelle (Barbacci et al., 2020). L'aire de chaque feuille est représentée en x (pixels).

## Discussion

Bien que très exploratoires, ces résultats nous permettent d'émettre l'hypothèse que les signaux mécaniques associés au vent mènent à une régulation des mécanismes de défense de la plante, les mécanismes de la QDR mécano-dépendants (que nous avons appelés thigmoimmunité). Les résultats présentés ici ont tous été confirmés dans une étude plus détaillée portant sur la modulation de la résistance de 113 accessions d'*A. thaliana*.

Les signaux mécaniques associés au vent semblent modifier la sensibilité de la plante à mécano-percevoir (Martin et al., 2010). Lorsque la quantité de signal est faible, la plante devient plus sensible aux signaux mécaniques en cohérence avec la surexpression des canaux mécanosensibles observée après une flexion chez le peuplier (Pomiès et al., 2017). Lorsque la quantité de signaux devient plus importante, la plante s'acclimate et se désensibilise à la perception du signal récurrent (Martin et al., 2010), une nouvelle fois en cohérence avec la répression de l'expression des gènes codant les canaux mécanosensibles (Pomiès et al., 2017). Comme les signaux mécaniques associés aux infections régulent une partie de la réponse immunitaire (Léger et al., 2021), la modulation de la sensibilité de la mécanoperception par le vent expliquerait les variations phénotypiques des résistances constatées. Lorsque la quantité de signal associée au vent cause la sensibilisation de la plante alors la réponse aux signaux mécaniques associés à l'infection est plus efficace se traduisant par une augmentation du niveau de résistance. Inversement, lorsque la quantité de signaux mécaniques est plus forte provoquant l'acclimatation de la plante, la réponse de la plante aux signaux mécaniques associés à l'infection est faible ou inhibée se traduisant par une augmentation de la sensibilité à *S. sclerotiorum*. Le seuil limite de quantité de signal au-delà duquel la plante s'acclimate semble dépendre fortement du génotype et présenter une forte variabilité. La contribution de la mécanoperception des signaux mécaniques associés à l'infection contribue à 40% du phénotype de résistance de la feuille. L'acclimatation complète de la plante par les signaux mécaniques associés au vent devrait donc provoquer une diminution de l'ordre de 40%, variation constatée dans l'étude des 113 accessions.

Les expériences que nous avons menées ont permis de mettre clairement en évidence une modulation de la résistance par une composante climatique jamais explorée dans ce contexte. Cette expérience exploratoire a également montré l'investissement temporel qu'il aurait fallu faire pour mener à bien cette recherche. Après recommandation du comité de thèse et considération faite des autres résultats disponibles au moment de cette expérience, il semblait judicieux d'investir mes efforts sur les autres facettes de mon travail.

# Discussion générale

Les travaux réalisés au cours de ma thèse visent à mieux comprendre l'impact du climat sur la résistance quantitative de la plante modèle *A. thaliana* au champignon pathogène *S. sclerotiorum*. Dans ce but, nous avons d'abord évalué l'impact d'une modification des températures sur la résistance de différentes accessions naturelles d'*A. thaliana*. Pour identifier les gènes impliqués dans la résistance en fonction du climat, nous avons créé différentes conditions de culture simulant une évolution du climat représentative du réchauffement climatique et réalisé une analyse transcriptomique de la réponse à *S. sclerotiorum* en fonction du climat et des accessions d'*A. thaliana*. Dans un second temps, afin de caractériser des gènes de fonction inconnue impliqués dans la QDR en fonction du climat, nous avons réalisé une étude phylogénétique et bioinformatique d'une famille de gènes possédant un domaine de fonction inconnue (DUF) que nous avons nommé PADRE. Enfin, dans le but de comprendre l'impact des conséquences secondaires du réchauffement climatique sur la QDR, nous avons étudié l'impact du vent sur la résistance d'*A. thaliana* à *S. sclerotiorum*.

Les principaux résultats émergents de ces travaux sont i) l'observation que les accessions d'*A. thaliana* sont moins résistantes à l'infection par *S. sclerotiorum* dans un climat chaud et ii) l'identification de gènes impliqués dans la QDR en fonction du climat comme le facteur de transcription NAC (*At3g12910*). Nous avons également iii) caractérisé une famille DUF (PADRE) et montré son implication dans la réponse aux champignons pathogènes et dans la QDR en fonction du climat. Enfin, iv) nous avons pour la première fois mis en évidence l'impact du vent sur la résistance des plantes aux pathogènes. Ces résultats confirment s'il en était besoin, l'impact négatif du réchauffement climatique sur la résistance des plantes aux pathogènes et fournissent un nouveau point d'entrée pour la compréhension des mécanismes sous-jacents.

## Les pathogènes s'adaptent plus rapidement au réchauffement climatique que les plantes.

Le réchauffement climatique a un effet sur les mécanismes de résistance des plantes mais a également un effet sur les pathogènes. Dans le cas de *S. sclerotiorum*, un fort taux d'humidité est nécessaire pour sa croissance (Abawi and Grogan, 1975). La température influence le type de germination, carpogénique ou mycéliogénique (Huang et al., 1998; Michael et al., 2021; Phillips, 1987) et également sa vitesse de croissance (Domingues et al., 2016; Kamesh Krishnamoorthy et al., 2017). De plus, *S. sclerotiorum* présente une distribution géographique très large avec une adaptation des isolats régionaux aux températures locales (Purdy, 1979; Uloth et al., 2015).

Globalement, le réchauffement climatique induit une migration des pathogènes vers les pôles (Bebber et al., 2013; Chakraborty, 2013). Les champignons comme *S. sclerotiorum* pourront migrer notamment grâce à la dispersion de leurs spores par le vent. Dans le contexte d'un commerce mondialisé, les pathogènes peuvent également se disperser en suivant le commerce de plantes cultivées (Fisher et al., 2012; Hulme, 2021; Levine and D'Antonio, 2003). De leur côté, les pathogènes n'ayant pas migré peuvent s'adapter au réchauffement climatique grâce à leur plasticité phénotypique ou en évoluant vers une version plus adaptée au climat local (Chakraborty, 2013). La pression de sélection appliquée par des températures non-optimales semblent en effet accélérer l'évolution du pathogène. Une étude réalisée sur le champignon pathogène hémibiotrophe *Rhynchosporium commune* a montré que l'exposition du champignon à des températures supérieures à son optimum de croissance entraînait une accélération de l'évolution vers une diversification des gènes (Stefansson et al., 2013). Enfin, le temps de génération des microorganismes pathogènes est plus court que celui des plantes. Ceci favorise une adaptation des pathogènes au réchauffement climatique plus rapide que pour les plantes. Pour limiter les pertes de production dues à une adaptation rapide des pathogènes au réchauffement climatique, des variétés plus résistantes aux pathogènes dans cet environnement changeant devront être sélectionnées par l'Homme. Dans les expériences réalisées pendant ma thèse nous avons ainsi choisi de ne pas prendre en compte l'effet du climat sur *S. sclerotiorum* et de nous concentrer sur l'impact du climat sur la résistance des plantes.

## La QDR est hautement multigénique et fortement modulée par l'environnement climatique.

Les multiples analyses transcriptomiques réalisées pendant ma thèse nous ont permis d'observer qu'en moyenne : i) 28 % des gènes étaient différentiellement exprimés en réponse à l'infection (**Figure 13**), ii) 10 % des gènes étaient différentiellement exprimés chez les plantes saines entre les différents climats (**Figure 19**) et iii) 5 % des gènes étaient différentiellement exprimés chez les plantes infectées entre les différents climats (**Figure 14**). Ces résultats mettent en évidence que la reprogrammation transcriptomique induite par l'infection est plus importante que celle induite par le climat. Ces résultats montrent également que la part de gènes modulés par le climat est réduite de moitié quand les plantes sont infectées. La réponse transcriptomique des plantes à une combinaison de stress est plus complexe que la simple combinaison de la réponse de la plante aux stress individuels (Pandey et al., 2015; Zhang and Sonnewald, 2017). Il a également été observé que la réponse de la plante aux stress combinés pouvait se rapprocher du stress le plus important ou du dernier stress appliqué (Desaint et al., 2021; Onaga et al., 2017). Dans nos expériences, l'infection par *S. sclerotiorum* semble en effet être le stress le plus important pour la plante. Il est de plus appliqué après la croissance dans divers climats. Nos résultats sont donc cohérents avec ce qui est retrouvé dans la littérature et présentent l'infection par *S. sclerotiorum* comme un

stress plus important pour la plante que le climat dans lequel elle a été cultivée. Par ailleurs, nous avons choisi d'étudier l'impact du climat en évitant l'application d'un changement rapide des températures. Les plantes étudiées au cours de ma thèse ont été cultivées pendant plusieurs semaines dans un des climats. Cette méthodologie nous a probablement permis d'éviter de créer un état de stress de la plante. Nous avons ainsi pu concentrer notre étude sur l'impact du climat lors de la croissance de la plante.

En observant les données transcriptomiques de la réponse à l'infection (**Figure 24**), on montre que parmi les gènes différentiellement exprimés en réponse à *S. sclerotiorum*, la majorité dépend du climat dans lequel la plante a été cultivée. On retrouve en moyenne pour les 3 accessions, 42 % de gènes différentiellement exprimés dans tous les climats et 58 % de gènes dont l'expression en réponse à l'infection dépend du climat (**Figure 24**). Ces résultats présentent ainsi la QDR comme un mécanisme de défense fortement modulé par le



**Figure 24 : La majorité des gènes différentiellement exprimés en réponse à *S. sclerotiorum* sont dépendants du climat.** Pour chacune des accessions Col-0, Rld-2 et Sha, un diagramme de Venn représente les DEG de la réponse à *S. sclerotiorum* dans les climats chaud (Csa, en rouge), intermédiaire (Cfa, en vert) et froid (Dfb, en bleu). Diagrammes réalisés grâce à JVENN (Bardou et al., 2014).

climat. Ainsi, bien que l'infection soit à l'origine d'une reprogrammation transcriptomique plus importante que le climat, l'éventail des gènes différentiellement exprimés en réponse à l'infection dépend fortement du climat.

La QDR est un mécanisme de défense hautement multigénique (Corwin and Kliebenstein, 2017). Plus d'un quart du génome d'*A. thaliana* est différentiellement exprimé en réponse à *S. sclerotiorum* et de nombreux QTL ont été associés à la résistance à *S. sclerotiorum* (Zhang et al., 2019). Dans le but d'identifier les gènes impliqués dans la QDR à *B. cinerea*, Corwin et al ont réalisé un GWAS qui a permis d'identifier plusieurs milliers de SNP associés à un effet modéré dans la résistance. Parmi les gènes identifiés, ils ont retrouvé des gènes déjà étudiés dans la réponse à *B. cinerea* mais également de nombreux gènes qui n'avaient jamais été associés à cette résistance comme des gènes du développement, des gènes impliqués dans le renouvellement des protéines ou dans le catabolisme (Corwin et al., 2016). Les gènes identifiés dans cette étude montraient une grande interaction avec le génotype de la plante, le génotype du pathogène et l'environnement. Au cours de ma thèse, nous avons également montré une forte interaction des gènes de la QDR à *S. sclerotiorum* avec le génotype de la plante et l'environnement. Nos résultats et la littérature nous permettent donc d'envisager la QDR comme un mécanisme de défense fortement modulé par l'environnement climatique, dépendant du génotype de la plante et impliquant de nombreux gènes non spécifiques de la défense.

L'aspect hautement multigénique et conditionnel ne facilite pas la sélection de variétés agronomiques résistantes. Dans un environnement spécifique, un QTL peut expliquer jusqu'à 43% du phénotype de résistance à *S. sclerotiorum* sans être associé à la résistance dans les autres environnements (Zhang et al., 2019). Certains gènes de résistance sont donc spécifiques à un environnement et/ou à un génotype du pathogène. Ainsi la sélection pourra difficilement se porter sur un ou quelques gènes qui apporterait une meilleure résistance à différents isolats du pathogène et dans différentes conditions climatiques. L'augmentation de la diversité génétique dans les champs pourrait participer à la lutte contre des pathogènes nécrotrophes tels que *S. sclerotiorum*. La sélection d'une diversité de génotypes où chacun serait plus résistant dans certaines conditions climatiques et face à certains isolats du pathogène pourrait permettre une réduction globale de la propagation du pathogène dans le champ.

## Une nouvelle vision de la QDR

Les expériences menées au cours de ma thèse ont montré que le génotype de la plante et l'environnement avaient un fort impact sur la QDR. Ces résultats m'ont permis de d'imaginer une nouvelle vision du fonctionnement de la QDR. Cette vision découle du modèle omnigénique formulant l'hypothèse que chaque gène différentiellement exprimé pourrait avoir un effet non nul sur le phénotype final (Boyle et al., 2017). Dans cette vision de la QDR,

le phénotype de résistance résulte de l'accumulation des effets, aussi petits qu'ils soient, de chacun des gènes différentiellement exprimés lors de l'infection. Ainsi, des gènes non spécifiques de la résistance pourraient permettre une légère augmentation de la résistance. Dans le cas de la régulation de l'ouverture des stomates par exemple, une fermeture des stomates légèrement plus rapide suite à la perception de *S. sclerotiorum* pourrait ainsi bloquer la pénétration de *S. sclerotiorum* par les stomates légèrement plus tôt et induire une légère augmentation du niveau de résistance (Bolton et al., 2006; Lumsden, 1979). L'expression de ces gènes permettant une petite augmentation de la résistance pourrait ainsi avoir été sélectionnée au fil de l'évolution pour qu'elle soit induite en réponse à l'infection et participer au phénotype de QDR. De cette manière, de nombreux gènes non spécifiques à la défense mais associés à des mécanismes physiologiques, développementaux ou autres, pourraient être impliqués dans la QDR. Ceci expliquerait ainsi la dépendance de la QDR au génotype de la plante. Des polymorphismes dans les régions régulatrices ou codantes de ces gènes pourraient alors être à l'origine de légères variations de l'expression ou de l'activité des protéines menant à une modulation du phénotype de résistance.

Dans cette vision de la QDR, la réponse de la plante à son environnement climatique peut également induire une modification du niveau de résistance. La thigmomorphogénèse en réponse au vent par exemple, peut induire des modifications de la paroi cellulaire qui pourraient altérer la pénétration de *S. sclerotiorum* (Chehab et al., 2009; Cipollini Jr., 1997). Nos expériences montrent également que certains gènes surexprimés en réponse à l'infection n'ont pas le même niveau d'expression en fonction du climat, comme les gènes CAIG (**Figure 14**). Nous pouvons ainsi imaginer qu'une fine régulation de l'expression existe, permettant une régulation dépendante à la fois de l'infection et du climat. Ainsi, l'accumulation de fines régulations de l'expression et de l'activité des gènes entre les différents génotypes et les différents environnements climatiques, mènerait au continuum de phénotypes de résistance caractéristique de la QDR.

Etonnamment, l'étude des mutants des gènes CAIG et PADRE a mis en évidence que beaucoup de ces gènes étaient des facteurs de sensibilité à *S. sclerotiorum* dans au moins un des climats. Sachant que l'expression de ces gènes est fortement induite en réponse à l'infection, nous pouvons émettre l'hypothèse que ces gènes permettent une résistance contre d'autres pathogènes mais que les mécanismes de défense impliquant ces gènes sont détournés par *S. sclerotiorum* afin d'augmenter sa virulence. Par ailleurs, les mutants des gènes *At3g12910* (CAIG, NAC) et *At5g37840* (CAIG, PADRE) présentent un phénotype intrigant. En effet, l'analyse des mutants montre que ces gènes sont des facteurs de sensibilité à *S. sclerotiorum* dans certains climats mais des facteurs de résistance dans d'autres (**Figure 16**). Les mécanismes de défense impliquant ces gènes semblent donc être spécifiques de certaines conditions environnementales et leur activation serait délétère pour la résistance dans d'autres climats. Au cours de l'évolution, leur expression a cependant été maintenue en réponse à l'infection dans des climats pour lesquels ils sont délétères pour la résistance. Nous pouvons ainsi imaginer que ces gènes apportent tout de même un avantage sélectif, autre que la résistance, dans ces climats. L'identification de la ou des fonctions de ces gènes permettrait ainsi une meilleure compréhension du rôle de ces gènes dans les mécanismes de défense dépendants du climat. Cela nous permettrait également de comprendre le compromis

sélectionné au cours de l'évolution menant à l'expression de ces gènes dans des conditions pour lesquelles ils sont délétères pour la résistance.

# Matériel et méthodes

## Matériel végétal et culture d'*A. thaliana*

Trois écotypes naturels d'*A. thaliana* ont été sélectionnés pour représenter une diversité d'origines géographiques et climatiques (**Tableau 5**). Les lignées mutantes par insertion d'ADN-T dans le fond génétique Col-0 ont été obtenues auprès du *Nottingham Arabidopsis Stock Center* (NASC). Les lignées SALK utilisées sont décrites ci-dessous (**Tableau 6**). L'homozygotie de l'insertion de l'ADN-T a été vérifiée par PCR selon les recommandations du site NASC après extraction de l'ADN génomique (voir ci-après). Les plantes ont été cultivées sous une intensité lumineuse approximative de 190  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , à 80 % d'humidité relative, pendant 4 semaines pour les climats Cfa et Csa et pendant 10 semaines pour le climat Dfb. Afin de représenter les variations de latitude entre les différents climats, la photopériode est de 11h pour le climat Csa, 13h pour le climat Cfa et 14h pour le climat Dfb (**Tableau 2**). Pour l'étude de l'impact du vent sur la résistance, les plantes ont été cultivées avec une photopériode de 9 h, sous une intensité lumineuse de 190  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$  pendant 3 semaines à 23°C. Dans les mêmes conditions de culture, elles ont ensuite été exposées à une semaine de vent permanent, sporadique (1h de vent par jour) ou à une condition contrôle sans vent. La vitesse d'écoulement du vent était de 10,8  $\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$ .

