



HAL
open science

Mécanismes épigénétiques impliqués dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à l'infection par *Plasmodiophora brassicae* sous différentes conditions abiotiques

Mathilde Petitpas

► **To cite this version:**

Mathilde Petitpas. Mécanismes épigénétiques impliqués dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à l'infection par *Plasmodiophora brassicae* sous différentes conditions abiotiques. Sciences agricoles. Agrocampus Ouest, 2023. Français. NNT : 2023NSARB374 . tel-04611771

HAL Id: tel-04611771

<https://theses.hal.science/tel-04611771v1>

Submitted on 14 Jun 2024

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.

COLLEGE ECOLOGIE

DOCTORAL GEOSCIENCES

BRETAGNE AGRONOMIE ALIMENTATION

THESE DE DOCTORAT DE

L'INSTITUT AGRO RENNES ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 600

Ecologie, Géosciences, Agronomie, Alimentation

Spécialité : Génétique, génomique et bio-informatique

Par

Mathilde PETIPAS

Mécanismes épigénétiques impliqués dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à l'infection par *Plasmodiophora brassicae* sous différentes conditions abiotiques

Thèse présentée et soutenue à Rennes, le 11 décembre 2023

Unité de recherche : UMR1349 - Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes

Thèse n° : n° de série : B-374 et n° d'ordre : 2023-26

Rapporteurs avant soutenance :

Stéphanie JAUBERT-POSSAMAI
Véronique DECROOCQ

Chargée de Recherche, INRAE, ISA, Sophia Antipolis
Directrice de recherche, INRAE, BFP (UMR 1332), Bordeaux

Composition du Jury :

Présidente : Sandrine LAGARRIGUE Professeure, L'Institut Agro Rennes-Angers

Examineurs : Richard BERTHOME Directeur de recherche, INRAE, LIPME, Toulouse
Stéphane MAURY Professeur, Université d'Orléans

Dir. de thèse : Maria MANZANARES-DAULEUX Professeure, L'Institut Agro Rennes-Angers
Co-dir. de thèse : Mélanie JUBAULT Maître de Conférences, L'Institut Agro Rennes-Angers

A mon Grand-Père,

J'ai décidé de garder le sujet de l'anti-matière pour une autre vie...

Remerciements

Je souhaite tout d'abord remercier Maria MANZANARES-DAULEUX et Mélanie JUBAULT, mes deux encadrantes. Merci de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet, de m'avoir guidée au cours de ces trois années. J'ai beaucoup appris de cette thèse et je suis fière d'être arrivée jusqu'au bout. J'espère avoir été à la hauteur de vos attentes. Merci de m'avoir permis de grandir, humainement et scientifiquement et de m'avoir accompagnée jusqu'au bout.

Je souhaite ensuite remercier les membres du jury qui ont accepté de relire et d'évaluer le travail réalisé au cours de ma thèse. Je remercie donc chaleureusement Stéphanie JAUBERT-POSSA-MAI, Véronique DECROOCQ, Stéphane MAURY, Richard BERTHOME et Sandrine LA-GARRIGUE.

Je voudrais également remercier les membres de mon comité de thèse, Nathalie NESI, Antoine GRAVOT, Richard BERTHOME et Vincent COLOT. J'ai beaucoup apprécié les échanges que nous avons pu avoir durant nos rendez-vous et ces moments de sciences et de discussions m'ont vraiment aidée à y voir plus clair dans mes objectifs de thèse.

Je souhaiterais remercier la région Bretagne et le département BAP pour avoir cofinancé ces travaux de thèse.

Je voudrais remercier très chaleureusement Christine LARIAGON (Colonel) et Jocelyne LEMOINE (Douce Princesse). Merci beaucoup à toutes les deux pour avoir toujours été là au cours de ma thèse, pour m'avoir accompagnée tout au long de ces trois années, pour m'avoir aidée dans la réalisation des expérimentations et pour en avoir géré la plupart. Mais je voudrais surtout vous remercier pour votre patience et votre sagesse. J'ai énormément apprécié nos moments passés ensemble, nos discussions de tout et de rien. Christine, Jocelyne, vous m'avez appris à m'accrocher, à me concentrer sur l'essentiel et à prendre du recul. Merci beaucoup à vous deux. Christine, je te souhaite le meilleur pour ta carrière à l'INRAe, je te souhaite de t'amuser, de prendre du plaisir à faire pousser des plantes. Jocelyne, je te souhaite une très belle retraite : profite de ce repos bien mérité !

J'ai eu la chance durant cette thèse de pouvoir encadrer Romane LAPOUS (M1) et Mathieu LE DUC (M2). Merci à vous deux de m'avoir fait confiance et d'accepter de venir travailler avec moi. Cela a été un réel plaisir de passer ces quelques mois en votre compagnie et vous m'avez, l'un comme l'autre, beaucoup appris. Je souhaite à tout le monde de pouvoir encadrer des stagiaires comme vous ! Romane, tu es bien lancée en science à présent et je te souhaite le meilleur pour ta propre thèse. Je te remercie énormément pour toutes les questions, pour toutes les discussions que nous avons pu avoir. Tu m'as aidée lors de ton stage (et de ma première année) à comprendre mon sujet, et je t'en remercie. Mathieu, merci à toi pour ta bonne humeur, ta bonne volonté et ton optimisme, j'ai beaucoup apprécié travailler et discuter avec toi et nos séances d'extraction d'ADN du jeudi après-midi resteront à jamais dans ma tête. Bon vent à toi !