Nom	ID écotype	Numéro	Latitude	Longitude	Climat	Vent moyen
Col-0	CS76778	6909	38,3°	-92,3°	Cfa	10.8 $\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$
Nok-1	CS78282	7270	52.24	4.45	Cfb	18 $\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$
Rld-2	CS78349	7457	56,25°	34,32°	Dfb	10.8 $\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$
Shahdara	CS78397	6962	38,35°	68,48°	Csa	25.2 $\text{km}\cdot\text{h}^{-1}$

**Tableau 5 : Liste des accessions naturelles d'*A. thaliana* utilisées**

NASC ID	Nom	Gène	Fond génétique
SALK_133656	At1g07135_1	At1g07135	Col-0
SALK_052389	At1g76600_1	At1g76600	Col-0
SALK_016619C	At3g12910_1	At3g12910	Col-0
SALK_078841	At3g12910_2	At3g12910	Col-0
SALK_041095C	At5g23160_1	At5g23160	Col-0
SALK_201248c	At5g24600_1	At5g24600	Col-0
SALK_002404	At5g37840_1	At5g37840	Col-0

**Tableau 6 : Liste des lignées SALK utilisées**

## Extraction d'ADN génomique

Les extractions d'ADN génomique ont été réalisées grâce à un tampon CTAB réalisé comme ceci :

- 100 mL Tris HCl 1M, pH 7,5
- 280 mL NaCl 5M
- 40 mL EDTA 0,5M
- 20 g CTAB
- Qsp 1L ddH<sub>2</sub>O

Les échantillons de feuilles ont été prélevés à l'emporte-pièce et déposés dans des tubes contenant des billes en verre de 2 mm de diamètre. Les échantillons ont été broyés pendant 2X 30 sec à amplitude maximale dans le broyeur Retschmill MM40. 500 µL de tampon CTAB préchauffé à 60 °C ont été ajoutés aux échantillons avant d'être agités par inversion. Une première centrifugation a été réalisée pendant 10 min à 4000 rpm. 250 µL de surnageant ont été récupérés, ajoutés à 250 µL d'isopropanol et mélangés par pipetage. Après 5 à 10 min à température ambiante, une deuxième étape de centrifugation a été réalisée pendant 40 min à 4000 rpm. Le maximum de surnageant a ensuite été retiré avant d'ajouter 500 µL d'EtOH 70 %. Une dernière étape de centrifugation a été réalisée pendant 20 min à 4000 rpm. Le surnageant a ensuite été retiré avant de laisser sécher le culot et de le reprendre dans un maximum de 100 µL d'H<sub>2</sub>O.

## Culture de *S. sclerotiorum* et infection

La souche de référence 1980 de *S. sclerotiorum* a été utilisée (Derbyshire et al., 2017). Le champignon a été cultivé sur une gélose dextrosée de pomme de terre (PDA pour *Potato Dextrose Agar*), dans le noir, à 23 °C pendant 3 jours avant infection (jusqu'à ce que le mycélium soit à quelques mm du bord de la boîte de Pétri). Les infections ont été réalisées comme décrit dans Barbacci et al., 2020. 4 épaisseurs de papier absorbant ont été déposées sur un plateau de plastique transparent (poly(méthyl-méthacrylate), PMMA), saturées en eau, puis aplaties au rouleau afin d'obtenir une surface plane. Des feuilles détachées d'*A. thaliana* ou *N. benthamiana* y ont été déposées et brumisées avec de l'eau jusqu'à la formation de gouttelettes d'environ 2mm. Des morceaux de gélose colonisés par *S. sclerotiorum* ont été découpés à l'emporte-pièce et déposés sur les feuilles préalablement mouillées, face avec le mycélium en contact avec la feuille. Les feuilles ont été brumisées une seconde fois afin de saturer en eau les feuilles et la surface de contact entre la feuille et le mycélium. Le plateau a ensuite été recouvert d'une cloche en PMMA munie d'une caméra. L'intérieur de la cloche avait été préalablement brumisé afin de maintenir un fort taux d'humidité sous la cloche. Le plateau et la cloche ont enfin été placés dans une salle à 21°C afin de permettre l'infection par *S. sclerotiorum*. Une photo du plateau a été prise toutes les 10 min grâce à la caméra située dans la cloche. Grâce au script python INFEST (Barbacci et al., 2020), l'aire des lésions formées par *S. sclerotiorum* a été calculée pour chaque infection toutes les 10 min à partir des photos. Afin de déterminer le niveau de sensibilité des plantes, la vitesse de développement de la lésion (ou vitesse de croissance de *S. sclerotiorum*) a été utilisée (Barbacci et al., 2020). Sur la courbe représentant l'aire de la lésion en fonction du temps, la pente de la phase de croissance

de *S. sclerotiorum* a été calculée. Plus la pente était importante, plus la plante était considérée comme sensible à *S. sclerotiorum*. Un minimum de trois répétitions biologiques indépendantes ont été réalisées pour chaque lignée d'*A. thaliana*, représentant un minimum d'une cinquantaine de mesures par génotype.

## Séquençage d'ARN

Les extractions d'ARN pour le séquençage d'ARN ont été réalisées sur des plantes cultivées dans les trois climats (Cfa, Csa et Dfb, **Tableau 2**) puis infectées par la souche 1980 de *S. sclerotiorum*. A 48 hpi, les fronts d'infection (environ 1mm autour de la nécrose) ont été récoltés, stockés dans l'azote liquide et broyés avec des billes en verre de 2 mm de diamètre dans le broyeur Retschmill MM40 (puissance maximale pendant deux fois 30 sec). L'extraction des ARN a été réalisée avec le kit Nucleospin RNA Plus de Macherey-Nagel selon les recommandations du manuel. Trois répliques biologiques ont été réalisés pour chaque échantillon. Les *reads* ont été alignées sur le génome de référence d'*A. thaliana* TAIR 10 grâce au logiciel d'analyse de séquençage d'ARN CLC Genomics Workbench 11.0.1 (Qiagen). Les paramètres suivants ont été utilisés : *mismatch cost 2, insertion cost 3, deletion cost 3, length fraction 0,8, similarity fraction 0,8, both strands mapping* et *10 hits maximum per read*, avec la valeur d'expression donnée sous la forme des *total counts*. Les analyses d'expression différentielle ont été réalisées avec le package Bioconductor DESeq2 (version 1.26.0) (Love et al., 2013) avec R 3.6.2. Les gènes avec un LFC  $\geq |1,5|$  et une p-value ajustée par la correction de Benjamin-Hochberg inférieure ou égale à 0,1 ont été considérés comme différentiellement exprimés.

## Réseau de coexpression

Une matrice de corrélation a été réalisée grâce au package Hmisc (version 4.5.0), regroupant les coefficients de corrélation d'expression calculés pour chaque gènes CAIG deux à deux. Les coefficients de corrélation ont été calculés à partir des *reads* de chaque gène CAIG et grâce à la méthode de Pearson. Le logiciel Cytoscape (version 3.5.1) a été utilisé pour réaliser un réseau à partir de la matrice de corrélation. Uniquement les corrélations possédant un coefficient  $\geq 0,9$  ont été conservées. Un *clustering* hiérarchique a ensuite été réalisé grâce à l'extension Cytocluster (Li et al., 2017). Le *clustering* HC-PIN a été utilisé avec les paramètres par défaut (« faible », seuil à 2 et seuil ComplexSize à 3). Uniquement les clusters possédant plus de 10 nœuds ont été considérés.

## Extraction d'ARN et qRT-PCR

Les ARN récoltés pour les analyses par qRT-PCR ont été prélevés sur des plantes 24 h après infection par la souche 1980 de *S. sclerotiorum*. La récolte des échantillons a été réalisée de la même manière que pour les échantillons destinés au séquençage d'ARN. L'extraction des ARN a été réalisée avec le kit Nucleospin RNA extraction de Macherey-Nagel selon les recommandations du manuel. 1 $\mu$ g d'ARN et 0,5 $\mu$ L de la transcriptase reverse Transcriptor de

Roche ont été utilisés pour la synthèse des ADNc dans un volume de 20µL de mélange réactionnel, selon les recommandations du protocole de la transcriptase reverse. Les ADNc (dilution 1 :10) ont été utilisés comme matrice pour les analyses de RT-PCR quantitative (qRT-PCR). Les qRT-PCR ont été réalisées avec 5pmol d'oligonucléotides spécifiques (**Tableau 7**), 2µL d'ADNc et 3,5µL de SYBR GREEN I dans un volume total de 7µL. Les réactions d'amplification ont été réalisées avec le LightCycler 480 (Roche Diagnostics) selon le protocole suivant : 9min à 95°C, puis 45 cycles comprenant 5sec à 95°C, 10sec à 65°C et 20sec à 72°C. L'expression relative des gènes correspond au ratio de l'expression des gènes ciblés sur l'expression du gène de référence *At2g28390*.

### Analyse des polymorphismes

Pour chacun des gènes candidats, les polymorphismes ont été obtenus à partir de l'outil Polymorph 1001 (<https://tools.1001genomes.org/polymorph/>) du projet des 1001 génomes (The 1001 Genomes Consortium, 2016). Les polymorphismes ont été récoltés pour les 5 gènes candidats (*At1g07135*, *At3g12910*, *At5g23160*, *At5G24600* et *At5g37840*) de -1000 nucléotides avant le codon d'initiation de la traduction à la fin de la partie 3' UTR. Tous les types de polymorphisme (SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), insertions et délétions) ont été considérés, ainsi que tous les types d'impacts et d'effets. Les polymorphismes ont été récoltés pour les 1135 accessions disponibles dans l'outil Polymorph 1001. Chacune de ces accessions a ensuite été associée à un des climats de la classification de Köppen-Geiger (Köppen, 2011; Rubel and Kottek, 2010), grâce à leurs coordonnées géographiques fournies par le projet des 1001 génomes (The 1001 Genomes Consortium, 2016) et au *package* R *kgc* (disponible à <https://cran.r-project.org/web/packages/kgc/index.html>). Pour 4 accessions aucun climat n'a pu être associé car les coordonnées géographiques du lieu de prélèvement des accessions n'étaient pas renseignées. Pour chaque climat et chaque polymorphisme retrouvé dans au moins 10 % des accessions (occurrence  $\geq 132$ ), un test de proportion (z test) a été réalisé. Les climats ont été considérés comme surreprésenté pour un polymorphisme quand ils avaient une p-value  $\leq 0,05$ .

### Mutagenèse dirigée et clonage

Les fragments de la séquence codante d'*AT3G12910* ont été amplifiés par PCR avec la polymérase haute-fidélité Phusion (NEB) à partir d'ADN génomique de Col-0. Des oligonucléotides permettant l'ajout de sites de fusion nécessaires pour le clonage avec la technique du *Golden Gate* (Engler et al., 2008) ont été utilisés (**Tableau 7**). Un site de restriction de l'enzyme BbsI a été retiré du fragment de la séquence codante d'*AT3G12910* par mutagenèse dirigée par PCR avec les oligonucléotides indiqués dans le **Tableau 7**. Le premier programme utilisé pour amplifier les deux parties d'*AT3G12910* comprenait 35 cycles avec une hybridation à 45°C pendant 30 sec pour les 10 premiers cycles puis 50°C pour les 25 cycles restants et une élongation à 72°C pendant 1 min. Les produits PCR ont été purifiés avec le kit Wizard DNA Clean up de Promega (selon les recommandations du fabricant) et intégrés à un mélange PCR sans oligonucléotides pour une première amplification de 16 cycles avec une hybridation à 53°C pendant 30 sec et une élongation à 72°C pendant 1min30. Le produit

de cette PCR a ensuite été utilisé comme matrice dans une autre PCR avec les oligonucléotides pour une seconde amplification de 30 cycles avec une hybridation à 49°C pendant 30sec et une élongation à 72°C pendant 1min30. La séquence codante d'*AT3G12910* a été fusionnée avec le promoteur fort constitutif 35S (pICH51266), l'étiquette GFP (pICSL50008) et le terminateur 35S (pICH41414) dans le vecteur de niveau 1 (pICH47811) provenant de la boîte à outils Golden Gate pour plantes MoClo (Engler et al., 2014) via une succession de digestions et ligations avec l'enzyme de restriction BsaI (NEB) et la ligase T4 (NEB). Le programme était le suivant : 35 cycles avec la digestion à 37°C pendant 3min et la ligation à 16°C pendant 5 min, puis 37°C pendant 15min, 50°C pendant 15min et 85°C pendant 10min. L'unité de transcription d'*AT3G12910* a été insérée dans un plasmide de niveau 2 avec une unité de transcription contenant un gène de résistance à l'hygromycine sous promoteur 35S (fournie par l'équipe de Jean-Marc Delaux) grâce à l'enzyme de restriction BbsI (NEB) et au même programme de digestions et ligations que celui décrit précédemment. Le plasmide de niveau 2 a ensuite été introduit par transformation dans la souche C58C1 d'*Agrobacterium tumefaciens*.

### Transformation d'*E. coli*

Les différents plasmides et constructions réalisés par clonage ont été stockés dans des bactéries *Escherichia coli* à -80 °C. Les bactéries utilisées sont les souches d'*E. coli* électro-compétentes 5-alpha C2989 de chez NEB. Les bactéries ont été décongelées sur glace puis diluées par 2 avec du glycérol 10 % froid. 25 µL de bactéries ont été déposées dans un microtube 0.5 mL et 1 µL de plasmide a été ajouté. Les bactéries ont ensuite été transférées dans une cuve d'électroporation 1 mm froide. L'électroporation a été réalisée avec le GenePulser Xcell de Bio-Rad avec les paramètres suivants : 1,7 kV, 200 Ω, 25 µF. Rapidement après l'électroporation, 975 µL de SOC préchauffé à 37 °C ont été ajoutés dans la cuve d'électroporation, mélangés aux bactéries par pipetage et déposés dans un tube de 2 mL. Les bactéries ont ensuite été incubées à 37 °C pendant une heure sur une roue tournante avant d'en déposer 100 µL sur une boîte de milieu L avec antibiotique, préchauffée à 37°C. Les boîtes ont été déposées à 37°C pour incubation sur la nuit.

Préparation du milieu SOC :

- 20 g Tryptone (Sigma-Aldrich)
- 5 g Yeast extract (Duchefa Biochimie)
- 0,58 g NaCl (Acros Organics)
- 0,19 g KCl (Prolabo)
- Qsp 1L H<sub>2</sub>O permutée
- pH ajusté à 7, autoclave 120 °C pendant 20 min
- Ajout de glucose (20mM final)

#### Préparation du milieu L :

- 5 g Yeast extract (Duchefa Biochimie)
- 10 g Bacto Tryptone (Becton Dickinson Difco)
- 10 g NaCl (Acros Organics)
- 15 g Agar Agar
- Qsp 1L H<sub>2</sub>O permutée
- Autoclave 120 °C pendant 20 min

#### Transformation d'*A. tumefasciens*

Les plasmides de niveau 2 permettant la surexpression des protéines de fusion obtenus grâce à la méthode de clonage Golden Gate (Engler et al., 2008) ont été transformés dans la souche C58C1 d'*Agrobacterium tumefasciens* électrocompétente. Les bactéries ont été décongelées sur glace puis diluées par 4 avec du glycérol 10 % froid. 20 µL de bactéries ont été déposées dans un microtube 0.5 mL et 1 µL de plasmide purifié (grâce au kit de miniprep QIAprep Spin de Qiagen) a été ajouté. Les bactéries ont ensuite été transférées dans une cuve d'électroporation 1 mm froide. L'électroporation a été réalisée avec le GenePulser Xcell de Bio-Rad avec les paramètres suivants : 1,8 kV, 200 Ω, 25 µF. Rapidement après l'électroporation, 1 mL de YEB préchauffé à 28 °C a été ajouté dans la cuve d'électroporation, mélangés aux bactéries par pipetage et déposés dans un tube de 2 mL. Les bactéries ont ensuite été incubées à 28 °C pendant une heure sur une roue tournante avant d'en déposer 100 µL sur une boîte de YEB, RIF, kanamycine et antibiotique sélectif, préchauffée à 28°C. Les boîtes ont été déposées à 28°C pour incubation pendant environ 48 h.

#### Préparation du milieu YEB :

- 5 g Bacto peptone (Becton Dickinson Difco)
- 5 g Beef extract (Merck)
- 5 g Saccharose (Eurobio)
- 1 g Yeast extract (Duchefa Biochimie)
- 2 mmol.L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>, 7 H<sub>2</sub>O (Merck)
- 15 g Bacto Agar (uniquement pour le milieu YEB solide)
- Qsp 1L H<sub>2</sub>O permutée
- pH ajusté à 7,2, autoclave 120 °C pendant 20 min

#### Agro-infection de *N. benthamiana* et microscopie confocale

Les souches d'*A. tumefasciens* transformées avec les plasmides permettant l'expression constitutive des protéines de fusion AT3G12910-GFP et GFP-AT3G12910 ont été cultivées pendant 2 jours à 28°C sur un plateau agitant. Les bactéries ont ensuite été resuspendues dans une solution de MgCl<sub>2</sub> 10mM jusqu'à une densité optique de 0,5. Les feuilles de *N. benthamiana* ont été infiltrées avec cette solution sur leur partie inférieure avec une seringue de 1 mL sans aiguille. 48 h après l'agro-infiltration, les feuilles ont été observées au microscope confocal. Des disques foliaires de 7 mm ont été extraits à l'emporte-pièce et

saturés en eau par pression dans une seringue de 50 mL bouchée. Les disques ont ensuite été déposés sur des lames de microscopie, recouverts de quelques gouttes d'eau et d'une lamelle. L'observation a été réalisée sous un microscope confocal Leica TCS SP8, avec l'objectif à immersion en eau HC Fluotar X25/0.95.

Nom	Gène	Séquence	TM (°C)	GC %	Utilisation	Orientation
MD3	AT3G12910	ATGAGATCGTCAGCCAAATTG	60.09	42.86	Génotypage SALK	LP
MD4	AT3G12910	CCTGAGAATTC AACAGGTGC	59.73	47.62	Génotypage SALK	RP
MD5	AT3G12910	TAAGACCGAACCGAGTGACTG	60.3	52.38	Génotypage SALK	LP
MD6	AT3G12910	CACCTAATGGGCTTTGTTCC	60.71	47.62	Génotypage SALK	RP
MD19	AT5G24600	ATAAACGGGGAAAGAAAAAGC	58.68	38.1	Génotypage SALK	LP
MD20	AT5G24600	ATGAATCCGCAAGTGTGAAAG	60.13	42.86	Génotypage SALK	RP
MD21	AT5G37840	CCACTATGTGAATGTGCGATG	60	47.62	Génotypage SALK	LP
MD22	AT5G37840	GTAGGGATAACGATGGCCTTC	59.81	52.38	Génotypage SALK	RP
MD36	AT1G07135	tgcaaaatcttgaaaacat	57.3	28.57	Génotypage SALK	LP
MD37	AT1G07135	ggatattttcgtggcagcat	59.93	45	Génotypage SALK	RP
MD38	AT1G76600	CGGTTGTGACGTTGAATCAG	60.15	50	Génotypage SALK + qPCR	LP
MD39	AT1G76600	atcccaccacaccattaaa	59.91	45	Génotypage SALK	RP
MD44	AT5G23160	CCGAACAAGAAATCCTTCCA	60.04	45	Génotypage SALK	LP
MD45	AT5G23160	accttccgacttgtgttg	60.01	50	Génotypage SALK	RP
MD60	AT1G76600	CCGAACCAGACCGAGAATAA	60.07	50	qPCR	RP
MD68	AT3G12910	TGATGCACGAGTTTCGTCTC	59.99	50	qPCR	LP
MD69	AT3G12910	CCGGCATAACGTCCATACTT	59.85	50	qPCR	RP
MD86	AT5G23160	CCGTCTGTTGATACCCGTTT	60.11	55	qPCR	LP
MD87	AT5G23160	TCCAAGGAGGAGATCACACC	60.05	55	qPCR	RP
MD88	AT5G24600	GCTTCTAATCTCGGGCTCCT	59.95	55	qPCR	LP
MD89	AT5G24600	TTATGTGGCTGCAACGGTTA	60.13	45	qPCR	RP
MD92	AT5G37840	TGTATCCCACCGAACTCTC	59.93	55	qPCR	LP
MD93	AT5G37840	GTTGGTGCAGCAAGATCTGA	59.99	50	qPCR	RP
MD97	AT1G07135	tgtaccgtttgcccaataa	58.93	40	qPCR	LP
MD98	AT1G07135	GCCGGTTTAGTCTTGGT TCA	60.11	50	qPCR	RP
MD186	AT3G12910	AGTGTaTTCTTAGACC GATCACGG	56.3	44	PCR pour enlever site BbsI	RP
MD187	AT3G12910	CTAAAGAAACACTCGT TTATTACCTAGGAAG	55.5	34.38	PCR pour enlever site BbsI	LP
MD188	AT3G12910	ggtctctaATGGAGAAGAT GATAGAACCACGGG	57.8	48	PCR pour block Golden Gate	LP
MD189	AT3G12910	ggtctctaagcCTAACTAAGA AAAGAAGGTGGGAAAGC	56	40.74	PCR STOP pour block Golden Gate	RP
MD190	AT3G12910	ggtctctcgaACTAAGAAAAG AAGGTGGGAAAGC	55.1	41.67	PCR no stop pour block Golden Gate	RP
MD191	AT3G12910	Ggtctcggggaattgtgagatatca atccgaatgaag	54.4	32.14	Golden Gate prom	LP
MD192	AT3G12910	Ggtctcaatgggctttggttctatttc tcctttttg	55.9	35.71	Golden Gate prom tag Nter	RP
MD193	AT3G12910	Ggtctcacatgggctttggttctatttc tcctttttg	55.9	35.71	Golden Gate prom tag Cter	RP
MD220	AT3G12910	CCAACAAAGCCGTGATCG GTCTAAAGAAACACTCGT TTATTACCTAGGAAG	67.3	42.31	PCR pour enlever site BbsI	LP
MD246	tDNA-LB	TTAGACAACCTAATAACAC ATTGCGG	54.3	34.62	Séquençage Golden Gate	RP
MD247	tDNA-RB	GATTATTCTAATAAACGCT CTTTTCTTAGG	54.8	31.25	Séquençage Golden Gate	LP
MD248	AT3G12910	ATAATACCCTACAAGCT CCTCATCC	55.3	44	Séquençage Golden Gate	RP
MD249	GFP	TGAAGGTGGTCACGAG GGTGGG	62.2	63.64	Séquençage GFP_Rev	RP
MD250	GFP	AAAGACCCCAACGAGA AGCGCG	62	59.09	Séquençage GFP_Fwd	LP
MD252	AT3G12910	ggtctctcgaACTAAGAAA AGAAGGTGGGAAAGC	55.1	41.67	PCR no stop pour block Golden Gate	RP

**Tableau 7 : Liste des oligonucléotides utilisés**





# Bibliographie

Abawi, G.S., and Grogan, R.G. (1975). Source of primary inoculum and effects of temperature and moisture on infection of beans by *Whetzelinia sclerotiorum*. *Phytopathology* 300–309. .

Abawi, G.S., and Grogan, R.G. (1979). Epidemiology of Diseases Caused by *Sclerotinia* Species. *The American Phytopathological Society* 69, 899–904. .

Achuo, E.A., Prinsen, E., and 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. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2006.01340.x>.

Adams, and Ayers (1979). Ecology of sclerotinia species. *Phytopathology* 69, 896–899. .

Aida, M., Ishida, T., Fukaki, H., Fujisawa, H., and Tasaka, M. (1997). Genes Involved in Organ Separation in Arabidopsis: An Analysis of the *cup-shaped cotyledon* Mutant. *The Plant Cell* 9, 841–857. .

Allakhverdiev, S.I., Kreslavski, V.D., Klimov, V.V., Los, D.A., Carpentier, R., and Mohanty, P. (2008). Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth Res* 98, 541–550. <https://doi.org/10.1007/s11120-008-9331-0>.

An, F., Zhao, Q., Ji, Y., Li, W., Jiang, Z., Yu, X., Zhang, C., Han, Y., He, W., Liu, Y., et al. (2010). Ethylene-Induced Stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 Is Mediated by Proteasomal Degradation of EIN3 Binding F-Box 1 and 2 That Requires EIN2 in Arabidopsis. *The Plant Cell* 22, 2384–2401. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.076588>.

Anderson, J.V., Li, Q.B., Haskell, D.W., and Guy, C.L. (1994). Structural Organization of the Spinach Endoplasmic Reticulum-Luminal 70-Kilodalton Heat-Shock Cognate Gene and Expression of 70-Kilodalton Heat-Shock Genes during Cold Acclimation. *Plant Physiology* 104, 1359–1370. <https://doi.org/10.1104/pp.104.4.1359>.

Andreasson, E., Jenkins, T., Brodersen, P., Thorgrimsen, S., Petersen, N.H., Zhu, S., Qiu, J.-L., Micheelsen, P., Rocher, A., Petersen, M., et al. (2005). The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO Journal* 24, 2579–2589. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600737>.

Aoun, N., Tauleigne, L., Lonjon, F., Deslandes, L., Vailleau, F., Roux, F., and Berthomé, R. (2017). Quantitative Disease Resistance under Elevated Temperature: Genetic Basis of New Resistance Mechanisms to *Ralstonia solanacearum*. *Frontiers in Plant Science* 8, 1387. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01387>.

Aoun, N., Desaint, H., Boyrie, L., Bonhomme, M., Deslandes, L., Berthomé, R., and Roux, F. (2020). A complex network of additive and epistatic quantitative trait loci underlies natural variation of Arabidopsis thaliana quantitative disease resistance to *Ralstonia solanacearum*

under heat stress. *Molecular Plant Pathology* **21**, 1405–1420. <https://doi.org/10.1111/mpp.12964>.

Arnaud, D., and Hwang, I. (2015). A Sophisticated Network of Signaling Pathways Regulates Stomatal Defenses to Bacterial Pathogens. *Molecular Plant* **8**, 566–581. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2014.10.012>.

Atkinson, N.J., and Urwin, P.E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. *Journal of Experimental Botany* **63**, 3523–3543. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers100>.

Aung, K., Jiang, Y., and He, S.Y. (2018). The role of water in plant–microbe interactions. *The Plant Journal* **93**, 771–780. <https://doi.org/10.1111/tpj.13795>.

Ayme, V., Souche, S., Caranta, C., Jacquemond, M., Chadœuf, J., Palloix, A., and Moury, B. (2006). Different Mutations in the Genome-Linked Protein VPg of Potato virus Y Confer Virulence on the pvr23 Resistance in Pepper. *MPMI* **19**, 557–563. <https://doi.org/10.1094/MPMI-19-0557>.

Bacete, L., Mérida, H., Miedes, E., and Molina, A. (2018). Plant cell wall-mediated immunity: cell wall changes trigger disease resistance responses. *The Plant Journal* **93**, 614–636. <https://doi.org/10.1111/tpj.13807>.

Badet, T., Voisin, D., Mbengue, M., Barascud, M., Sucher, J., Sadon, P., Balagué, C., Roby, D., and Raffaele, S. (2017). Parallel evolution of the POQR prolyl oligo peptidase gene conferring plant quantitative disease resistance. *PLOS Genetics* **13**, e1007143. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007143>.

Badet, T., Léger, O., Barascud, M., Voisin, D., Sadon, P., Vincent, R., Le Ru, A., Balagué, C., Roby, D., and Raffaele, S. (2018). Expression polymorphism at the *ARPC4* locus links the actin cytoskeleton with quantitative disease resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* <https://doi.org/10.1111/nph.15580>.

Baniwal, S.K., Bharti, K., Chan, K.Y., Fauth, M., Ganguli, A., Kotak, S., Mishra, S.K., Nover, L., Port, M., Scharf, K.-D., et al. (2004). Heat stress response in plants: a complex game with chaperones and more than twenty heat stress transcription factors. *J. Biosci.* **29**, 471–487. <https://doi.org/10.1007/BF02712120>.

Barbacci, A., Navaud, O., Mbengue, M., Barascud, M., Godiard, L., Khafif, M., Lacaze, A., and Raffaele, S. (2020). Rapid identification of an *Arabidopsis* NLR gene as a candidate conferring susceptibility to *Sclerotinia sclerotiorum* using time-resolved automated phenotyping. *The Plant Journal* **103**, 903–917. <https://doi.org/10.1111/tpj.14747>.

Bardin, S.D., and Huang, H.C. (2001). Research on biology and control of *Sclerotinia* diseases in Canada <sup>1</sup>. *Canadian Journal of Plant Pathology* **23**, 88–98. <https://doi.org/10.1080/07060660109506914>.

- Barlow, K.M., Christy, B.P., O'Leary, G.J., Riffkin, P.A., and Nuttall, J.G. (2015). Simulating the impact of extreme heat and frost events on wheat crop production: A review. *Field Crops Research* 171, 109–119. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2014.11.010>.
- Barnabás, B., Jäger, K., and Fehér, A. (2007). The effect of drought and heat stress on reproductive processes in cereals. *Plant Cell Environ* 31, 11–38. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01727.x>.
- Bastien, M., Sonah, H., and Belzile, F. (2014). Genome Wide Association Mapping of *Sclerotinia sclerotiorum* Resistance in Soybean with a Genotyping-by-Sequencing Approach. *The Plant Genome* 7, plantgenome2013.10.0030. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2013.10.0030>.
- Bebber, D.P. (2015). Range-Expanding Pests and Pathogens in a Warming World. *Annual Review of Phytopathology* 53, 335–356. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120207>.
- Bebber, D.P., Ramotowski, M.A.T., and Gurr, S.J. (2013). Crop pests and pathogens move polewards in a warming world. *Nature Clim Change* 3, 985–988. <https://doi.org/10.1038/nclimate1990>.
- Beck, H.E., Zimmermann, N.E., McVicar, T.R., Vergopolan, N., Berg, A., and Wood, E.F. (2018). Present and future Köppen-Geiger climate classification maps at 1-km resolution. *Sci Data* 5, 180214. <https://doi.org/10.1038/sdata.2018.214>.
- Beer, M.A., and Tavazoie, S. (2004). Predicting Gene Expression from Sequence. *Cell* 117, 185–198. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00304-6](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00304-6).
- Bellard, C., Bertelsmeier, C., Leadley, P., Thuiller, W., and Courchamp, F. (2012). Impacts of climate change on the future of biodiversity. *Ecology Letters* 15, 365–377. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01736.x>.
- Benham, C.D., Gunthorpe, M.J., and Davis, J.B. (2003). TRPV channels as temperature sensors. *Cell Calcium* 33, 479–487. [https://doi.org/10.1016/S0143-4160\(03\)00063-0](https://doi.org/10.1016/S0143-4160(03)00063-0).
- Berens, M.L., Berry, H.M., Mine, A., Argueso, C.T., and Tsuda, K. (2017). Evolution of Hormone Signaling Networks in Plant Defense. *Annual Review of Phytopathology* 55, 401–425. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080516-035544>.
- Berg, L.V.D., and Lentz, C.P. (1968). The effect of relative humidity and temperature on survival and growth of *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Bot.* 46, 1477–1481. <https://doi.org/10.1139/b68-203>.
- Bertinetti, C., and Ugalde, R.A. (1996). Studies on the response of carrot cells to a *Sclerotinia sclerotiorum* elicitor: induction of the expression of an extracellular glycoprotein mRNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI* 9, 658–663. .
- Bidzinski, P., Ballini, E., Ducasse, A., Michel, C., Zuluaga, P., Genga, A., Chiozzotto, R., and Morel, J.-B. (2016). Transcriptional Basis of Drought-Induced Susceptibility to the Rice Blast

Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Frontiers in Plant Science* 7, 1558. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01558>.

Birkenbihl, R.P., Diezel, C., and Somssich, I.E. (2012). *Arabidopsis WRKY33* Is a Key Transcriptional Regulator of Hormonal and Metabolic Responses toward *Botrytis cinerea* Infection. *PLANT PHYSIOLOGY* 159, 266–285. <https://doi.org/10.1104/pp.111.192641>.

Bitá, C., and Gerats, T. (2013). Plant tolerance to high temperature in a changing environment: scientific fundamentals and production of heat stress-tolerant crops. *Frontiers in Plant Science* 4, 273. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00273>.

Bloom, A.J., Zwieniecki, M.A., Passioura, J.B., Randall, L.B., Holbrook, N.M., and St. Clair, D.A. (2004). Water relations under root chilling in a sensitive and tolerant tomato species. *Plant, Cell & Environment* 27, 971–979. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2004.01200.x>.

Boese, S.R., Wolfe, D.W., and Melkonian, J.J. (1997). Elevated CO<sub>2</sub> mitigates chilling-induced water stress and photosynthetic reduction during chilling. *Plant, Cell & Environment* 20, 625–632. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1997.00082.x>.

Boland, G.J. (1994). Index of plant hosts of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Canadian Journal of Plant Pathology* v. 16, 93–100. <https://doi.org/10.1080/07060669409500766>.

Bolger, T.P., Upchurch, D.R., and McMichael, B.L. (1992). Temperature effects on cotton root hydraulic conductance. *Environmental and Experimental Botany* 32, 49–54. [https://doi.org/10.1016/0098-8472\(92\)90029-2](https://doi.org/10.1016/0098-8472(92)90029-2).

Bolton, M.D., Thomma, B.P.H.J., and Nelson, B.D. (2006). *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular Plant Pathology* 7, 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2005.00316.x>.

Bot, P., Mun, B.-G., Imran, Q.M., Hussain, A., Lee, S.-U., Loake, G., and Yun, B.-W. (2019). Differential expression of *AtWAKL10* in response to nitric oxide suggests a putative role in biotic and abiotic stress responses. *PeerJ* 7, e7383. <https://doi.org/10.7717/peerj.7383>.

Boyle, E.A., Li, Y.I., and Pritchard, J.K. (2017). An Expanded View of Complex Traits: From Polygenic to Omnigenic. *Cell* 169, 1177–1186. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.038>.

Brodersen, P., Petersen, M., Bjørn Nielsen, H., Zhu, S., Newman, M.-A., Shokat, K.M., Rietz, S., Parker, J., and Mundy, J. (2006). *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal* 47, 532–546. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02806.x>.

Brun, H., Levivier, S., Somda, I., Ruer, D., Renard, M., and Chèvre, A.M. (2000). A Field Method for Evaluating the Potential Durability of New Resistance Sources: Application to the *Leptosphaeria maculans*-*Brassica napus* Pathosystem. *Phytopathology*® 90, 961–966. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.9.961>.

Brun, H., Chèvre, A.-M., Fitt, B.D., Powers, S., Besnard, A.-L., Ermel, M., Huteau, V., Marquer, B., Eber, F., Renard, M., et al. (2010). Quantitative resistance increases the durability of

qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytologist* *185*, 285–299. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.03049.x>.

Brutus, A., Sicilia, F., Macone, A., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2010). A domain swap approach reveals a role of the plant wall-associated kinase 1 (WAK1) as a receptor of oligogalacturonides. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *107*, 9452–9457. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000675107>.

Catalá, R., Santos, E., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Martínez-Zapater, J.M., and Salinas, J. (2003). Mutations in the Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> Transporter CAX1 Increase CBF/DREB1 Expression and the Cold-Acclimation Response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* *15*, 2940–2951. <https://doi.org/10.1105/tpc.015248>.

Cessna, S.G., Sears, V.E., Dickman, M.B., and Low, P.S. (2000). Oxalic Acid, a Pathogenicity Factor for *Sclerotinia sclerotiorum*, Suppresses the Oxidative Burst of the Host Plant. *The Plant Cell* *12*, 2191–2199. <https://doi.org/10.1105/tpc.12.11.2191>.

Chakraborty, S. (2013). Migrate or evolve: options for plant pathogens under climate change. *Global Change Biology* *19*, 1985–2000. <https://doi.org/10.1111/gcb.12205>.