J'adresse également mes remerciements aux membres, passés ou présents, de l'équipe DEBI pour toute l'aide lors des lavages ou tout simplement pour la bonne humeur dont vous faites preuve. Ça a été un réel plaisir d'échanger et de travailler avec vous. Je souhaiterais donc remercier : Virginie HUTEAU, Maryse LODÉ-TABUREL, Gwenaëlle DENIOT, Clarisse BLANDIN, Anne-Marie CHEVRE, Jérôme MORICE, Mathieu TIRET, Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN, Pascale GLORY, Patrick VALLEE, Matéo BOUDET, Régine DELOURME, Philippe DUFFE, Cyril FALENTIN, Brigitte GUILLET, Anne LEVREL, Julie FERREIRA DE CARVALHO et Maud FACON.

Je souhaiterais également remercier toutes les personnes qui m'ont aidées à mener à bien toutes les analyses bio-informatiques durant ces trois années : Gauthier RICHARD, Susete ALVES-CARVALHO, Kévin GAZENGEL et Loeiz MAILLET.

Je tenais à remercier tout spécialement Mathieu ROUSSEAU-GUEUTIN, Cyril FALENTIN et Franz BOIDEAU pour le beau voyage que nous avons fait à San Diego. Merci beaucoup d'avoir cru en moi, d'avoir su me redonner la motivation nécessaire pour faire cette présentation et de m'avoir encouragée. Ce voyage a été une bouffée d'air frais et m'a beaucoup aidée pour affronter la suite.

Je voudrais remercier chaleureusement Carine LETHU, qui m'a accompagnée sur cette dernière année de thèse et m'a permis de garder un esprit clair et de ne pas perdre mon objectif de vue ainsi que Sylvain FOURNET, Josselin MONTARRY et Anne-Marie CHEVRE pour les discussions d'ordre professionnel qui m'ont permis d'acquérir le recul nécessaire afin d'y voir plus clair pour cet après thèse qui arrive.

Je voudrais remercier toutes les personnes qui m'ont permis de vivre cette thèse de manière plus sereine. Les personnes avec qui j'ai partagé mon bureau, avec qui j'ai pris un café, des pauses et qui ont pu m'aider également à avancer. Merci tout d'abord à Franz BOIDEAU et Yousseff BOUARGALNE pour m'avoir accueilli dans votre petit duo au début de la thèse. La liberté post-confinement et les soirées au Ty Gwen ont été géniales et je vous en remercie. Je voudrais par la suite remercier Marie DEVERS et Marianne LAURENÇON. Merci Marie pour toutes nos discussions, pour ta confiance, ta patience et merci de m'avoir aidée à développer cette belle passion des plantes ! Je te souhaite tout le meilleur ! Marianne, qu'est-ce que je pourrais bien dire ? Merci de ton énergie, de ta bonne humeur, merci pour nos marches et nos nombreuses discussions, nos délires et ton soutien dans les moments compliqués. Je suis vraiment ravie d'avoir pu te rencontrer et j'espère que ces années à l'IGEPP ne sont que les prémices d'autres aventures ! Je voudrais également remercier Mathieu (-) TIRET pour toutes les discussions que nous avons eu, des plus sérieuses aux plus légères et surtout de l'aide que tu m'as apporté pour la rédaction ou la réflexion. Merci également à Loiez MAILLET pour l'aide en bioinformatique, pour nos discussions et nos parties de jeu avec Marie ! Je voudrais remercier chaleureusement Julie FERREIRA DE CARVALHO pour nos discussions au début et pendant ma thèse. J'ai vraiment apprécié passer ces moments avec toi. Je voudrais également remercier Mathieu AUBERT, Florian GUILBAUD, Youcef HADDAD pour nos discussions, nos pauses café ou du midi ! Merci également à Pierre-Nicolas BOULCH pour nos discussions. Je te souhaite tout le meilleur pour la fin de ta thèse, tiens bon !!

Je voudrais ensuite remercier les membres du « club MTG » : Florian, Antoine, Manu, Romain et Anne-Claire et tous les gens avec qui j'ai pu jouer aux cartes durant cette période. J'ai beaucoup apprécié ces moments-là et je vous en remercie. C'était une façon pour moi de penser à autre chose, de décompresser et de me détendre.

Je souhaiterais remercier ma famille. Ma Maman, tout d'abord, pour tout le support moral qu'elle m'a apporté, pour tous les conseils, le soutien et tout simplement pour être là. Je voudrais remercier mon Père aussi, pour le soutien, pour me donner la motivation nécessaire de toujours aller au bout de tout ce que j'entreprends. Et puis il y a la fratrie, la meilleure fratrie : Nicolas, merci pour tout, ton calme, ta sagesse, tes cheveux blancs, merci. Céline, merci aussi d'avoir été là quand j'en avais besoin, de m'avoir aidée à avancer, de m'avoir conseillée, permis de ventiler sur des choses et d'autres. Paul, à toi aussi merci. D'être là, de me permettre de relativiser, de me faire sourire alors que les choses sont compliquées. Et puis Simon, d'être toujours motivé, de toujours demander comment ça va. Je sais que je pourrais toujours compter sur vous et croyez-moi, vous pourrez toujours compter sur moi. Merci beaucoup à Manu, c'est un réel plaisir de t'avoir en tant que beau-frère, merci de ta bonne humeur et ton optimisme !

Je voudrais finir par cette venue qui a changé ma vie. Une bouffée de bonheur, une bouffée d'air qui m'a appris à relativiser au cours de ces trois ans, qui m'a permis de m'ancrer dans la réalité et de tenir jusqu'au bout. Beaucoup de gens finissent leurs remerciements de thèse par leur famille, leur conjoint(e) ou leur enfant. Pour moi c'est à Jack, mon *potit* chat, que je dis **merci**.