Chaloner, T.M., Gurr, S.J., and Bebbler, D.P. (2021). Plant pathogen infection risk tracks global crop yields under climate change. *Nat. Clim. Chang.* *11*, 710–715. <https://doi.org/10.1038/s41558-021-01104-8>.

Chan, D., and Wu, Q. (2015). Significant anthropogenic-induced changes of climate classes since 1950. *Sci Rep* *5*, 13487. <https://doi.org/10.1038/srep13487>.

Chehab, E.W., Eich, E., and Braam, J. (2009). Thigmomorphogenesis: a complex plant response to mechano-stimulation. *Journal of Experimental Botany* *60*, 43–56. <https://doi.org/10.1093/jxb/ern315>.

Chen, Q., Wang, Q., Xiong, L., and Lou, Z. (2011). A structural view of the conserved domain of rice stress-responsive NAC1. *Protein Cell* *2*, 55–63. <https://doi.org/10.1007/s13238-011-1010-9>.

Chen, Q.-L., Hu, H.-W., Yan, Z.-Z., Li, C.-Y., Nguyen, B.-A.T., Zhu, Y.-G., and He, J.-Z. (2021a). Precipitation increases the abundance of fungal plant pathogens in *Eucalyptus* phyllosphere. *Environmental Microbiology* *23*, 7688–7700. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15728>.

Chen, S., Ma, T., Song, S., Li, X., Fu, P., Wu, W., Liu, J., Gao, Y., Ye, W., Dry, I.B., et al. (2021b). *Arabidopsis* downy mildew effector HaRxLL470 suppresses plant immunity by attenuating the DNA-binding activity of bZIP transcription factor HY5. *New Phytologist* *230*, 1562–1577. <https://doi.org/10.1111/nph.17280>.

Chinnusamy, V., Ohta, M., Kanrar, S., Lee, B., Hong, X., Agarwal, M., and Zhu, J.-K. (2003). ICE1: a regulator of cold-induced transcriptome and freezing tolerance in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* *17*, 1043–1054. <https://doi.org/10.1101/gad.1077503>.

- Cipollini Jr., D.F. (1997). Wind-induced mechanical stimulation increases pest resistance in common bean. *Oecologia* *111*, 84–90. <https://doi.org/10.1007/s004420050211>.
- Clapham, D.E. (2003). TRP channels as cellular sensors. *Nature* *426*, 517–524. <https://doi.org/10.1038/nature02196>.
- Clapham, D.E., Runnels, L.W., and Strübing, C. (2001). The trp ion channel family. *Nat Rev Neurosci* *2*, 387–396. <https://doi.org/10.1038/35077544>.
- Collins, A., Milbourne, D., Ramsay, L., Meyer, R., Chatot-Balandras, C., Oberhagemann, P., Jong, W.D., Gebhardt, C., Bonnel, E., and Waugh, R. (1998). QTL for field resistance to late blight in potato are strongly correlated with maturity and vigour. *Molecular Breeding* *5*, 387–398. .
- Cominelli, E., Galbiati, M., Vavasseur, A., Conti, L., Sala, T., Vuylsteke, M., Leonhardt, N., Dellaporta, S.L., and Tonelli, C. (2005). A Guard-Cell-Specific MYB Transcription Factor Regulates Stomatal Movements and Plant Drought Tolerance. *Current Biology* *15*, 1196–1200. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.048>.
- Corwin, J.A., and Kliebenstein, D.J. (2017). Quantitative Resistance: More Than Just Perception of a Pathogen. *The Plant Cell* *29*, 655–665. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00915>.
- Corwin, J.A., Copeland, D., Feusier, J., Subedy, A., Eshbaugh, R., Palmer, C., Maloof, J., and Kliebenstein, D.J. (2016). The Quantitative Basis of the Arabidopsis Innate Immune System to Endemic Pathogens Depends on Pathogen Genetics. *PLOS Genetics* *12*, e1005789. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005789>.
- Coutand, C., and Moulia, B. (2000). Biomechanical study of the effect of a controlled bending on tomato stem elongation: local strain sensing and spatial integration of the signal. *Journal of Experimental Botany* *51*, 1825–1842. <https://doi.org/10.1093/jexbot/51.352.1825>.
- Crane, R.A., Cardénas Valdez, M., Castaneda, N., Jackson, C.L., Riley, C.J., Mostafa, I., Kong, W., Chhajed, S., Chen, S., and Brusslan, J.A. (2019). Negative Regulation of Age-Related Developmental Leaf Senescence by the IAOx Pathway, PEN1, and PEN3. *Frontiers in Plant Science* *10*, 1202. .
- Cui, D., Liang, S., and Wang, D. (2021a). Observed and projected changes in global climate zones based on Köppen climate classification. *WIREs Climate Change* *12*, e701. <https://doi.org/10.1002/wcc.701>.
- Cui, D., Liang, S., Wang, D., and Liu, Z. (2021b). A 1-km global dataset of historical (1979–2017) and future (2020–2100) Köppen-Geiger climate classification and bioclimatic variables. *Earth System Science Data Discussions* 1–34. <https://doi.org/10.5194/essd-2021-53>.
- Cui, H., Tsuda, K., and Parker, J.E. (2015). Effector-Triggered Immunity: From Pathogen Perception to Robust Defense. *Annual Review of Plant Biology* *66*, 487–511. <https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050213-040012>.

Dangl, J., Dietrich, R., and Richberg, M. (1996). Death Don't Have No Mercy: Cell Death Programs in Plant-Microbe Interactions. *Plant Cell* 8, 1793–1807. .

Delessert, C., Kazan, K., Wilson, I.W., Straeten, D.V.D., Manners, J., Dennis, E.S., and Dolferus, R. (2005). The transcription factor ATAF2 represses the expression of pathogenesis-related genes in Arabidopsis. *The Plant Journal* 43, 745–757. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02488.x>.

Delledonne, M. (2005). NO news is good news for plants. *Current Opinion in Plant Biology* 8, 390–396. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.05.002>.

Delourme, R., Bousset, L., Ermel, M., Duffé, P., Besnard, A.L., Marquer, B., Fudal, I., Linglin, J., Chadœuf, J., and 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. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2013.12.019>.

Depuydt, T., and Vandepoele, K. (2021). Multi-omics network-based functional annotation of unknown Arabidopsis genes. *The Plant Journal* 108, 1193–1212. <https://doi.org/10.1111/tpj.15507>.

Derbyshire, M.C., and Denton-Giles, M. (2016). The control of sclerotinia stem rot on oilseed rape (*Brassica napus*): current practices and future opportunities. *Plant Pathology* 65, 859–877. <https://doi.org/10.1111/ppa.12517>.

Derbyshire, M., Denton-Giles, M., Hegedus, D., Seifbarghy, S., Rollins, J., van Kan, J., Seidl, M.F., Faino, L., Mbengue, M., Navaud, O., et al. (2017). The Complete Genome Sequence of the Phytopathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum* Reveals Insights into the Genome Architecture of Broad Host Range Pathogens. *Genome Biology and Evolution* 9, 593–618. <https://doi.org/10.1093/gbe/evx030>.

Derbyshire, M., Mbengue, M., Barascud, M., Navaud, O., and Raffaele, S. (2019). Small RNAs from the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* highlight host candidate genes associated with quantitative disease resistance. *Molecular Plant Pathology* 20, 1279–1297. <https://doi.org/10.1111/mpp.12841>.

Desaint, H., Aoun, N., Deslandes, L., Vailleau, F., Roux, F., and Berthomé, R. (2021). Fight hard or die trying: when plants face pathogens under heat stress. *New Phytologist* 229, 712–734. <https://doi.org/10.1111/nph.16965>.

Deslandes, L., Olivier, J., Theulières, F., Hirsch, J., Feng, D.X., Bittner-Eddy, P., Beynon, J., and Marco, Y. (2002). Resistance to *Ralstonia solanacearum* in *Arabidopsis thaliana* is conferred by the recessive RRS1-R gene, a member of a novel family of resistance genes. *PNAS* 99, 2404–2409. <https://doi.org/10.1073/pnas.032485099>.

Dhar, N., Caruana, J., Erdem, I., Subbarao, K.V., Klosterman, S.J., and Raina, R. (2020). The Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE 13 Regulates Dark-Induced Senescence and Plays Contrasting Roles in Defense Against Bacterial and Fungal Pathogens. *MPMI* 33, 754–766. <https://doi.org/10.1094/MPMI-11-19-0329-R>.

- Didelon, M., Khafif, M., Godiard, L., Barbacci, A., and Raffaele, S. (2020). Patterns of Sequence and Expression Diversification Associate Members of the PADRE Gene Family With Response to Fungal Pathogens. *Front. Genet.* *11*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00491>.
- Dinesh, A., Muralidhara, B., Gangurde, S., and Yogeshwar, M. (2016). Molecular Response of Plants to Drought, Cold and Heat Stress - A Review. *Annual Research & Review in Biology* 1–8. <https://doi.org/10.9734/ARRB/2016/26700>.
- Djamei, A., Schipper, K., Rabe, F., Ghosh, A., Vincon, V., Kahnt, J., Osorio, S., Tohge, T., Fernie, A.R., Feussner, I., et al. (2011). Metabolic priming by a secreted fungal effector. *Nature* *478*, 395–398. <https://doi.org/10.1038/nature10454>.
- Djanaguiraman, M., Perumal, R., Jagadish, S.V.K., Ciampitti, I.A., Welti, R., and Prasad, P.V.V. (2018). Sensitivity of sorghum pollen and pistil to high-temperature stress. *Plant, Cell & Environment* *41*, 1065–1082. <https://doi.org/10.1111/pce.13089>.
- Dodds, P.N., and Rathjen, J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nat Rev Genet* *11*, 539–548. <https://doi.org/10.1038/nrg2812>.
- Doherty, C.J., Van Buskirk, H.A., Myers, S.J., and Thomashow, M.F. (2009). Roles for Arabidopsis CAMTA Transcription Factors in Cold-Regulated Gene Expression and Freezing Tolerance. *The Plant Cell* *21*, 972–984. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.063958>.
- Domingues, M.V.P.F., Moura, K.E. de, Salomão, D., Elias, L.M., and Patricio, F.R.A. (2016). Effect of temperature on mycelial growth of *Trichoderma*, *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum*, as well as on mycoparasitism. *Summa Phytopathol.* *42*, 222–227. <https://doi.org/10.1590/0100-5405/2146>.
- Dubreuil-Maurizi, C., and Poinssot, B. (2012). Role of glutathione in plant signaling under biotic stress. *Plant Signaling & Behavior* *7*, 210–212. <https://doi.org/10.4161/psb.18831>.
- Dunning, F.M., Sun, W., Jansen, K.L., Helft, L., and Bent, A.F. (2007). Identification and Mutational Analysis of Arabidopsis FLS2 Leucine-Rich Repeat Domain Residues That Contribute to Flagellin Perception. *The Plant Cell* *19*, 3297–3313. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.048801>.
- Ebrahimian-Motlagh, S., Ribone, P.A., Thirumalaikumar, V.P., Allu, A.D., Chan, R.L., Mueller-Roeber, B., and Balazadeh, S. (2017). JUNGBRUNNEN1 Confers Drought Tolerance Downstream of the HD-Zip I Transcription Factor AtHB13. *Frontiers in Plant Science* *8*, 2118. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02118>.
- Eichelberger, S., McCaa, J., Nijssen, B., and Wood, A. (2008). Climate Change Effects On Wind Speed. *North American Windpower* *7*, 68–72. .
- Elemento, O., Slonim, N., and Tavazoie, S. (2007). A Universal Framework for Regulatory Element Discovery across All Genomes and Data Types. *Molecular Cell* *28*, 337–350. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.09.027>.

- Eloy, C., Fournier, M., Lacoïnte, A., and Moulia, B. (2017). Wind loads and competition for light sculpt trees into self-similar structures. *Nat Commun* 8, 1014. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00995-6>.
- Engler, C., Kandzia, R., and Marillonnet, S. (2008). A One Pot, One Step, Precision Cloning Method with High Throughput Capability. *PLOS ONE* 3, e3647. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003647>.
- Engler, C., Youles, M., Gruetzner, R., Ehnert, T.-M., Werner, S., Jones, J.D.G., Patron, N.J., and Marillonnet, S. (2014). A Golden Gate Modular Cloning Toolbox for Plants. *ACS Synth. Biol.* 3, 839–843. <https://doi.org/10.1021/sb4001504>.
- Erives, A., and Levine, M. (2004). Coordinate enhancers share common organizational features in the *Drosophila* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 3851–3856. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400611101>.
- Ernst, H.A., Nina Olsen, A., Skriver, K., Larsen, S., and Lo Leggio, L. (2004). Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors. *EMBO Rep* 5, 297–303. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400093>.
- Falcone, D.L., Ogas, J.P., and Somerville, C.R. (2004). Regulation of membrane fatty acid composition by temperature in mutants of *Arabidopsis* with alterations in membrane lipid composition. *BMC Plant Biol* 4, 17. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-4-17>.
- Fang, Y., You, J., Xie, K., Xie, W., and Xiong, L. (2008). Systematic sequence analysis and identification of tissue-specific or stress-responsive genes of NAC transcription factor family in rice. *Mol Genet Genomics* 280, 547–563. <https://doi.org/10.1007/s00438-008-0386-6>.
- Favaron, F., Sella, L., and D’Ovidio, R. (2005). Relationships Among Endo-Polygalacturonase, Oxalate, pH, and Plant Polygalacturonase-Inhibiting Protein (PGIP) in the Interaction Between *Sclerotinia sclerotiorum* and Soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions : MPMI* 17, 1402–1409. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2004.17.12.1402>.
- Feechan, A., Kocsis, M., Riaz, S., Zhang, W., Gadoury, D.M., Walker, M.A., Dry, I.B., Reisch, B., and Cadle-Davidson, L. (2015). Strategies for RUN1 Deployment Using RUN2 and REN2 to Manage Grapevine Powdery Mildew Informed by Studies of Race Specificity. *Phytopathology*® 105, 1104–1113. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-09-14-0244-R>.
- Ferrari, S., Savatin, D., Sicilia, F., Gramegna, G., Cervone, F., and De Lorenzo, G. (2013). Oligogalacturonides: plant damage-associated molecular patterns and regulators of growth and development. *Frontiers in Plant Science* 4, 49. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00049>.
- Fisher, M.C., Henk, Daniel.A., Briggs, C.J., Brownstein, J.S., Madoff, L.C., McCraw, S.L., and Gurr, S.J. (2012). Emerging fungal threats to animal, plant and ecosystem health. *Nature* 484, 186–194. <https://doi.org/10.1038/nature10947>.
- Flor, H.H. (1971). Current Status of the Gene-For-Gene Concept. *Annual Review of Phytopathology* 9, 275–296. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.09.090171.001423>.

Fowler, S., and Thomashow, M.F. (2002). Arabidopsis Transcriptome Profiling Indicates That Multiple Regulatory Pathways Are Activated during Cold Acclimation in Addition to the CBF Cold Response Pathway[W]. *The Plant Cell* 14, 1675–1690. <https://doi.org/10.1105/tpc.003483>.

Frerigmann, H., Piślewska-Bednarek, M., Sánchez-Vallet, A., Molina, A., Glawischnig, E., Gigolashvili, T., and Bednarek, P. (2016). Regulation of Pathogen-Triggered Tryptophan Metabolism in *Arabidopsis thaliana* by MYB Transcription Factors and Indole Glucosinolate Conversion Products. *Molecular Plant* 9, 682–695. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2016.01.006>.

Frías, M., González, C., and Brito, N. (2011). BcSpl1, a cerato-platanin family protein, contributes to *Botrytis cinerea* virulence and elicits the hypersensitive response in the host. *New Phytologist* 192, 483–495. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03802.x>.

Fudal, I., Ross, S., Brun, H., Besnard, A.-L., Ermel, M., Kuhn, M.-L., Balesdent, M.-H., and Rouxel, T. (2009). Repeat-Induced Point Mutation (RIP) as an Alternative Mechanism of Evolution Toward Virulence in *Leptosphaeria maculans*. *MPMI* 22, 932–941. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-8-0932>.

Fusari, C.M., Di Rienzo, J.A., Troglia, C., Nishinakamasu, V., Moreno, M.V., Maringolo, C., Quiroz, F., Álvarez, D., Escande, A., Hopp, E., et al. (2012). Association mapping in sunflower for sclerotinia head rot resistance. *BMC Plant Biol* 12, 93. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-93>.

Gardiner, B., Berry, P., and Moulia, B. (2016). Review: Wind impacts on plant growth, mechanics and damage. *Plant Science* 245, 94–118. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.01.006>.

Gaudet, D.A., Laroche, A., Frick, M., Huel, R., and Puchalski, B. (2003). Cold induced expression of plant defensin and lipid transfer protein transcripts in winter wheat. *Physiologia Plantarum* 117, 195–205. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2003.00041.x>.

Geu-Flores, F., Møldrup, M.E., Böttcher, C., Olsen, C.E., Scheel, D., and Halkier, B.A. (2011). Cytosolic  $\gamma$ -Glutamyl Peptidases Process Glutathione Conjugates in the Biosynthesis of Glucosinolates and Camalexin in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 23, 2456–2469. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.083998>.

Glawischnig, E. (2007). Camalexin. *Phytochemistry* 68, 401–406. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.12.005>.

Glawischnig, E., Hansen, B.G., Olsen, C.E., and Halkier, B.A. (2004). Camalexin is synthesized from indole-3-acetaldoxime, a key branching point between primary and secondary metabolism in *Arabidopsis*. *PNAS* 101, 8245–8250. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305876101>.

Gomez-Gomez, L., and Boller, T. (2000). FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 5, 1003–1011. .