Listes des Abréviations

ABA: acide abscissique
ADN : acide désoxyribonucléique
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ARNnc : Acide ribonucléique non codant
BR : Brassinostéroïdes
Bur-0 : Burren
CDPKs : calcium-dependent proteins kinases
circARN : ARN circulaire
CK : cytokinines
CMT : chromométhylase
CNL : coiled-coil
Col-0 : Colombia
CS : états chromatiniens
CUC : CUP-SHAPED COTYLEDON
DAMP : Damage associated molecular pattern
DDM1 : decrease in DNA methylation
DMR : région différenciellement méthylées
EMS : éthyl méthanesulfonate
epiRIL : lignée épigénétiquement recombinante
ET : éthylène
ETI : Effector Triggered Immunity
ETS : Effector Triggered Susceptibility
GIEC : Groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat
GRF : GROWTH REGULATING FACTOR
GWAS : GENOME WIDE Association STUDIES
HIF : Heterogenous Inbred Family
HR : hypersensitive response
ISR : résistance systémique induite
JA : acide jasmonique
KO : knock-out
Ler : Landsberg erecta
lncARN : ARN long non codants
MAMP : Microbe associated molecular pattern
miARN : microARN
MTI : MAMP-Triggered Immunity
NaCl : Chlorure de sodium : Sel
NAM : NO APICAL MERISTEM
NBS-LRR : nucleotide binding domain leucine rich repeat
PAMP: Pathogen associated molecular pattern
PCR : Polymerase Chain Reaction
PETM : maximum thermique du Paléocène-Eocène
PR: pathogenesis-related genes
PRR : pattern recognition receptor

PTI : PAMP-Triggered Immunity
QTL : Quantitative Trait Loci
RCLKs: receptor like cytoplasmic kinase
RCP : Representative Concentration Pathway
RISC : RNA induced silencing complex
RPW8 : resistance to powdery mildew 8
SA : acide salicylique
SAR : résistance systémique acquise
siARN : petits ARN interférants
TCP : TEOSINTE BRANCHED1, CYCLOIDEA, and PROLIFERATING CELL NUCLEAR
ANTIGEN BINDING FACTOR
TIR : toll/interleukin-1 receptor
TSS : site d'initiation de la transcription
TTS: site de terminaison de la transcription
VWC : volumetric water content
WGBS : Whole Genome Bisulfite Sequencing

Table des matières

Table des matières	
Introduction Générale.....	1
CHAPITRE I : Synthèse bibliographique	5
1. Réponses des plantes aux stress abiotiques et biotiques, seuls et combinés	5
1.1. Réponse des plantes aux stress abiotiques.....	6
1.1.1. Modification des conditions environnementales : conséquences du changement climatique	6
1.1.2. Réponses des plantes aux changements environnementaux.....	7
1.2. Réponse des plantes aux stress biotiques	14
1.2.1. Concepts et définitions de la réponse des plantes aux organismes pathogènes.....	14
1.2.2. Mécanismes de l'immunité végétale selon le modèle Zig-Zag	16
1.2.3. La résistance qualitative et quantitative des plantes aux agents pathogènes	18
1.2.4. Rôle des hormones dans la défense des plantes aux pathogènes.....	20
1.3. Impact de contraintes biotiques et abiotiques combinées sur les plantes	21
1.3.1. La combinaison de stress : modalités d'application et interaction des stress	21
1.3.2. Impact de la combinaison de contraintes abiotiques sur les plantes.....	22
1.3.3. Impact des conditions environnementales sur l'issue de l'interaction plante-agent pathogène.....	23
1.4. Plasticité de la réponse des plantes sous des contraintes abiotiques	24
2. Épigénétique et réponse des plantes aux stress abiotiques et biotiques.....	25
2.1. Définitions de l'épigénétique	25
2.2. Les mécanismes épigénétiques.....	26
2.3. Méthylation de l'ADN.....	29
2.3.1. Mise en place, maintenance et processus de déméthylation.....	29
2.3.2. DDM1, une protéine remodelant la chromatine	32
2.3.3. Méthylome chez <i>A. thaliana</i> et autres <i>Brassicaceae</i> et effet de la méthylation sur la transcription.....	32

2.3.4.	Implication de la méthylation dans le développement et les réponses des plantes aux stress biotiques et abiotiques	34
2.3.5.	Stabilité de la méthylation : épigénétique transgénérationnelle	37
2.4.	Les microARN	41
2.5.	Etapas de productions des miARN.....	42
2.6.	Contrôle de la production de miARN et turnover des miARN	44
2.7.	Familles multigéniques et conservation des miARN à travers les espèces	45
2.8.	Rôle des miARN	46
3.	Le modèle d'interaction : Brassicaceae – <i>Plasmodiophora brassicae</i>	50
3.1.	<i>Plasmodiophora brassicae</i> , agent causal de la hernie des crucifères	50
3.1.1.	Enjeux économiques.....	50
3.1.2.	Biologie et cycle de développement de <i>P. brassicae</i>	50
3.1.3.	Facteurs influençant le développement de la maladie	54
3.1.4.	Détection de la maladie et moyens de lutte	55
3.2.	Les facteurs de résistance génétique identifiés chez les <i>Brassicaceae</i>	58
3.2.1.	Résistances identifiées chez <i>B. napus</i>	58
3.2.2.	Résistances identifiées chez <i>B. oleracea</i>	59
3.2.3.	Résistances identifiées chez <i>B. rapa</i>	59
3.2.4.	Résistances identifiées chez <i>A. thaliana</i>	60
3.3.	Impact de l'infection par <i>P. brassicae</i> sur la plante hôte	61
3.3.1.	Modifications morphologiques.....	61
3.3.2.	Bouleversement du contenu hormonal de la plante hôte	61
3.3.3.	Détournement du métabolisme.....	64
3.3.4.	Modifications épigénétiques chez la plante hôte suite à l'infection par <i>P. brassicae</i>	65
4.	Objectifs de la thèse et stratégies.....	69

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes.....	72
1. Matériels végétal et parasitaire.....	72
1.1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
1.1.1. Ecotypes	72
1.1.2. La population epiRIL	72
1.1.3. Les mutants d' <i>A. thaliana</i>	73
1.2. Gamme d'hôtes différentiels	73
1.3. Matériel parasitaire.....	74
2. Conditions de culture et déroulé des tests pathologiques réalisés sur la population epiRIL	74
2.1. Déroulé général des tests pathologiques.....	74
2.2. Conditions de culture et contraintes abiotiques appliquées.....	75
2.3. Caractérisation phénotypique de l'impact de l'infection par <i>P. brassicae</i> sur la plante hôte	77
2.4. Caractérisation phénotypique de l'impact des contraintes abiotiques sur les plantes non infectées par la hernie.....	78
3. Identification de QTL épigénétiques	79
3.1. Analyses statistiques des données de phénotypage	79
3.2. Carte épigénétique de la population epiRIL	79
3.3. Détection de QTL épigénétiques (QTL ^{epi}).....	80
3.4. Analyses statistiques de l'effet des variants génétiques présents dans l'intervalle de confiance des QTL ^{epi}	81
4. Etude du niveau de méthylation de régions génomiques en fonction des conditions abiotiques appliquées	81
5. Etude de l'expression des gènes <i>AT5G47260</i> et <i>AT5G47280</i>	82
6. Implication des microARN dans la réponse d' <i>A. thaliana</i> à <i>P. brassicae</i>	83

6.1.	Dispositif expérimental	83
6.2.	Isolement et séquençage des ARN totaux	84
6.3.	Alignement et comptage des reads issus du séquençage	84
6.4.	Identification des gènes et microARN différentiellement exprimés	85
6.5.	Analyse fonctionnelle des gènes et microARN différentiellement exprimés.....	85
7.	Etude de la réponse des mutants de microARN à l'infection par <i>P. brassicae</i>	86
7.1.	Dispositif expérimental	86
7.2.	Caractérisation phénotypique de l'impact de l'infection par <i>P. brassicae</i> sur la plante hôte	86

CHAPITRE III : Impact de contraintes abiotiques sur l'architecture épigénétique de la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à la hernie **88**

1.	Introduction	88
2.	Environmental conditions modulate the effect of epigenetic factors controlling the response of <i>Arabidopsis thaliana</i> to <i>Plasmodiophora brassicae</i>	90
2.1.	Introduction	91
2.2.	Materials and Methods	92
2.2.1.	Plant material.....	92
2.2.2.	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	93
2.2.3.	Growth conditions and experimental set-up.....	93
2.2.4.	Phenotyping.....	94
2.2.5.	Statistical analyses.....	95
2.2.6.	QTL ^{epi} detection.....	96
2.2.7.	DNA sequence variation.....	97
2.3.	Results	97
2.3.1.	Effect of abiotic factors on the epigenetic architecture controlling foliar development	97
2.3.2.	The abiotic conditions significantly modulated the response of the parents and the epiRIL population to clubroot	98

2.3.3.	The epigenetic architecture controlling the response of epiRIL to clubroot is modified by abiotic constraints	100
2.3.4.	Epigenetic factors involved in the control of phenotypic plasticity	101
2.4.	Discussion	103
2.7.	Bibliography	110
3.	Impact des conditions abiotiques sur le niveau de méthylation de régions génomiques d' <i>Arabidopsis</i>	114
3.1.	Matériels, méthodes et stratégies.....	115
3.1.1.	Choix des régions génomiques	115
3.1.2.	Choix des génotypes.....	117
3.1.3.	Conditions expérimentales et choix des points cinétiques	118
3.1.4.	Mesure et analyse du niveau de méthylation.....	119
3.2.	Résultats	119
3.2.1.	Impact des conditions abiotiques sur le niveau de méthylation de l'épimarqueur MM863 et des gènes causaux du QTL <i>Pb-At 5.2</i> (chromosome 5).....	119
3.2.2.	Impact des conditions abiotiques sur le niveau d'expression des gènes <i>AT5G47260</i> et <i>AT5G47280</i>	120
3.2.3.	Impact des conditions abiotiques sur le niveau de méthylation de l'épimarqueur MM171 au niveau du QTL ^{epi} GALA-Ch2-Standard sur le chromosome 2.....	121
3.3.	Discussion et perspectives	122
4.	Impact de contraintes abiotiques combinées sur l'architecture épigénétique de la réponse d' <i>Arabidopsis</i> à la hernie	126
4.1.	Impact des conditions combinées sur la réponse des parents et de la population epiRIL à la hernie	127
4.1.1.	Impact de la condition combinée DROUGHTxHEAT sur la réponse d' <i>Arabidopsis</i> à la hernie des crucifères	128
4.1.2.	Impact de la condition combinée FLOODxHEAT sur la réponse d' <i>Arabidopsis</i> à la hernie des crucifères	129
4.2.	Corrélation entre les traits et interactions entre les contraintes abiotiques.....	131
4.3.	Impact des conditions abiotiques combinées sur l'architecture épigénétique de la réponse à la hernie.....	131