- Gong, M., van der Luit, A.H., Knight, M.R., and Trewavas, A.J. (1998). Heat-Shock-Induced Changes in Intracellular Ca<sup>2+</sup> Level in Tobacco Seedlings in Relation to Thermotolerance. *Plant Physiology* *116*, 429–437. <https://doi.org/10.1104/pp.116.1.429>.
- Govrin, E.M., and Levine, A. (2000). The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. *Current Biology* *10*, 751–757. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)00560-1](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)00560-1).
- Graham, D., and Patterson, B.D. (1982). Responses of Plants to Low, Nonfreezing Temperatures: Proteins, Metabolism, and Acclimation. *Annual Review of Plant Physiology* *33*, 347–372. <https://doi.org/10.1146/annurev.pp.33.060182.002023>.
- Grant, C.E., Bailey, T.L., and Noble, W.S. (2011). FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* *27*, 1017–1018. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr064>.
- Guimarães, R.L., and Stotz, H.U. (2004). Oxalate Production by *Sclerotinia sclerotiorum* Deregulates Guard Cells during Infection. *Plant Physiology* *136*, 3703–3711. <https://doi.org/10.1104/pp.104.049650>.
- Guo, X., and Stotz, H.U. (2007). Defense Against *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis* Is Dependent on Jasmonic Acid, Salicylic Acid, and Ethylene Signaling. *MPMI* *20*, 1384–1395. <https://doi.org/10.1094/MPMI-20-11-1384>.
- Guo, Y., and Gan, S. (2006). AtNAP, a NAC family transcription factor, has an important role in leaf senescence. *The Plant Journal* *46*, 601–612. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3113.2006.02723.x>.
- Gutterson, N., and Reuber, T.L. (2004). Regulation of disease resistance pathways by AP2/ERF transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* *7*, 465–471. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.04.007>.
- Hamel, L.-P., Sheen, J., and Séguin, A. (2014). Ancient signals: comparative genomics of green plant CDPKs. *Trends in Plant Science* *19*, 79–89. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.10.009>.
- Hao, J.J., Subbarao, K.V., and Duniway, J.M. (2003). Germination of *Sclerotinia minor* and *S. sclerotiorum* Sclerotia Under Various Soil Moisture and Temperature Combinations. *Phytopathology*® *93*, 443–450. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2003.93.4.443>.
- Harding, M.W., Hill, T.B., Daniels, G.C., Rennie, DC., Zuzak, K., Feng, J., and McDonald, J. (2017). A survey for blackleg and *Sclerotinia* stem rot on canola in Alberta in 2016. *Canadian Plant Disease Survey* *97*, 168–173. .
- Hartill, W.F.T., and Underhill, A.P. (1976). “Puffing” in *Sclerotinia sclerotiorum* and *S. minor*. *New Zealand Journal of Botany* *14*, 355–358. <https://doi.org/10.1080/0028825X.1976.10428909>.

- Hedhly, A., Hormaza, J.I., and Herrero, M. (2009). Global warming and sexual plant reproduction. *Trends in Plant Science* 14, 30–36. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.11.001>.
- Heller, A., and Witt-Geiges, T. (2013). Oxalic Acid Has an Additional, Detoxifying Function in *Sclerotinia sclerotiorum* Pathogenesis. *PLoS ONE* 8, e72292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072292>.
- Herrero, M.P., and Johnson, R.R. (1980). High Temperature Stress and Pollen Viability of Maize1. *Crop Science* 20, 796–800. <https://doi.org/10.2135/cropsci1980.0011183X002000060030x>.
- Hirsh, A.E., and Fraser, H.B. (2001). Protein dispensability and rate of evolution. *Nature* 411, 1046–1049. <https://doi.org/10.1038/35082561>.
- Hon, W.C., Griffith, M., Mlynarz, A., Kwok, Y.C., and Yang, Dsc. (1995). Antifreeze Proteins in Winter Rye Are Similar to Pathogenesis-Related Proteins. *Plant Physiol.* 109, 879–889. <https://doi.org/10.1104/pp.109.3.879>.
- Huang, H.C., and Kozub, G.C. (1990). Cyclic occurrence of *Sclerotinia* wilt of sunflower in western Canada. *Plant Disease* 74, 766–770. .
- Huang, H.C., and Kozub, G.C. (1991). Temperature requirements for carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum* isolates of different geographic origin. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 32. .
- Huang, H.C., Chang, C., and Kozub, G.C. (1998). Effect of temperature during sclerotial formation, sclerotial dryness, and relative humidity on myceliogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Can. J. Bot.* 76, 494–499. <https://doi.org/10.1139/b98-016>.
- Huber, L., and Gillespie, T.J. (1992). Modeling Leaf Wetness in Relation to Plant Disease Epidemiology. *Annual Review of Phytopathology* 30, 553–577. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.30.090192.003005>.
- Hulme, P.E. (2021). Unwelcome exchange: International trade as a direct and indirect driver of biological invasions worldwide. *One Earth* 4, 666–679. <https://doi.org/10.1016/j.oneear.2021.04.015>.
- Ingle, R.A., Carstens, M., and Denby, K.J. (2006). PAMP recognition and the plant–pathogen arms race. *BioEssays* 28, 880–889. <https://doi.org/10.1002/bies.20457>.
- Inglis, G.D., and Boland, G.J. (1990). The microflora of bean and rapeseed petals and the influence of the microflora of bean petals on white mold. *Canadian Journal of Plant Pathology* 12, 129–134. <https://doi.org/10.1080/07060669009501015>.
- Inoue, E. (1955). Studies of the phenomena of Waving plants (“HONAMI”) caused by wind. *Journal of Agricultural Meteorology* 11, 18–22. .

- Jaffe, M.J. (1973). Thigmomorphogenesis: The response of plant growth and development to mechanical stimulation: With special reference to *Bryonia dioica*. *Planta* 114, 143–157. <https://doi.org/10.1007/BF00387472>.
- Jamaux, I., Gelie, B., and Lamarque, C. (1995). Early stages of infection of rapeseed petals and leaves by *Sclerotinia sclerotiorum* revealed by scanning electron microscopy. *Plant Pathology* 44, 22–30. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1995.tb02712.x>.
- Jarvis, W.R. (1962). The dispersal of spores of *Botrytis cinerea* fr. in a raspberry plantation. *Transactions of the British Mycological Society* 45, 549–559. [https://doi.org/10.1016/S0007-1536\(62\)80015-1](https://doi.org/10.1016/S0007-1536(62)80015-1).
- Jensen, M.K., Kjaersgaard, T., Nielsen, M.M., Galberg, P., Petersen, K., O’Shea, C., and Skriver, K. (2010). The *Arabidopsis thaliana* NAC transcription factor family: structure–function relationships and determinants of ANAC019 stress signalling. *Biochemical Journal* 426, 183–196. <https://doi.org/10.1042/BJ20091234>.
- Jia, Y., Ding, Y., Shi, Y., Zhang, X., Gong, Z., and Yang, S. (2016). The cbfs triple mutants reveal the essential functions of CBFs in cold acclimation and allow the definition of CBF regulons in *Arabidopsis*. *New Phytologist* 212, 345–353. <https://doi.org/10.1111/nph.14088>.
- Johnson, R. (1981). Durable Resistance: Definition of, Genetic Control, and Attainment in Plant Breeding. *The American Phytopathological Society* 71, 567–568. .
- Jones, J.D.G., and Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature* 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>.
- Julkowska, M.M., Koevoets, I.T., Mol, S., Hoefsloot, H., Feron, R., Tester, M.A., Keurentjes, J.J.B., Korte, A., Haring, M.A., de Boer, G.-J., et al. (2017). Genetic Components of Root Architecture Remodeling in Response to Salt Stress. *The Plant Cell* 29, 3198–3213. <https://doi.org/10.1105/tpc.16.00680>.
- Kabbage, M., Williams, B., and Dickman, M.B. (2013). Cell Death Control: The Interplay of Apoptosis and Autophagy in the Pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum*. *PLOS Pathogens* 9, e1003287. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003287>.
- Kamesh Krishnamoorthy, K., Sankaralingam, A., and Sevugapperumal, N. (2017). Effect of Temperature and Salinity on the Growth of *Sclerotinia sclerotiorum* Causing Head Rot of Cabbage. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 6, 950–954. <https://doi.org/10.20546/ijcmas.2017.602.106>.
- Kersting, A.R., Bornberg-Bauer, E., Moore, A.D., and Grath, S. (2012). Dynamics and Adaptive Benefits of Protein Domain Emergence and Arrangements during Plant Genome Evolution. *Genome Biology and Evolution* 4, 316–329. <https://doi.org/10.1093/gbe/evs004>.
- Kiba, A., Nishihara, M., Nakatsuka, T., and Yamamura, S. (2007). Pathogenesis-related protein 1 homologue is an antifungal protein in *Wasabia japonica* leaves and confers resistance to *Botrytis cinerea* in transgenic tobacco. *Plant Biotechnology* 24, 247–253. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.24.247>.

Kim, H.S., Park, B.O., Yoo, J.H., Jung, M.S., Lee, S.M., Han, H.J., Kim, K.E., Kim, S.H., Lim, C.O., Yun, D.-J., et al. (2007a). Identification of a Calmodulin-binding NAC Protein as a Transcriptional Repressor in Arabidopsis\*. *Journal of Biological Chemistry* 282, 36292–36302. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705217200>.

Kim, K.S., Min, J.-Y., and Dickman, M.B. (2008). Oxalic Acid Is an Elicitor of Plant Programmed Cell Death during *Sclerotinia sclerotiorum* Disease Development. *MPMI* 21, 605–612. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-5-0605>.

Kim, S.-Y., Kim, S.-G., Kim, Y.-S., Seo, P.J., Bae, M., Yoon, H.-K., and Park, C.-M. (2007b). Exploring membrane-associated NAC transcription factors in Arabidopsis : implications for membrane biology in genome regulation. *Nucleic Acids Research* 35, 203–213. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1068>.

Kliebenstein, D.J., Rowe, H.C., and Denby, K.J. (2005). Secondary metabolites influence Arabidopsis/Botrytis interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant Journal* 44, 25–36. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02508.x>.

Knight, M.R., and Knight, H. (2012). Low-temperature perception leading to gene expression and cold tolerance in higher plants. *New Phytologist* 195, 737–751. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2012.04239.x>.

Knight, H., Trewavas, A.J., and Knight, M.R. (1996). Cold calcium signaling in Arabidopsis involves two cellular pools and a change in calcium signature after acclimation. *The Plant Cell* 8, 489–503. <https://doi.org/10.1105/tpc.8.3.489>.

Knight, M.R., Campbell, A.K., Smith, S.M., and Trewavas, A.J. (1991). Transgenic plant aequorin reports the effects of touch and cold-shock and elicitors on cytoplasmic calcium. *Nature* 352, 524–526. <https://doi.org/10.1038/352524a0>.

Koch, S., Dunker, S., Kleinhenz, B., Röhrig, M., and Tiedemann, A. von (2007). A Crop Loss-Related Forecasting Model for *Sclerotinia* Stem Rot in Winter Oilseed Rape. *Phytopathology*® 97, 1186–1194. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-97-9-1186>.

Kocsy, G., Galiba, G., and Brunold, C. (2001). Role of glutathione in adaptation and signalling during chilling and cold acclimation in plants. *Physiologia Plantarum* 113, 158–164. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.2001.1130202.x>.

Königshofer, H., Tromballa, H.-W., and Löppert, H.-G. (2008). Early events in signalling high-temperature stress in tobacco BY2 cells involve alterations in membrane fluidity and enhanced hydrogen peroxide production. *Plant, Cell & Environment* 31, 1771–1780. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01880.x>.

Köppen, W. (2011). The thermal zones of the Earth according to the duration of hot, moderate and cold periods and to the impact of heat on the organic world. *Metz* 20, 351–360. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2011/105>.

Kosaka, A., Pastorczyk, M., Piślewska-Bednarek, M., Nishiuchi, T., Ono, E., Suemoto, H., Ishikawa, A., Frerigmann, H., Kaido, M., Mise, K., et al. (2021). Tryptophan-derived metabolites

and BAK1 separately contribute to Arabidopsis postinvasive immunity against *Alternaria brassicicola*. *Sci Rep* *11*, 1488. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79562-x>.

von Koskull-Döring, P., Scharf, K.-D., and Nover, L. (2007). The diversity of plant heat stress transcription factors. *Trends in Plant Science* *12*, 452–457. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.08.014>.

Kosová, K., Prášil, I.T., Vítámvás, P., Dobrev, P., Motyka, V., Floková, K., Novák, O., Turečková, V., Rolčík, J., Pešek, B., et al. (2012). Complex phytohormone responses during the cold acclimation of two wheat cultivars differing in cold tolerance, winter Samanta and spring Sandra. *Journal of Plant Physiology* *169*, 567–576. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.12.013>.

Kottek, M., Grieser, J., Beck, C., Rudolf, B., and Rubel, F. (2006). World Map of the Köppen-Geiger climate classification updated. *Metz* *15*, 259–263. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2006/0130>.

Krishna, P., Sacco, M., Cherutti, J.F., and Hill, S. (1995). Cold-Induced Accumulation of hsp90 Transcripts in *Brassica napus*. *Plant Physiology* *107*, 915–923. <https://doi.org/10.1104/pp.107.3.915>.

Kunkel, B.N., and Brooks, D.M. (2002). Cross talk between signaling pathways in pathogen defense. *Current Opinion in Plant Biology* *5*, 325–331. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(02\)00275-3](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(02)00275-3).

Kusch, S., Larrouy, J., Ibrahim, H.M.M., Mounichetty, S., Gasset, N., Navaud, O., Mbengue, M., Zanchetta, C., Lopez-Roques, C., Donnadieu, C., et al. (2022). Transcriptional response to host chemical cues underpins the expansion of host range in a fungal plant pathogen lineage. *ISME J* *16*, 138–148. <https://doi.org/10.1038/s41396-021-01058-x>.

Kuwabara, C., and Imai, R. (2009). Molecular Basis of Disease Resistance Acquired through Cold Acclimation in Overwintering Plants. *J. Plant Biol.* *52*, 19–26. <https://doi.org/10.1007/s12374-008-9006-6>.

de Langre, E. (2008). Effects of Wind on Plants. *Annu. Rev. Fluid Mech.* *40*, 141–168. <https://doi.org/10.1146/annurev.fluid.40.111406.102135>.

Lannou, C., Roby, D., Ravigné, V., Hannachi, M., and Moury, B. (2021). L'immunité des plantes: Pour des cultures résistantes aux maladies (Quae).

Larkindale, J., and Huang, B. (2004). Thermotolerance and antioxidant systems in *Agrostis stolonifera*: Involvement of salicylic acid, abscisic acid, calcium, hydrogen peroxide, and ethylene. *Journal of Plant Physiology* *161*, 405–413. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01239>.

Larkindale, J., and Huang, B. (2005). Effects of Abscisic Acid, Salicylic Acid, Ethylene and Hydrogen Peroxide in Thermotolerance and Recovery for Creeping Bentgrass. *Plant Growth Regul* *47*, 17–28. <https://doi.org/10.1007/s10725-005-1536-z>.

Larkindale, J., and Vierling, E. (2008). Core Genome Responses Involved in Acclimation to High Temperature. *Plant Physiol* *146*, 748–761. <https://doi.org/10.1104/pp.107.112060>.

Le Roux, C., Huet, G., Jauneau, A., Camborde, L., Trémousaygue, D., Kraut, A., Zhou, B., Levailant, M., Adachi, H., Yoshioka, H., et al. (2015). A Receptor Pair with an Integrated Decoy Converts Pathogen Disabling of Transcription Factors to Immunity. *Cell* *161*, 1074–1088. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.04.025>.

Le Tourneau, D. (1979). Morphology, Cytology, and Physiology of *Sclerotinia* Species in Culture. *Phytopathology* *69*, 887–890. .

Lee, J., He, K., Stolc, V., Lee, H., Figueroa, P., Gao, Y., Tongprasit, W., Zhao, H., Lee, I., and Deng, X.W. (2007). Analysis of Transcription Factor HY5 Genomic Binding Sites Revealed Its Hierarchical Role in Light Regulation of Development. *The Plant Cell* *19*, 731–749. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047688>.

Léger, O., Garcia, F., Khafif, M., Leblanc-Fournier, N., Duclos, A., Tournat, V., Badel, E., Didelon, M., Ru, A.L., Raffaele, S., et al. (2021). Pathogen-derived mechanical cues regulate the spatio-temporal implementation of plant defense. *BioRxiv* <https://doi.org/10.1101/2021.10.18.464859>.

Leng, Z.-X., Liu, Y., Chen, Z.-Y., Guo, J., Chen, J., Zhou, Y.-B., Chen, M., Ma, Y.-Z., Xu, Z.-S., and Cui, X.-Y. (2021). Genome-Wide Analysis of the DUF4228 Family in Soybean and Functional Identification of GmDUF4228–70 in Response to Drought and Salt Stresses. *Front Plant Sci* *12*, 628299. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.628299>.

Levine, J.M., and D’Antonio, C.M. (2003). Forecasting Biological Invasions with Increasing International Trade. *Conservation Biology* *17*, 322–326. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2003.02038.x>.

Levitt, J. (1980). Response of plants to environmental stresses : chilling, freezing, and high temperature stresses. *Physiological Ecology : A Series of Monographs, Texts, and Treatises* *1*, 23–64. .

Li, L., Li, K., Ali, A., and Guo, Y. (2021). AtWAKL10, a Cell Wall Associated Receptor-Like Kinase, Negatively Regulates Leaf Senescence in *Arabidopsis thaliana*. *International Journal of Molecular Sciences* *22*, 4885. <https://doi.org/10.3390/ijms22094885>.

Li, M., Li, D., Tang, Y., Wu, F., and Wang, J. (2017). CytoCluster: A Cytoscape Plugin for Cluster Analysis and Visualization of Biological Networks. *Int J Mol Sci* *18*, 1880. <https://doi.org/10.3390/ijms18091880>.

Li, Y., Pennington, B.O., and Hua, J. (2009). Multiple *R* -Like Genes Are Negatively Regulated by *BON1* and *BON3* in *Arabidopsis*. *MPMI* *22*, 840–848. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-7-0840>.

Liu, Y., and He, C. (2016). Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtrBOHD. *Plant Cell Rep* *35*, 995–1007. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-1950-x>.