4.4.	L'architecture du contrôle épigénétique de la plasticité phénotypique lors de l'application de contraintes combinées	133
4.5.	Discussion et perspectives	135
5.	Conclusion partielle.....	137
CHAPITRE IV : Implication des miARN dans la réponse d'<i>Arabidopsis thaliana</i> à la hernie.. 143		
1.	Introduction	143
2.	Identification of <i>Arabidopsis</i> miRNAs involved in susceptible and partial resistance responses to clubroot.....	145
2.1.	Introduction	146
2.2.	Materials and Methods	148
2.2.1.	<i>Plasmodiophora brassicae</i>	148
2.2.2.	Plant material.....	148
2.2.3.	Experimental design	148
2.2.4.	mRNA and miRNA isolation and sequencing.....	149
2.2.5.	Bioinformatic mRNA and miRNA analyses	149
2.3.	Results	150
2.3.1.	Transcriptome of <i>Arabidopsis</i> ecotypes susceptible and partially resistant to <i>P. brassicae</i>150	
2.3.2.	Identification of miRNA differentially expressed upon infection by <i>P. brassicae</i> in partially resistant and susceptible ecotypes and their targets	153
2.4.	Discussion	156
2.7.	Bibliography	162
3.	Validation fonctionnelle des miARN	166
3.1.	Validation fonctionnelle du rôle des miARN dans la réponse d' <i>Arabidopsis</i> à la hernie.....	166
3.2.	Résultats obtenus	169
4.	Conclusion partielle et perspectives	170

CHAPITRE V : Discussion générale et perspectives 174

1. De la complexité d'étudier l'impact des conditions abiotiques sur les interactions hôtes-pathogènes 176
2. Aller plus loin dans la connaissance des gènes causaux 182
3. Stabilité des QTL^{epi} et des niveaux de méthylation des gènes causaux dans les différentes conditions abiotiques 185
4. Validation et étude de l'implication des miRNA et de leurs gènes cibles dans la réponse à la hernie 191
5. Interactions entre les mécanismes épigénétiques dont la méthylation de l'ADN et les miRNA
196
6. Transférabilité des résultats aux cultures d'intérêt agronomique 199

Bibliographie.....

ANNEXES.....

1. Annexe Chapitre III:.....
2. Annexes Chapitre IV:.....
3. Annexes Chapitre V:

Introduction Générale

Introduction Générale

L'épigénétique est la discipline qui étudie les mécanismes impliqués dans la régulation de l'expression des gènes sans modification de leur séquence nucléotidique (Waddington, 1959; Holliday, 1987). Heard & Martienssen (2014) distinguent deux catégories dans la discipline de l'épigénétique basées sur les méthodes de transmission des mécanismes : (1) l'épigénétique transgénérationnelle et (2) l'épigénétique dite adaptative. L'épigénétique transgénérationnelle n'est pas soumise à une réinitialisation lors des divisions mitotiques et méiotiques et est donc transmise sur plusieurs générations (Fitz-James & Cavalli, 2022). L'épigénétique adaptative dépend de l'environnement et permet aux organismes de s'adapter rapidement aux pressions environnementales et biotiques sans être transmise d'une génération à l'autre. De nombreux mécanismes épigénétiques, à la fois transgénérationnels et adaptatifs, sont impliqués dans un grand nombre de processus physiologiques, notamment dans le développement végétatif et reproductif, ainsi que dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques. Parmi les mécanismes épigénétiques, on peut notamment citer la méthylation de l'ADN, les modifications d'histones ou les ARN non codants.

La méthylation de l'ADN, c'est-à-dire l'apposition d'un groupe méthyl sur les cytosines, est l'un des principaux mécanismes épigénétiques impliqués dans la stabilité du génome à travers la répression d'éléments transposables et dans la modulation de l'expression des gènes (revue dans Zhang et al., 2018). La méthylation de l'ADN est transmissible sur plusieurs générations (Johannes *et al.*, 2009). Chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*, des épimutations transgénérationnelles, et en particulier des variations de méthylation de l'ADN, sont impliquées dans le contrôle de traits complexes concernant le développement (Johannes *et al.*, 2009; Cortijo *et al.*, 2014a), le métabolisme (Aller *et al.*, 2018) et la réponse aux stress abiotiques (Kooke *et al.*, 2015) et biotiques (Furci *et al.*, 2019; Liégard *et al.*, 2019a). Les miARN jouent également un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes *via* le clivage de leurs cibles (Guo *et al.*, 2005). L'implication des miARN dans la réponse des plantes à différents stress a déjà été démontrée dans de nombreuses interactions plante-microorganismes pathogènes (Yang *et al.*, 2021).

Dans la nature, les plantes subissent des agressions par des agents pathogènes et/ou des ravageurs tout en affrontant diverses contraintes abiotiques d'intensité variable et de plus en plus fréquentes dans le contexte de changement climatique. Ces stress, combinés ou individuels, entraînent d'importants dommages sur les cultures et *in fine* d'énormes pertes économiques. L'impact des facteurs environnementaux sur l'issue de l'interaction plante- agents pathogènes dépend du pathosystème, de l'intensité du stress, de la durée de l'application du stress et de sa récurrence (revue dans Velásquez *et al.*, 2018; Desaint *et al.*, 2021). Selon le pathosystème, il a ainsi été démontré que l'application d'une contrainte abiotique peut conduire à une meilleure résistance (Aoun *et al.*, 2017) ou à une sensibilité accrue à l'agent pathogène (Bidzinski *et al.*, 2016). Bien que l'impact sur les plantes de stress abiotiques ou biotiques appliqués individuellement soit très documenté dans la littérature scientifique, peu d'études se sont intéressées à l'impact combiné de stress biotiques x abiotiques sur les plantes. À ce jour et à notre connaissance, aucune étude n'a évalué l'impact des conditions abiotiques sur les facteurs épigénétiques impliqués dans la réponse de la plante à une attaque parasitaire.