- Liu, H.T., Gao, F., Cui, S.J., Han, J.L., Sun, D.Y., and Zhou, R.G. (2006). Primary evidence for involvement of IP3 in heat-shock signal transduction in Arabidopsis. *Cell Res* 16, 394–400. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7310051>.
- Liu, S., Kracher, B., Ziegler, J., Birkenbihl, R.P., and Somssich, I.E. (2015). Negative regulation of ABA signaling by WRKY33 is critical for Arabidopsis immunity towards Botrytis cinerea 2100. *ELife* 4, e07295. <https://doi.org/10.7554/eLife.07295>.
- Liu, T., Liu, Z., Song, C., Hu, Y., Han, Z., She, J., Fan, F., Wang, J., Jin, C., Chang, J., et al. (2012). Chitin-Induced Dimerization Activates a Plant Immune Receptor. *Science* 336, 1160–1164. <https://doi.org/10.1126/science.1218867>.
- Lorang, J., Kidarsa, T., Bradford, C.S., Gilbert, B., Curtis, M., Tzeng, S.-C., Maier, C.S., and Wolpert, T.J. (2012). Tricking the Guard: Exploiting Plant Defense for Disease Susceptibility. *Science* 338, 659–662. <https://doi.org/10.1126/science.1226743>.
- Lorang, J.M., Sweat, T.A., and Wolpert, T.J. (2007). Plant disease susceptibility conferred by a “resistance” gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 14861–14866. <https://doi.org/10.1073/pnas.0702572104>.
- Lorenzo, O., Piqueras, R., Sánchez-Serrano, J.J., and Solano, R. (2003). ETHYLENE RESPONSE FACTOR1 Integrates Signals from Ethylene and Jasmonate Pathways in Plant Defense[W]. *The Plant Cell* 15, 165–178. <https://doi.org/10.1105/tpc.007468>.
- Love, M.I., Anders, S., and Huber, W. (2013). Differential analysis of RNA-Seq data at the gene level using the DESeq 2 package. Heidelberg: European Molecular Biology Laboratory (EMBL).
- Lukatkin, A., Brazaitytė, A., Bobinas, C., and Duchovskis, P. (2012). Chilling injury in chilling-sensitive plants: A review. *Zemdirbyste* 99, 111–124. .
- Lumsden, R.D. (1979). Histology and Physiology of Pathogenesis in Plant Diseases Caused by *Sclerotinia* Species. *Phytopathology* 69, 890–895. .
- Ma, S., and Bohnert, H.J. (2007). Integration of Arabidopsis thaliana stress-related transcript profiles, promoter structures, and cell-specific expression. *Genome Biology* 8, 1–22. <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-4-r49>.
- Ma, W., and Berkowitz, G.A. (2011). Ca<sup>2+</sup> conduction by plant cyclic nucleotide gated channels and associated signaling components in pathogen defense signal transduction cascades. *New Phytologist* 190, 566–572. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03577.x>.
- Ma, S., Gong, Q., and Bohnert, H.J. (2006). Dissecting salt stress pathways. *Journal of Experimental Botany* 57, 1097–1107. <https://doi.org/10.1093/jxb/erj098>.
- Maestri, E., Klueva, N., Perrotta, C., Gulli, M., Nguyen, H.T., and Marmiroli, N. (2002). Molecular genetics of heat tolerance and heat shock proteins in cereals. *Plant Mol Biol* 48, 667–681. <https://doi.org/10.1023/A:1014826730024>.

Mahlstein, I., Daniel, J.S., and Solomon, S. (2013). Pace of shifts in climate regions increases with global temperature. *Nature Clim Change* 3, 739–743. <https://doi.org/10.1038/nclimate1876>.

Marciano, P., Di Lenna, P., and Magro, P. (1983). Oxalic acid, cell wall-degrading enzymes and pH in pathogenesis and their significance in the virulence of two *Sclerotinia sclerotiorum* isolates on sunflower. *Physiological Plant Pathology* 22, 339–345. [https://doi.org/10.1016/S0048-4059\(83\)81021-2](https://doi.org/10.1016/S0048-4059(83)81021-2).

Martin, L., Leblanc-Fournier, N., Julien, J.-L., Moulia, B., and Coutand, C. (2010). Acclimation kinetics of physiological and molecular responses of plants to multiple mechanical loadings. *Journal of Experimental Botany* 61, 2403–2412. <https://doi.org/10.1093/jxb/erq069>.

Masson-Delmotte, Zhai, V.P., Pirani, A., Connors, S.L., Péan, C., Berger, S., Caud, N., Chen, Y., Goldfarb, L., Gomis, M.I., et al. IPCC, 2021: *Climate Change 2021: The Physical Science Basis. Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Cambridge University Press. In Press.

Mbengue, M., Navaud, O., Peyraud, R., Barascud, M., Badet, T., Vincent, R., Barbacci, A., and Raffaele, S. (2016). Emerging Trends in Molecular Interactions between Plants and the Broad Host Range Fungal Pathogens *Botrytis cinerea* and *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Plant Science* 7, 422. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00422>.

McCartney, H.A. (1994). Dispersal of spores and pollen from crops. *Grana* 33, 76–80. <https://doi.org/10.1080/00173139409427835>.

Meier, S., Ruzvidzo, O., Morse, M., Donaldson, L., Kwezi, L., and Gehring, C. (2010). The Arabidopsis Wall Associated Kinase-Like 10 Gene Encodes a Functional Guanylyl Cyclase and Is Co-Expressed with Pathogen Defense Related Genes. *PLoS ONE* 5, e8904. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008904>.

Melotto, M., Underwood, W., Koczan, J., Nomura, K., and He, S.Y. (2006). Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* 126, 969–980. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.054>.

Melotto, M., Zhang, L., Oblessuc, P.R., and He, S.Y. (2017). Stomatal Defense a Decade Later. *Plant Physiology* 174, 561–571. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01853>.

Meng, X., and Zhang, S. (2013). MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology* 51, 245–266. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102314>.

Michael, P.J., Lui, K.Y., Thomson, L.L., Lamichhane, A.R., and Bennett, S.J. (2021). Impact of Preconditioning Temperature and Duration Period on Carpogenic Germination of Diverse *Sclerotinia sclerotiorum* Populations in Southwestern Australia. *Plant Disease* 105, 1798–1805. <https://doi.org/10.1094/PDIS-09-20-1957-RE>.

Mikkelsen, M.D., Hansen, C.H., Wittstock, U., and Halkier, B.A. (2000). Cytochrome P450 CYP79B2 from Arabidopsis Catalyzes the Conversion of Tryptophan to Indole-3-acetaldoxime,

a Precursor of Indole Glucosinolates and Indole-3-acetic Acid. *Journal of Biological Chemistry* *275*, 33712–33717. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001667200>.

Mittler, R. (2006). Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* *11*, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2005.11.002>.

Miura, K., and Furumoto, T. (2013). Cold Signaling and Cold Response in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* *14*, 5312–5337. <https://doi.org/10.3390/ijms14035312>.

Miya, A., Albert, P., Shinya, T., Desaki, Y., Ichimura, K., Shirasu, K., Narusaka, Y., Kawakami, N., Kaku, H., and Shibuya, N. (2007). CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *104*, 19613–19618. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705147104>.

Moemken, J., Meyers, M., Feldmann, H., and Pinto, J.G. (2018). Future Changes of Wind Speed and Wind Energy Potentials in EURO-CORDEX Ensemble Simulations. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* *123*, 6373–6389. <https://doi.org/10.1029/2018JD028473>.

Moulija, B., Coutand, C., and Julien, J.-L. (2015). Mechanosensitive control of plant growth: bearing the load, sensing, transducing, and responding. *Front. Plant Sci.* *6*, 52. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00052>.

Moulija, B., Badel, E., Bastien, R., Duchemin, L., and Eloy, C. (2021). The shaping of plant axes and crowns through tropisms and elasticity: an example of morphogenetic plasticity beyond the shoot apical meristem. *New Phytologist* <https://doi.org/10.1111/nph.17913>.

Mundt, C.C. (2018). Pyramiding for Resistance Durability: Theory and Practice. *Phytopathology*® *108*, 792–802. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-12-17-0426-RVW>.

Murata, N., and Los, D.A. (1997). Membrane Fluidity and Temperature Perception. *Plant Physiol* *115*, 875–879. .

Navaud, O., Barbacci, A., Taylor, A., Clarkson, J.P., and Raffaele, S. (2018). Shifts in diversification rates and host jump frequencies shaped the diversity of host range among Sclerotiniaceae fungal plant pathogens. *Molecular Ecology* *27*, 1309–1323. <https://doi.org/10.1111/mec.14523>.

Niderman, T., Genetet, I., Bruyere, T., Gees, R., Stintzi, A., Legrand, M., Fritig, B., and Mosinger, E. (1995). Pathogenesis-Related PR-1 Proteins Are Antifungal (Isolation and Characterization of Three 14-Kilodalton Proteins of Tomato and of a Basic PR-1 of Tobacco with Inhibitory Activity against *Phytophthora infestans*). *Plant Physiology* *108*, 17–27. <https://doi.org/10.1104/pp.108.1.17>.

Nie, J., Yin, Z., Li, Z., Wu, Y., and Huang, L. (2019). A small cysteine-rich protein from two kingdoms of microbes is recognized as a novel pathogen-associated molecular pattern. *New Phytologist* *222*, 995–1011. <https://doi.org/10.1111/nph.15631>.

Nievola, C.C., Carvalho, C.P., Carvalho, V., and Rodrigues, E. (2017). Rapid responses of plants to temperature changes. *Temperature* 4, 371–405. <https://doi.org/10.1080/23328940.2017.1377812>.

Niklas, K.J. (1998). The influence of gravity and wind on land plant evolution. *Review of Palaeobotany and Palynology* 102, 1–14. [https://doi.org/10.1016/S0034-6667\(98\)00011-6](https://doi.org/10.1016/S0034-6667(98)00011-6).

Nováková, M., Šašek, V., Dobrev, P.I., Valentová, O., and Burketová, L. (2014). Plant hormones in defense response of *Brassica napus* to *Sclerotinia sclerotiorum* – Reassessing the role of salicylic acid in the interaction with a necrotroph. *Plant Physiology and Biochemistry* 80, 308–317. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.04.019>.

Nuruzzaman, M., Sharoni, A.M., and Kikuchi, S. (2013). Roles of NAC transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology* 4, 248. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2013.00248>.

Oh, J.E., Kwon, Y., Kim, J.H., Noh, H., Hong, S.-W., and Lee, H. (2011). A dual role for MYB60 in stomatal regulation and root growth of *Arabidopsis thaliana* under drought stress. *Plant Mol Biol* 77, 91–103. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9796-7>.

Okamoto, M., Tanaka, Y., Abrams, S.R., Kamiya, Y., Seki, M., and Nambara, E. (2009). High Humidity Induces Abscisic Acid 8'-Hydroxylase in Stomata and Vasculature to Regulate Local and Systemic Abscisic Acid Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 149, 825–834. <https://doi.org/10.1104/pp.108.130823>.

O'Malley, R.C., Huang, S.C., Song, L., Lewsey, M.G., Bartlett, A., Nery, J.R., Galli, M., Gallavotti, A., and Ecker, J.R. (2016a). Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell* 165, 1280–1292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.038>.

O'Malley, R.C., Huang, S.C., Song, L., Lewsey, M.G., Bartlett, A., Nery, J.R., Galli, M., Gallavotti, A., and Ecker, J.R. (2016b). Cistrome and Epicistrome Features Shape the Regulatory DNA Landscape. *Cell* 165, 1280–1292. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.038>.

Onaga, G., Wydra, K., Koopmann, B., Chebotarov, D., Séré, Y., and Von Tiedemann, A. (2017). High temperature effects on Pi54 conferred resistance to *Magnaporthe oryzae* in two genetic backgrounds of *Oryza sativa*. *Journal of Plant Physiology* 212, 80–93. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.02.004>.

Örvar, B.L., Sangwan, V., Omann, F., and Dhindsa, R.S. (2000). Early steps in cold sensing by plant cells: the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal* 23, 785–794. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2000.00845.x>.

Ostberg, S., Schewe, J., Childers, K., and Frieler, K. (2018). Changes in crop yields and their variability at different levels of global warming. *Earth Syst. Dynam.* 9, 479–496. <https://doi.org/10.5194/esd-9-479-2018>.

Palloix, A., Ayme, V., and Moury, B. (2009). Durability of plant major resistance genes to pathogens depends on the genetic background, experimental evidence and consequences for

breeding strategies. *New Phytologist* 183, 190–199. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02827.x>.

Palma, K., Thorgrimsen, S., Malinovskiy, F.G., Fiil, B.K., Nielsen, H.B., Brodersen, P., Hofius, D., Petersen, M., and Mundy, J. (2010). Autoimmunity in *Arabidopsis* *acd11* Is Mediated by Epigenetic Regulation of an Immune Receptor. *PLOS Pathogens* 6, e1001137. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001137>.

Pan, Y., Wei, J., Yao, C., Reng, H., and Gao, Z. (2018). SsSm1, a Cerato-platanin family protein, is involved in the hyphal development and pathogenic process of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Science* 270, 37–46. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2018.02.001>.

Pandey, P., Ramegowda, V., and Senthil-Kumar, M. (2015). Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 6, 723. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00723>.

Pardossi, A., Vernieri, P., and Tognoni, F. (1992). Involvement of Abscisic Acid in Regulating Water Status in *Phaseolus vulgaris* L. during Chilling 1. *Plant Physiology* 100, 1243–1250. <https://doi.org/10.1104/pp.100.3.1243>.

Parisy, V., Poinssot, B., Owsianowski, L., Buchala, A., Glazebrook, J., and Mauch, F. (2007). Identification of PAD2 as a  $\gamma$ -glutamylcysteine synthetase highlights the importance of glutathione in disease resistance of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 49, 159–172. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02938.x>.

Parlevliet, J.E. (2002). Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124, 147–156. .

Pazzagli, L., Cappugi, G., Manao, G., Camici, G., Santini, A., and Scala, A. (1999). Purification, Characterization, and Amino Acid Sequence of Cerato-platanin, a New Phytotoxic Protein from *Ceratocystis fimbriata* f. sp. *platani* \*. *Journal of Biological Chemistry* 274, 24959–24964. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.35.24959>.

Peltier, A.J., Bradley, C.A., Chilvers, M.I., Malvick, D.K., Mueller, D.S., Wise, K.A., and Esker, P.D. (2012). Biology, Yield loss and Control of *Sclerotinia* Stem Rot of Soybean. *J Integ Pest Manage* 3, 1–7. <https://doi.org/10.1603/IPM11033>.

Perchepped, L., Balagué, C., Riou, C., Claudel-Renard, C., Rivière, N., Grezes-Besset, B., and Roby, D. (2010a). Nitric Oxide Participates in the Complex Interplay of Defense-Related Signaling Pathways Controlling Disease Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 846–860. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-7-0846>.

Perchepped, L., Balagué, C., Riou, C., Claudel-Renard, C., Rivière, N., Grezes-Besset, B., and Roby, D. (2010b). Nitric Oxide Participates in the Complex Interplay of Defense-Related Signaling Pathways Controlling Disease Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum* in *Arabidopsis thaliana*. *MPMI* 23, 846–860. <https://doi.org/10.1094/MPMI-23-7-0846>.

Petersen, M., Brodersen, P., Naested, H., Andreasson, E., Lindhart, U., Johansen, B., Nielsen, H.B., Lacy, M., Austin, M.J., Parker, J.E., et al. (2000). Arabidopsis MAP Kinase 4 Negatively Regulates Systemic Acquired Resistance. *Cell* *103*, 1111–1120. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00213-0](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00213-0).

Petutschnig, E.K., Jones, A.M.E., Serazetdinova, L., Lipka, U., and 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 \*♦. *Journal of Biological Chemistry* *285*, 28902–28911. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.116657>.

Phillips, A.J.L. (1987). Carpogenic germination of sclerotia of *Sclerotinia sclerotiorum*: a review. *Phytophylactica* *19*, 279–283. .

Pilet-Nayel, M.-L., Moury, B., Caffier, V., Montarry, J., Kerlan, M.-C., Fournet, S., Durel, C.-E., and Delourme, R. (2017). Quantitative Resistance to Plant Pathogens in Pyramiding Strategies for Durable Crop Protection. *Frontiers in Plant Science* *8*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01838>.

Pitzschke, A., Schikora, A., and Hirt, H. (2009). MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* *12*, 421–426. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.008>.

Plieth, C., Hansen, U.-P., Knight, H., and Knight, M.R. (1999). Temperature sensing by plants: the primary characteristics of signal perception and calcium response. *The Plant Journal* *18*, 491–497. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00471.x>.

Poland, J.A., Balint-Kurti, P.J., Wisser, R.J., Pratt, R.C., and Nelson, R.J. (2009). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science* *14*, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.10.006>.

Pomiès, L., Decourteix, M., Franchel, J., Moulia, B., and Leblanc-Fournier, N. (2017). Poplar stem transcriptome is massively remodelled in response to single or repeated mechanical stimuli. *BMC Genomics* *18*, 300. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3670-1>.

Potters, G., Pasternak, T.P., Guisez, Y., and Jansen, M. a. K. (2009). Different stresses, similar morphogenic responses: integrating a plethora of pathways. *Plant, Cell & Environment* *32*, 158–169. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2008.01908.x>.

Prasch, C.M., and Sonnewald, U. (2013). Simultaneous Application of Heat, Drought, and Virus to Arabidopsis Plants Reveals Significant Shifts in Signaling Networks. *Plant Physiology* *162*, 1849–1866. <https://doi.org/10.1104/pp.113.221044>.

Pratt, A.J., and MacRae, I.J. (2009). The RNA-induced Silencing Complex: A Versatile Gene-silencing Machine \*. *Journal of Biological Chemistry* *284*, 17897–17901. <https://doi.org/10.1074/jbc.R900012200>.

Pré, M., Atallah, M., Champion, A., De Vos, M., Pieterse, C.M.J., and Memelink, J. (2008). The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense. *Plant Physiology* *147*, 1347–1357. <https://doi.org/10.1104/pp.108.117523>.