Dans ce contexte et au cours de cette thèse, je me suis tout particulièrement intéressée à la méthylation de l'ADN et au rôle des miARN dans la réponse des plantes aux stress biotiques en interaction avec des contraintes abiotiques, et mes travaux se sont plus précisément intéressés au pathosystème *A. thaliana* - *Plasmodiophora brassicae*.

P. brassicae, l'agent causal de la hernie des crucifères, est un protiste tellurique parasite obligatoire des plantes, capable d'infecter une grande majorité des membres de la famille des *Brassicaceae*, notamment des cultures d'intérêt agronomique telles que le colza, les choux ou la navette, ainsi qu'*A. thaliana*. La réponse des *Brassicaceae* à la hernie des crucifères est sous le contrôle de plusieurs facteurs génétiques et épigénétiques dont l'effet et la localisation peuvent être modifiés par des contraintes environnementales, notamment la disponibilité en azote ou en eau du sol (Gravot *et al.*, 2016; Laperche *et al.*, 2017; Aigu *et al.*, 2018; Liégard *et al.*, 2019). Lors de l'infection par *P. brassicae*, la plante subit d'importantes modifications morphologiques de son système racinaire qui s'accompagnent d'une reprogrammation cellulaire et physiologique concernant notamment la modulation des voies hormonales, la production de sucres et la dégradation des parois cellulaires (Siemens *et al.*, 2006; Devos *et al.*, 2006; Jubault *et al.*, 2013; Irani *et al.*, 2018), processus potentiellement contrôlés par des mécanismes épigénétiques. Je me suis ainsi intéressée à l'impact de trois contraintes environnementales ponctuelles (hausse de la température, sécheresse modérée et inondation) sur l'architecture épigénétique de la réponse d'*A. thaliana* à la hernie.

J'ai également étudié le rôle des miARN dans la réponse de deux écotypes *d'A. thaliana* présentant un niveau de sensibilité différent à la hernie dans des conditions environnementales classiques de culture.

Mon travail de thèse a été encadré par Mélanie Jubault (Maître de Conférences, Institut Agro Rennes-Angers) et Maria Manzanares-Dauleux (Professeur, Institut Agro Rennes-Angers) au sein de l'équipe « Diversité, Evolution et génomique des Interactions Biotiques » de l'UMR IGEPP (Institut de Génétique, Environnement et Protection des Plantes, UMR 1349 INRAE, Institut Agro Rennes-Angers, Université de Rennes) et cofinancé par une bourse du Département Biologie et Amélioration des Plantes de l'INRAe et de la région Bretagne.

Chapitre I :
Synthèse bibliographique

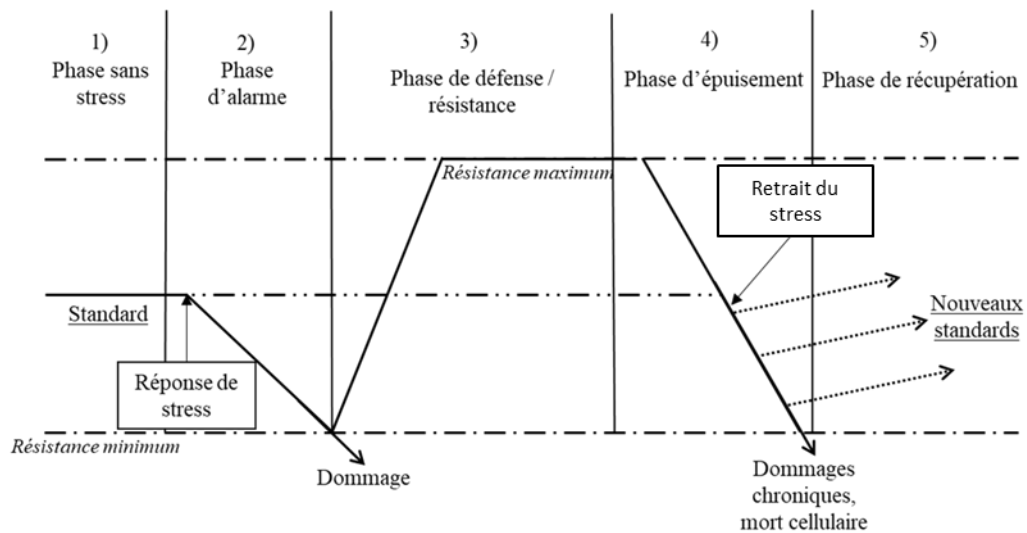


Figure I.1. : Conceptualisation de la réponse des plantes aux stress. 1) la phase d'alarme, qui est la phase de reconnaissance du stress, 2) la phase de résistance, qui correspond à la réponse de la plante au stress à travers des mécanismes d'adaptation, 3) la phase d'épuisement durant laquelle le stress prolongé ou la sévérité du stress entraîne une défaillance de la plante et enfin, si le stress s'arrête, 4) la phase de régénération durant laquelle la plante, si elle en est capable, va récupérer du stress subi (Lichtenhaler, 1998).

CHAPITRE I : Synthèse bibliographique

1. Réponses des plantes aux stress abiotiques et biotiques, seuls et combinés

La notion de stress subi par les plantes est abordée de différentes façons dans la littérature : « toute condition non favorable ou substance qui affecte ou bloque le métabolisme ou la croissance d'une plante » (Lichtenthaler, 1996), « une condition causée par des facteurs qui tendent à modifier un équilibre » (Gaspar *et al.*, 2002; Kranner *et al.*, 2010) ou « tout changement physiologique qui se produit lorsque les espèces sont exposées à des conditions extraordinairement défavorables qui ne représentent pas nécessairement une menace pour la vie, mais qui induisent une réaction d'alarme » (Gaspar *et al.*, 2002). Lichtenthaler (1998) définit le stress d'une façon plus globale comme « une déviation significative des conditions optimales de vie ».

Quelle que soit la définition, les stress sont classés en deux grandes catégories en fonction des facteurs déclencheurs. Les stress abiotiques regroupent tous les stress environnementaux causés par des facteurs tels qu'une augmentation de la quantité en sel du substrat, une augmentation ou une baisse de la température, ou une modulation des conditions hydriques et nutritionnelles, et les stress biotiques regroupent ceux déclenchés par des organismes vivants (par exemple des virus, bactéries ou champignons) (Kranner *et al.*, 2010; Mosa *et al.*, 2017). La réponse d'une plante à un stress donné dépend de l'espèce végétale considérée, du moment d'application, du type, de la durée, de l'intensité et de la récurrence du stress et du stade de développement de la plante ou de son état sanitaire (par exemple si elle est déjà malade, ou dans des conditions particulières qui la désavantagent) (Lichtenthaler, 1998). Cette réponse est divisée en quatre phases (**Fig. I.1.**) : 1) la phase d'alarme qui correspond à la reconnaissance du stress, 2) la phase de défense/résistance qui comprend la réponse de la plante au stress à travers des mécanismes d'adaptation, 3) la phase d'épuisement durant laquelle le stress prolongé ou la sévérité du stress entraîne une défaillance de la plante et finalement, si le stress s'arrête, 4) la phase de régénération durant laquelle la plante, si elle en est capable, récupère du stress subi (Lichtenthaler, 1998).

La première concerne l'étude de la viabilité des plantes, via notamment la comparaison des mesures de croissance, de production ou de capacité de reproduction, entre la condition stressée et la condition témoin. La deuxième échelle est la mesure de l'efficacité de processus biologiques tels que la photosynthèse ou la transduction de signaux au niveau cellulaire. Enfin, l'étude du niveau d'expression de certains gènes ou l'abondance de certaines protéines ainsi que des modifications post-traductionnelles, permettent d'évaluer au niveau microscopique l'impact du stress sur la plante.

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'impact de trois facteurs abiotiques (une hausse de la température, une sécheresse modérée ou un excès d'eau), appliqués seuls ou en combinaison, sur la réponse d'*A. thaliana* à l'infection par le protiste *Plasmodiophora brassicae*, agent causal de la hernie des Crucifères. Dans cette première partie, nous proposons un état de l'art sur les trois types de contraintes abiotiques appliquées, leur impact sur les plantes et sur l'issue de l'interaction plante-agent pathogène.

1.1. Réponse des plantes aux stress abiotiques

1.1.1. Modification des conditions environnementales : conséquences du changement climatique

La première perturbation climatique répertoriée sur Terre a eu lieu il y a environ 56 millions d'années lors du passage du Paléocène à l'Eocène. Cette perturbation climatique, appelée maximum thermique du Paléocène-Eocène (*Paleocene-Eocene Thermal Maximum*, ou PETM) a duré environ 170 mille ans (Röhl *et al.*, 2007) et a été caractérisée par l'augmentation de la température du globe de 4 à 5 °C (Zachos *et al.*, 2003). Ce réchauffement a probablement été déclenché par un dégagement important de méthane d'origine volcanique (Svensen *et al.*, 2004) et s'est accompagné de nombreux exodes de la faune, de la disparition de certaines plantes et mammifères et d'une modification du régime hydrique et du cycle du carbone (Zachos *et al.*, 2001). La Terre aurait mis plus de deux cent mille ans à se remettre de cet événement (Röhl *et al.*, 2000). La modification des conditions climatiques et les perturbations du cycle de l'eau consécutives au PETM seraient toutefois moins importantes que celles prédites suite au changement climatique observé actuellement. En effet, le niveau de la production de carbone est plus de 20 fois supérieur actuellement que celle estimée lors du PETM (0.3 à 1.7 Gt lors du PETM contre 36.6 Gt émises en 2018) (Cui *et al.*, 2011; Jackson *et al.*, 2018).