- Pretorius, Z.A., Singh, R.P., Wagoire, W.W., and Payne, T.S. (2000). Detection of Virulence to Wheat Stem Rust Resistance Gene Sr31 in *Puccinia graminis* f. sp. tritici in Uganda. *Plant Disease* 84, 203–203. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2000.84.2.203B>.
- Puranik, S., Sahu, P.P., Srivastava, P.S., and Prasad, M. (2012). NAC proteins: regulation and role in stress tolerance. *Trends in Plant Science* 17, 369–381. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2012.02.004>.
- Purdy, L.H. (1979). *Sclerotinia sclerotiorum*: History, Diseases and Symptomatology, Host Range, Geographic Distribution, and Impact. *The American Phytopathological Society* 69, 875–880. .
- Qi, Z., Verma, R., Gehring, C., Yamaguchi, Y., Zhao, Y., Ryan, C.A., and Berkowitz, G.A. (2010). Ca<sup>2+</sup> signaling by plant *Arabidopsis thaliana* Pep peptides depends on AtPepR1, a receptor with guanylyl cyclase activity, and cGMP-activated Ca<sup>2+</sup> channels. *PNAS* 107, 21193–21198. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000191107>.
- Qiu, J.-L., Fiil, B.K., Petersen, K., Bjørn Nielsen, H., Botanga, C.J., Thorgrimsen, S., Palma, K., Suarez-Rodriguez, M.C., Sandbech-Clausen, S., Lichota, J., et al. (2008). *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO Journal* 27, 2214–2221. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.147>.
- Rahman, H., Xu, Y.-P., Zhang, X.-R., and Cai, X.-Z. (2016). *Brassica napus* Genome Possesses Extraordinary High Number of CAMTA Genes and CAMTA3 Contributes to PAMP Triggered Immunity and Resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Frontiers in Plant Science* 7, 581. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00581>.
- Ranty, B., Aldon, D., and Galaud, J.-P. (2006). Plant Calmodulins and Calmodulin-Related Proteins. *Plant Signaling & Behavior* 1, 96–104. <https://doi.org/10.4161/psb.1.3.2998>.
- Rasmussen, S., Barah, P., Suarez-Rodriguez, M.C., Bressendorff, S., Friis, P., Costantino, P., Bones, A.M., Nielsen, H.B., and Mundy, J. (2013). Transcriptome Responses to Combinations of Stresses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 161, 1783–1794. <https://doi.org/10.1104/pp.112.210773>.
- Rauscher, M., Ádám, A.L., Wirtz, S., Guggenheim, R., Mendgen, K., and Deising, H.B. (1999). PR-1 protein inhibits the differentiation of rust infection hyphae in leaves of acquired resistant broad bean. *The Plant Journal* 19, 625–633. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1999.00545.x>.
- REX Consortium (2016). Combining Selective Pressures to Enhance the Durability of Disease Resistance Genes. *Frontiers in Plant Science* 7, 1916. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01916>.
- del Río, L.E., Bradley, C.A., Henson, R.A., Endres, G.J., Hanson, B.K., McKay, K., Halvorson, M., Porter, P.M., Le Gare, D.G., and Lamey, H.A. (2007). Impact of *Sclerotinia* Stem Rot on Yield of Canola. *Plant Disease* 91, 191–194. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-2-0191>.

Robert-Seilaniantz, A., Grant, M., and Jones, J.D.G. (2011). Hormone Crosstalk in Plant Disease and Defense: More Than Just JASMONATE-SALICYLATE Antagonism. *Annual Review of Phytopathology* 49, 317–343. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-073009-114447>.

Roden, J.S. (2003). Modeling the light interception and carbon gain of individual fluttering aspen (*Populus tremuloides* Michx) leaves. *Trees* 17, 117–126. <https://doi.org/10.1007/s00468-002-0213-3>.

Rohli, R.V., Joyner, T.A., Reynolds, S.J., and Ballinger, T.J. (2015). Overlap of global Köppen–Geiger climates, biomes, and soil orders. *Physical Geography* 36, 158–175. <https://doi.org/10.1080/02723646.2015.1016384>.

Roper, M., Seminara, A., Bandi, M.M., Cobb, A., Dillard, H.R., and Pringle, A. (2010). Dispersal of fungal spores on a cooperatively generated wind. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 17474–17479. <https://doi.org/10.1073/pnas.1003577107>.

Rosenzweig, C., Elliott, J., Deryng, D., Ruane, A.C., Müller, C., Arneth, A., Boote, K.J., Folberth, C., Glotter, M., Khabarov, N., et al. (2014). Assessing agricultural risks of climate change in the 21st century in a global gridded crop model intercomparison. *Proc Natl Acad Sci USA* 111, 3268–3273. <https://doi.org/10.1073/pnas.1222463110>.

Roux, F., Voisin, D., Badet, T., Balagué, C., Barlet, X., Huard-Chauveau, C., Roby, D., and Raffaele, S. (2014). Resistance to phytopathogens e tutti quanti: placing plant quantitative disease resistance on the map. *Molecular Plant Pathology* 15, 427–432. <https://doi.org/10.1111/mpp.12138>.

Roy, S., Kagda, M., and Judelson, H.S. (2013). Genome-wide Prediction and Functional Validation of Promoter Motifs Regulating Gene Expression in Spore and Infection Stages of *Phytophthora infestans*. *PLOS Pathogens* 9, e1003182. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003182>.

Rubel, F., and Kottek, M. (2010). Observed and projected climate shifts 1901–2100 depicted by world maps of the Köppen–Geiger climate classification. *Metz* 19, 135–141. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2010/0430>.

Ruelland, E., and Zachowski, A. (2010). How plants sense temperature. *Environmental and Experimental Botany* 69, 225–232. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2010.05.011>.

Saand, M.A., Xu, Y.-P., Li, W., Wang, J.-P., and Cai, X.-Z. (2015a). Cyclic nucleotide gated channel gene family in tomato: genome-wide identification and functional analyses in disease resistance. *Frontiers in Plant Science* 6, 303. .

Saand, M.A., Xu, Y.-P., Munyampundu, J.-P., Li, W., Zhang, X.-R., and Cai, X.-Z. (2015b). Phylogeny and evolution of plant cyclic nucleotide-gated ion channel (CNGC) gene family and functional analyses of tomato CNGCs. *DNA Research* 22, 471–483. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsv029>.

Saga, H., Ogawa, T., Kai, K., Suzuki, H., Ogata, Y., Sakurai, N., Shibata, D., and Ohta, D. (2012). Identification and Characterization of ANAC042, a Transcription Factor Family Gene Involved

in the Regulation of Camalexin Biosynthesis in Arabidopsis. *MPMI* 25, 684–696. <https://doi.org/10.1094/MPMI-09-11-0244>.

Saidi, Y., Finka, A., Muriset, M., Bromberg, Z., Weiss, Y.G., Maathuis, F.J.M., and Goloubinoff, P. (2009). The Heat Shock Response in Moss Plants Is Regulated by Specific Calcium-Permeable Channels in the Plasma Membrane. *The Plant Cell* 21, 2829–2843. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.065318>.

Saidi, Y., Finka, A., and Goloubinoff, P. (2011). Heat perception and signalling in plants: a tortuous path to thermotolerance. *New Phytologist* 190, 556–565. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03571.x>.

Sakata, T., and Higashitani, A. (2008). Male Sterility Accompanied with Abnormal Anther Development in Plants – Genes and Environmental Stresses with Special Reference to High Temperature Injury. *Int J Plant Dev Biol* 2, 42–51. .

Sanati Nezhad, A., and Geitmann, A. (2013). The cellular mechanics of an invasive lifestyle. *Journal of Experimental Botany* 64, 4709–4728. <https://doi.org/10.1093/jxb/ert254>.

Sanchez-Vallet, A., Ramos, B., Bednarek, P., López, G., Piślewska-Bednarek, M., Schulze-Lefert, P., and Molina, A. (2010). Tryptophan-derived secondary metabolites in Arabidopsis thaliana confer non-host resistance to necrotrophic Plectosphaerella cucumerina fungi. *The Plant Journal* 63, 115–127. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2010.04224.x>.

Sangwan, V., Foulds, I., Singh, J., and Dhindsa, R.S. (2001). Cold-activation of Brassica napus BN115 promoter is mediated by structural changes in membranes and cytoskeleton, and requires Ca<sup>2+</sup> influx. *The Plant Journal* 27, 1–12. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.2001.01052.x>.

Scafaro, A.P., Fan, Y., Posch, B.C., Garcia, A., Coast, O., and Atkin, O.K. (2021). Responses of leaf respiration to heatwaves. *Plant, Cell & Environment* 44, 2090–2101. <https://doi.org/10.1111/pce.14018>.

Schlenker, W., and Roberts, M.J. (2009). Nonlinear temperature effects indicate severe damages to U.S. crop yields under climate change. *PNAS* 106, 15594–15598. <https://doi.org/10.1073/pnas.0906865106>.

Schwarczinger, I., Kolozsváriné Nagy, J., Király, L., Mészáros, K., Bányai, J., Kunos, V., Fodor, J., and Künstler, A. (2021). Heat Stress Pre-Exposure May Differentially Modulate Plant Defense to Powdery Mildew in a Resistant and Susceptible Barley Genotype. *Genes* 12, 776. <https://doi.org/10.3390/genes12050776>.

Schwartz, H.F., and Steadman, J.R. (1978). Factors Affecting Sclerotium Populations of, and Apothecium Production by, Sclerotinia sclerotiorum. *Phytopathology* 68, 383–388. .

Seo, P.J., Lee, A.-K., Xiang, F., and Park, C.-M. (2008). Molecular and Functional Profiling of Arabidopsis Pathogenesis-Related Genes: Insights into Their Roles in Salt Response of Seed Germination. *Plant and Cell Physiology* 49, 334–344. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn011>.

- Seo, P.J., Kim, M.J., Park, J.-Y., Kim, S.-Y., Jeon, J., Lee, Y.-H., Kim, J., and Park, C.-M. (2010). Cold activation of a plasma membrane-tethered NAC transcription factor induces a pathogen resistance response in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* *61*, 661–671. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.04091.x>.
- Shahnejat-Bushehri, S., Mueller-Roeber, B., and Balazadeh, S. (2012). *Arabidopsis* NAC transcription factor JUNGBRUNNEN1 affects thermomemory-associated genes and enhances heat stress tolerance in primed and unprimed conditions. *Plant Signaling & Behavior* *7*, 1518–1521. <https://doi.org/10.4161/psb.22092>.
- Shen, H., Yin, Y., Chen, F., Xu, Y., and Dixon, R.A. (2009). A Bioinformatic Analysis of NAC Genes for Plant Cell Wall Development in Relation to Lignocellulosic Bioenergy Production. *Bioenerg. Res.* *2*, 217–232. <https://doi.org/10.1007/s12155-009-9047-9>.
- Shinya, T., Motoyama, N., Ikeda, A., Wada, M., Kamiya, K., Hayafune, M., Kaku, H., and Shibuya, N. (2012). Functional Characterization of CEBiP and CERK1 Homologs in *Arabidopsis* and Rice Reveals the Presence of Different Chitin Receptor Systems in Plants. *Plant and Cell Physiology* *53*, 1696–1706. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs113>.
- Singh, R.P., Huerta-Espino, J., and William, H.M. (2005). Genetics and Breeding for Durable Resistance to Leaf and Stripe Rusts in Wheat. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* *29*, 121–127. .
- Sinha, R., Gupta, A., and Senthil-Kumar, M. (2016). Understanding the Impact of Drought on Foliar and Xylem Invading Bacterial Pathogen Stress in Chickpea. *Frontiers in Plant Science* *7*, 902. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00902>.
- Smertenko, A., Dráber, P., Viklický, V., and Opatrný, Z. (1997). Heat stress affects the organization of microtubules and cell division in *Nicotiana tabacum* cells. *Plant, Cell & Environment* *20*, 1534–1542. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.1997.d01-44.x>.
- Solano, R., Stepanova, A., Chao, Q., and Ecker, J.R. (1998). Nuclear events in ethylene signaling: a transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes Dev.* *12*, 3703–3714. <https://doi.org/10.1101/gad.12.23.3703>.
- Song, Y., Ci, D., Tian, M., and Zhang, D. (2014). Comparison of the physiological effects and transcriptome responses of *Populus simonii* under different abiotic stresses. *Plant Mol Biol* *86*, 139–156. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0218-5>.
- Souer, E., van Houwelingen, A., Kloos, D., Mol, J., and Koes, R. (1996). The No Apical Meristem Gene of *Petunia* Is Required for Pattern Formation in Embryos and Flowers and Is Expressed at Meristem and Primordia Boundaries. *Cell* *85*, 159–170. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)81093-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)81093-4).
- Souza, C. de A., Li, S., Lin, A.Z., Boutrot, F., Grossmann, G., Zipfel, C., and Somerville, S.C. (2017). Cellulose-Derived Oligomers Act as Damage-Associated Molecular Patterns and Trigger Defense-Like Responses. *Plant Physiology* *173*, 2383–2398. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01680>.

- Sperotto, R.A., Ricachenevsky, F.K., Duarte, G.L., Boff, T., Lopes, K.L., Sperb, E.R., Grusak, M.A., and Fett, J.P. (2009). Identification of up-regulated genes in flag leaves during rice grain filling and characterization of OsNAC5, a new ABA-dependent transcription factor. *Planta* 230, 985–1002. <https://doi.org/10.1007/s00425-009-1000-9>.
- Stael, S., Kmieciak, P., Willems, P., Van Der Kelen, K., Coll, N.S., Teige, M., and Van Breusegem, F. (2015). Plant innate immunity – sunny side up? *Trends in Plant Science* 20, 3–11. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2014.10.002>.
- Steadman, J.R. (1979). Control of Plant Diseases caused by *Sclerotinia* Species. *Phytopathology* 69, 904–907. .
- Stefansson, T.S., McDonald, B.A., and Willi, Y. (2013). Local adaptation and evolutionary potential along a temperature gradient in the fungal pathogen *Rhynchosporium commune*. *Evolutionary Applications* 6, 524–534. <https://doi.org/10.1111/eva.12039>.
- Stokstad, E. (2007). Deadly Wheat Fungus Threatens World’s Breadbaskets. *Science* 315, 1786–1787. <https://doi.org/10.1126/science.315.5820.1786>.
- Stotz, H.U., Sawada, Y., Shimada, Y., Hirai, M.Y., Sasaki, E., Krischke, M., Brown, P.D., Saito, K., and Kamiya, Y. (2011). Role of camalexin, indole glucosinolates, and side chain modification of glucosinolate-derived isothiocyanates in defense of *Arabidopsis* against *Sclerotinia sclerotiorum*. *The Plant Journal* 67, 81–93. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2011.04578.x>.
- Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., Feng, J., Liu, G., and Ren, D. (2011). Glutathione-Indole-3-Acetonitrile Is Required for Camalexin Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 23, 364–380. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.079145>.
- Suarez-Rodriguez, M.C., Adams-Phillips, L., Liu, Y., Wang, H., Su, S.-H., Jester, P.J., Zhang, S., Bent, A.F., and Krysan, P.J. (2007). MEK1 Is Required for flg22-Induced MPK4 Activation in *Arabidopsis* Plants. *Plant Physiology* 143, 661–669. <https://doi.org/10.1104/pp.106.091389>.
- Sucher, J., Mbengue, M., Dresen, A., Barascud, M., Didelon, M., Barbacci, A., and Raffaele, S. (2020). Phylotranscriptomics of the Pentapetalae Reveals Frequent Regulatory Variation in Plant Local Responses to the Fungal Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *The Plant Cell* 32, 1820–1844. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00806>.
- Suri, S.S., and Dhindsa, R.S. (2008). A heat-activated MAP kinase (HAMK) as a mediator of heat shock response in tobacco cells. *Plant, Cell & Environment* 31, 218–226. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2007.01754.x>.
- Suzuki, N., and Katano, K. (2018). Coordination Between ROS Regulatory Systems and Other Pathways Under Heat Stress and Pathogen Attack. *Frontiers in Plant Science* 9, 490. .
- Sweat, T.A., and Wolpert, T.J. (2007). Thioredoxin h5 Is Required for Victorin Sensitivity Mediated by a CC-NBS-LRR Gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19, 673–687. <https://doi.org/10.1105/tpc.106.047563>.

Sweat, T.A., Lorang, J.M., Bakker, E.G., and Wolpert, T.J. (2008). Characterization of Natural and Induced Variation in the *LOV1* Gene, a CC-NB-LRR Gene Conferring Victorin Sensitivity and Disease Susceptibility in *Arabidopsis*. *MPMI* 21, 7–19. <https://doi.org/10.1094/MPMI-21-1-0007>.

Świeżawska, B., Duszyn, M., Jaworski, K., and Szmids-Jaworska, A. (2018). Downstream Targets of Cyclic Nucleotides in Plants. *Frontiers in Plant Science* 1428. .

Tähtiharju, S., Sangwan, V., Monroy, A.F., Dhindsa, R.S., and Borg, M. (1997). The induction of kin genes in cold-acclimating *Arabidopsis thaliana*. Evidence of a role for calcium. *Planta* 203, 442–447. <https://doi.org/10.1007/s004250050212>.

Takken, F.L., and Govere, A. (2012). How to build a pathogen detector: structural basis of NB-LRR function. *Current Opinion in Plant Biology* 15, 375–384. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.05.001>.

Talanova, V.V., Akimova, T.V., and Titov, A.F. (2003). Effect of Whole Plant and Local Heating on the ABA Content in Cucumber Seedling Leaves and Roots and on Their Heat Tolerance. *Russian Journal of Plant Physiology* 50, 90–94. <https://doi.org/10.1023/A:1021996703940>.

Talley, S.M., Coley, P.D., and Kursar, T.A. (2002). The effects of weather on fungal abundance and richness among 25 communities in the Intermountain West. *BMC Ecol* 2, 7. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-2-7>.

Tamasi, E., Stokes, A., Lasserre, B., Danjon, F., Berthier, S., Fourcaud, T., and Chiatante, D. (2005). Influence of wind loading on root system development and architecture in oak (*Quercus robur* L.) seedlings. *Trees* 19, 374–384. <https://doi.org/10.1007/s00468-004-0396-x>.

Tao, H., Hu, S., Xia, C., Wang, M., Wang, T., Zeng, W., Li, Y., Chen, H., Zheng, J., and Wang, Q. (2021). Involvement of glucosinolates in the resistance to zinc oxide nanoparticle-induced toxicity and growth inhibition in *Arabidopsis*. *Environ. Sci.: Processes Impacts* 23, 1040–1049. <https://doi.org/10.1039/D1EM00134E>.

Tao, Y., Xie, Z., Chen, W., Glazebrook, J., Chang, H.-S., Han, B., Zhu, T., Zou, G., and Katagiri, F. (2003). Quantitative Nature of *Arabidopsis* Responses during Compatible and Incompatible Interactions with the Bacterial Pathogen *Pseudomonas syringae* [W]. *The Plant Cell* 15, 317–330. <https://doi.org/10.1105/tpc.007591>.

Thakur, P., Kumar, S., Malik, J.A., Berger, J.D., and Nayyar, H. (2010). Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 67, 429–443. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2009.09.004>.

The 1001 Genomes Consortium (2016). 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 166, 481–491. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.063>.

Thomashow, M.F. (1999). PLANT COLD ACCLIMATION: Freezing Tolerance Genes and Regulatory Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 50, 571–599. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.50.1.571>.

- Tsuda, K., and Katagiri, F. (2010). Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13, 459–465. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.04.006>.
- Tsukaguchi, T., Kawamitsu, Y., Takeda, H., Suzuki, K., and Egawa, Y. (2003). Water Status of Flower Buds and Leaves as Affected by High Temperature in Heat-Tolerant and Heat-Sensitive Cultivars of Snap Bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Production Science* 6, 24–27. <https://doi.org/10.1626/pps.6.24>.
- Uemura, M., and Steponkus, P.L. (1989). Effect of Cold Acclimation on the Incidence of Two Forms of Freezing Injury in Protoplasts Isolated from Rye Leaves 1. *Plant Physiology* 91, 1131–1137. <https://doi.org/10.1104/pp.91.3.1131>.
- Uloth, M. b., You, M.P., Cawthray, G., and Barbetti, M.J. (2015). Temperature adaptation in isolates of *Sclerotinia sclerotiorum* affects their ability to infect *Brassica carinata*. *Plant Pathology* 64, 1140–1148. <https://doi.org/10.1111/ppa.12338>.
- Vergnolle, C., Vaultier, M.-N., Taconnat, L., Renou, J.-P., Kader, J.-C., Zachowski, A., and Ruelland, E. (2005). The Cold-Induced Early Activation of Phospholipase C and D Pathways Determines the Response of Two Distinct Clusters of Genes in Arabidopsis Cell Suspensions. *Plant Physiology* 139, 1217–1233. <https://doi.org/10.1104/pp.105.068171>.
- Vigh, L., Maresca, B., and Harwood, J.L. (1998). Does the membrane's physical state control the expression of heat shock and other genes? *Trends in Biochemical Sciences* 23, 369–374. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(98\)01279-1](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(98)01279-1).
- Wahid, A., Gelani, S., Ashraf, M., and Foolad, M. (2007). Heat tolerance in plants: An overview. *Environmental and Experimental Botany* 61, 199–223. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2007.05.011>.
- Wan, J., Zhang, X.-C., Neece, D., Ramonell, K.M., Clough, S., Kim, S., Stacey, M.G., and Stacey, G. (2008). A LysM Receptor-Like Kinase Plays a Critical Role in Chitin Signaling and Fungal Resistance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 20, 471–481. <https://doi.org/10.1105/tpc.107.056754>.
- Wang, C., Cai, X., and Zheng, Z. (2005). High humidity represses Cf-4/Avr4- and Cf-9/Avr9-dependent hypersensitive cell death and defense gene expression. *Planta* 222, 947–956. <https://doi.org/10.1007/s00425-005-0036-8>.
- Wang, C., Yao, J., Du, X., Zhang, Y., Sun, Y., Rollins, J.A., and Mou, Z. (2015a). The Arabidopsis Mediator Complex Subunit16 Is a Key Component of Basal Resistance against the Necrotrophic Fungal Pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Physiology* 169, 856–872. <https://doi.org/10.1104/pp.15.00351>.
- Wang, J.-P., Munyampundu, J.-P., Xu, Y.-P., and Cai, X.-Z. (2015b). Phylogeny of Plant Calcium and Calmodulin-Dependent Protein Kinases (CCaMKs) and Functional Analyses of Tomato CCaMK in Disease Resistance. *Frontiers in Plant Science* 6, 1075. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.01075>.

- Wang, Y., Hicks, S.C., and Hansen, K.D. (2020). Co-expression analysis is biased by a mean-correlation relationship. 2020.02.13.944777. <https://doi.org/10.1101/2020.02.13.944777>.
- Wang, Z., Mao, H., Dong, C., Ji, R., Cai, L., Fu, H., and Liu, S. (2009). Overexpression of Brassica napus MPK4 Enhances Resistance to Sclerotinia sclerotiorum in Oilseed Rape. *MPMI* 22, 235–244. <https://doi.org/10.1094/MPMI-22-3-0235>.
- Wang, Z., Tan, X., Zhang, Z., Gu, S., Li, G., and Shi, H. (2011). Defense to Sclerotinia sclerotiorum in oilseed rape is associated with the sequential activations of salicylic acid signaling and jasmonic acid signaling. *Plant Science* 184, 75–82. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.12.013>.
- Wang, Z., Fang, H., Chen, Y., Chen, K., Li, G., Gu, S., and Tan, X. (2014). Overexpression of BnWRKY33 in oilseed rape enhances resistance to Sclerotinia sclerotiorum. *Molecular Plant Pathology* 15, 677–689. <https://doi.org/10.1111/mpp.12123>.
- Wang, Z., Ma, L.-Y., Cao, J., Li, Y.-L., Ding, L.-N., Zhu, K.-M., Yang, Y.-H., and Tan, X.-L. (2019a). Recent Advances in Mechanisms of Plant Defense to Sclerotinia sclerotiorum. *Frontiers in Plant Science* 10, 1314. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01314>.
- Wang, Z., Ma, L.-Y., Cao, J., Li, Y.-L., Ding, L.-N., Zhu, K.-M., Yang, Y.-H., and Tan, X.-L. (2019b). Recent Advances in Mechanisms of Plant Defense to Sclerotinia sclerotiorum. *Frontiers in Plant Science* 10, 1314. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01314>.
- Watt, M.S., Moore, J.R., and McKinlay, B. (2005). The influence of wind on branch characteristics of Pinus radiata. *Trees* 19, 58–65. <https://doi.org/10.1007/s00468-004-0363-6>.
- Wendehenne, D., Durner, J., and Klessig, D.F. (2004). Nitric oxide: a new player in plant signalling and defence responses. *Current Opinion in Plant Biology* 7, 449–455. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2004.04.002>.
- Wetherald, R.T., and Manabe, S. (2002). Simulation of hydrologic changes associated with global warming. *Journal of Geophysical Research: Atmospheres* 107, ACL 7-1-ACL 7-15. <https://doi.org/10.1029/2001JD001195>.
- Wightman, F. (1979). Modern Chromatographic Methods for the Identification and Quantification of Plant Growth Regulators and Their Application to Studies of the Changes in Hormonal Substances in Winter Wheat During Acclimation to Cold Stress Conditions. In *Plant Regulation and World Agriculture*, T.K. Scott, ed. (Boston, MA: Springer US), pp. 327–377.
- Wilkinson, S., Clephan, A.L., and Davies, W.J. (2001). Rapid Low Temperature-Induced Stomatal Closure Occurs in Cold-Tolerant Commelina communis Leaves But Not in Cold-Sensitive Tobacco Leaves, via a Mechanism That Involves Apoplastic Calcium But Not Abscisic Acid. *Plant Physiology* 126, 1566–1578. <https://doi.org/10.1104/pp.126.4.1566>.
- Willetts, H.J., and Wong, J.A.-L. (1980). The biology of *Sclerotinia sclerotiorum*, *S. trifoliorum* and *S. minor* with emphasis on specific nomenclature. *The Botanical Review* 46, 101–165. .

- Williams, B., Kabbage, M., Kim, H.-J., Britt, R., and Dickman, M.B. (2011). Tipping the Balance: Sclerotinia sclerotiorum Secreted Oxalic Acid Suppresses Host Defenses by Manipulating the Host Redox Environment. *PLOS Pathogens* 7, e1002107. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002107>.
- Wu, H.-C., and Jinn, T.-L. (2010). Heat shock-triggered Ca<sup>2+</sup> mobilization accompanied by pectin methylesterase activity and cytosolic Ca<sup>2+</sup> oscillation are crucial for plant thermotolerance. *Plant Signaling & Behavior* 5, 1252–1256. <https://doi.org/10.4161/psb.5.10.12607>.
- Wu, A., Allu, A.D., Garapati, P., Siddiqui, H., Dortay, H., Zanol, M.-I., Asensi-Fabado, M.A., Munné-Bosch, S., Antonio, C., Tohge, T., et al. (2012). *JUNGBRUNNEN1*, a Reactive Oxygen Species-Responsive NAC Transcription Factor, Regulates Longevity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 482–506. <https://doi.org/10.1105/tpc.111.090894>.
- Wu, J., Cai, G., Tu, J., Li, L., Liu, S., Luo, X., Zhou, L., Fan, C., and Zhou, Y. (2013). Identification of QTLs for Resistance to Sclerotinia Stem Rot and BnaC.IGMT5.a as a Candidate Gene of the Major Resistant QTL SRC6 in Brassica napus. *PLOS ONE* 8, e67740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067740>.
- Wu, Z.-J., Li, X.-H., Liu, Z.-W., Li, H., Wang, Y.-X., and Zhuang, J. (2015). Transcriptome-based discovery of AP2/ERF transcription factors related to temperature stress in tea plant (*Camellia sinensis*). *Funct Integr Genomics* 15, 741–752. <https://doi.org/10.1007/s10142-015-0457-9>.
- Xiao, N., Wu, Y., Pan, C., Yu, L., Chen, Y., Liu, G., Li, Y., Zhang, X., Wang, Z., Dai, Z., et al. (2017). Improving of Rice Blast Resistances in Japonica by Pyramiding Major R Genes. *Frontiers in Plant Science* 7, 1918. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01918>.
- Xiao, W., Luo, L., Wang, H., Guo, T., Liu, Y., Zhou, J., Zhu, X., Yang, Q., and Chen, Z. (2016). Pyramiding of Pi46 and Pita to improve blast resistance and to evaluate the resistance effect of the two R genes. *Journal of Integrative Agriculture* 15, 2290–2298. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(16\)61415-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(16)61415-6).
- Xiong, T.C., Jauneau, A., Ranjeva, R., and Mazars, C. (2004). Isolated plant nuclei as mechanical and thermal sensors involved in calcium signalling. *The Plant Journal* 40, 12–21. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02184.x>.
- Yadav, S.K. (2010). Cold stress tolerance mechanisms in plants. A review. *Agron. Sustain. Dev.* 30, 515–527. <https://doi.org/10.1051/agro/2009050>.
- Yamaguchi, M., Ohtani, M., Mitsuda, N., Kubo, M., Ohme-Takagi, M., Fukuda, H., and Demura, T. (2010). VND-INTERACTING2, a NAC Domain Transcription Factor, Negatively Regulates Xylem Vessel Formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 22, 1249–1263. <https://doi.org/10.1105/tpc.108.064048>.
- Yang, S., and Hua, J. (2004). A Haplotype-Specific Resistance Gene Regulated by BONZAI1 Mediates Temperature-Dependent Growth Control in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16, 1060–1071. <https://doi.org/10.1105/tpc.020479>.

- Yang, G., Tang, L., Gong, Y., Xie, J., Fu, Y., Jiang, D., Li, G., Collinge, D.B., Chen, W., and Cheng, J. (2018). A cerato-platanin protein SsCP1 targets plant PR1 and contributes to virulence of *Sclerotinia sclerotiorum*. *New Phytologist* 217, 739–755. <https://doi.org/10.1111/nph.14842>.
- Yang, H., Yang, S., Li, Y., and Hua, J. (2007). The Arabidopsis BAP1 and BAP2 Genes Are General Inhibitors of Programmed Cell Death. *Plant Physiology* 145, 135–146. <https://doi.org/10.1104/pp.107.100800>.
- Yang, Q., Niu, X., Tian, X., Zhang, X., Cong, J., Wang, R., Zhang, G., and Li, G. (2020). Comprehensive genomic analysis of the DUF4228 gene family in land plants and expression profiling of ATDUF4228 under abiotic stresses. *BMC Genomics* 21, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6389-3>.
- Yang, R., Hong, Y., Ren, Z., Tang, K., Zhang, H., Zhu, J.-K., and Zhao, C. (2019). A Role for PICKLE in the Regulation of Cold and Salt Stress Tolerance in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* 10, 900. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00900>.
- Yang, S., Yang, H., Grisafi, P., Sanchatjate, S., Fink, G.R., Sun, Q., and Hua, J. (2006). The BON/CPN gene family represses cell death and promotes cell growth in Arabidopsis. *The Plant Journal* 45, 166–179. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02585.x>.
- Yang, Y., Zhang, H., Li, G., Li, W., Wang, X., and Song, F. (2009). Ectopic expression of MgSM1, a Cerato-platanin family protein from *Magnaporthe grisea*, confers broad-spectrum disease resistance in Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal* 7, 763–777. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2009.00442.x>.
- Yu, Y., Xu, M., Ding, X., Chu, Z., and Liu, H. (2021). Activating the MYB51 and MYB122 to upregulate the transcription of glucosinolates biosynthesis genes by copper ions in Arabidopsis. *Plant Physiology and Biochemistry* 162, 496–505. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2021.03.025>.
- Zarei, A., Körbes, A.P., Younessi, P., Montiel, G., Champion, A., and Memelink, J. (2011). Two GCC boxes and AP2/ERF-domain transcription factor ORA59 in jasmonate/ethylene-mediated activation of the PDF1.2 promoter in Arabidopsis. *Plant Mol Biol* 75, 321–331. <https://doi.org/10.1007/s11103-010-9728-y>.
- Zhan, J., Thrall, P.H., Papaïx, J., Xie, L., and Burdon, J.J. (2015). Playing on a Pathogen's Weakness: Using Evolution to Guide Sustainable Plant Disease Control Strategies. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53, 19–43. <https://doi.org/10.1146/annurev-phyto-080614-120040>.
- Zhang, H., and Sonnewald, U. (2017). Differences and commonalities of plant responses to single and combined stresses. *The Plant Journal* 90, 839–855. <https://doi.org/10.1111/tpj.13557>.
- Zhang, F., Huang, J., Tang, M., Cheng, X., Liu, Y., Tong, C., Yu, J., Sadia, T., Dong, C., Liu, L., et al. (2019). Syntenic quantitative trait loci and genomic divergence for *Sclerotinia* resistance and flowering time in *Brassica napus*. *Journal of Integrative Plant Biology* 61, 75–88. <https://doi.org/10.1111/jipb.12754>.

- Zhang, H., Wu, Q., Cao, S., Zhao, T., Chen, L., Zhuang, P., Zhou, X., and Gao, Z. (2014). A novel protein elicitor (SsCut) from *Sclerotinia sclerotiorum* induces multiple defense responses in plants. *Plant Mol Biol* 86, 495–511. <https://doi.org/10.1007/s11103-014-0244-3>.
- Zhang, J., Shao, F., Li, Y., Cui, H., Chen, L., Li, H., Zou, Y., Long, C., Lan, L., Chai, J., et al. (2007). A *Pseudomonas syringae* Effector Inactivates MAPKs to Suppress PAMP-Induced Immunity in Plants. *Cell Host & Microbe* 1, 175–185. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2007.03.006>.
- Zhang, W., Fritture, M., Kolb, D., Löffelhardt, B., Desaki, Y., Boutrot, F.F.G., Tör, M., Zipfel, C., Gust, A.A., and Brunner, F. (2013). *Arabidopsis* RECEPTOR-LIKE PROTEIN30 and Receptor-Like Kinase SUPPRESSOR OF BIR1-1/EVERSHED Mediate Innate Immunity to Necrotrophic Fungi. *The Plant Cell* 25, 4227–4241. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.117010>.
- Zhang, Z., Liu, C., Li, K., Li, X., Xu, M., and Guo, Y. (2021). CLE14 functions as a “brake signal” suppressing age-dependent and stress-induced leaf senescence through promoting JUB1-mediated ROS scavenge in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.09.006>.
- Zhao, Y., Hull, A.K., Gupta, N.R., Goss, K.A., Alonso, J., Ecker, J.R., Normanly, J., Chory, J., and Celenza, J.L. (2002). Trp-dependent auxin biosynthesis in *Arabidopsis*: involvement of cytochrome P450s CYP79B2 and CYP79B3. *Genes Dev.* 16, 3100–3112. <https://doi.org/10.1101/gad.1035402>.
- Zhao, Y., Wang, J., Liu, Y., Miao, H., Cai, C., Shao, Z., Guo, R., Sun, B., Jia, C., Zhang, L., et al. (2015). Classic myrosinase-dependent degradation of indole glucosinolate attenuates fumonisin B1-induced programmed cell death in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 81, 920–933. <https://doi.org/10.1111/tpj.12778>.
- Zhu, Z., An, F., Feng, Y., Li, P., Xue, L., A, M., Jiang, Z., Kim, J.-M., To, T.K., Li, W., et al. (2011). Derepression of ethylene-stabilized transcription factors (EIN3/EIL1) mediates jasmonate and ethylene signaling synergy in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 12539–12544. <https://doi.org/10.1073/pnas.1103959108>.
- Zipfel, C. (2009). Early molecular events in PAMP-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 12, 414–420. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2009.06.003>.