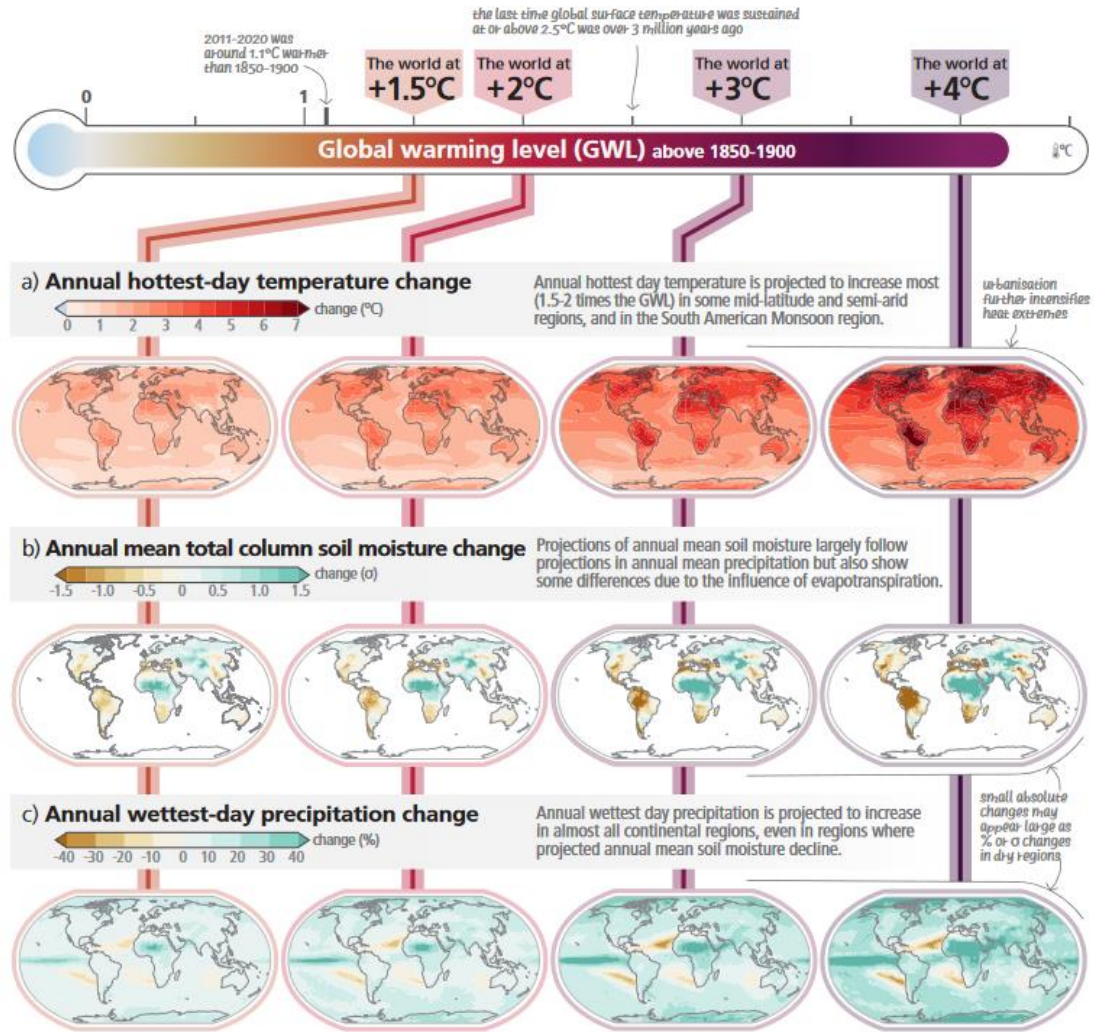


Figure I.2.: Prédiction des modifications environnementales en fonction de l'élévation de la température (augmentation de 1.5, 2, 3 et 4°C). L'élévation de la température globale dépend des différents scénarios Representative Concentration Pathway (RCP) : RCP2.6 = élévation de 2°C, RCP4.5 = élévation de 3°C et RCP8.5, élévation de 4°C. Il est possible de retrouver sur cette figure, au niveau mondial, a) les prédictions de l'augmentation annuelle de la température du jour le plus chaud (°C), b) les modifications annuelles de l'humidité du sol (écart-type standard) et c) et les variations annuelles des précipitations du jour le plus humide (%). (IPCC, 2023)

La première conséquence observée du changement climatique est l'augmentation globale de la température depuis le 19^{ème} siècle. La température moyenne sur la période 2011-2020 est supérieure de 1.09°C aux températures répertoriées sur la période 1850-1900 (IPCC, 2023). Plusieurs modèles sont utilisés pour prédire l'évolution des températures d'ici 2050, notamment les modèles RCP (Representative Concentration Pathway), basés sur le niveau de carbone émis. Pour le modèle le plus optimiste, prévoyant une baisse drastique des émissions de CO₂, RCP2.6, l'élévation de la température ne devrait pas dépasser les 2°C tandis que pour le modèle RCP8.5, modèle pour lequel aucune diminution de la production de carbone n'est envisagée, la température du globe devrait augmenter de plus de 4°C (IPCC, 2023). L'augmentation de la température n'est pas la seule conséquence du changement climatique. En effet, le cycle mondial de l'eau devrait être perturbé, mais de manière non-uniforme (Stocker *et al.*, 2013). Le scénario le plus probable prédit une augmentation des précipitations annuelles aux latitudes élevées et dans les régions équatoriales, et une diminution des précipitations aux latitudes moyennes et dans les régions subtropicales sèches (**Fig. I.2.**). En outre, les épisodes extrêmes de précipitations deviendront plus fréquents et plus intenses dans les régions déjà touchées par ces phénomènes. Les moussons, par exemple, s'étendront géographiquement et dureront plus longtemps avec une intensité plus élevée (Hoegh-Guldberg *et al.*, 2018).

1.1.2. Réponses des plantes aux changements environnementaux

Le changement climatique aura un impact sur la production agricole mondiale variable selon la localisation géographique et les espèces (Ma *et al.*, 2012; Raza *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2022), mais cet impact sera en général négatif (Lobell *et al.*, 2011; Wheeler & von Braun, 2013; Zhao *et al.*, 2017b). L'augmentation de la fréquence d'événements extrêmes, comme l'épisode de sécheresse en Europe durant l'année 2018 qui a entraîné une réduction de presque la moitié du rendement de plusieurs cultures telles que l'orge ou le maïs (Toreti *et al.*, 2019), pourra également conduire à des baisses de rendement. Les principaux stress, accentués par le changement climatique et impactant fortement la physiologie et le développement des plantes, sont une hausse ponctuelle des températures, qu'elles soient diurnes ou nocturnes et l'instabilité de la disponibilité en eau avec notamment des épisodes de sécheresses ou d'excès d'eau. Par la suite, nous présenteront l'impact de différentes contraintes sur les plantes, dont la plante modèle *A. thaliana*, utilisée au cours de ces études, et d'autres plantes.

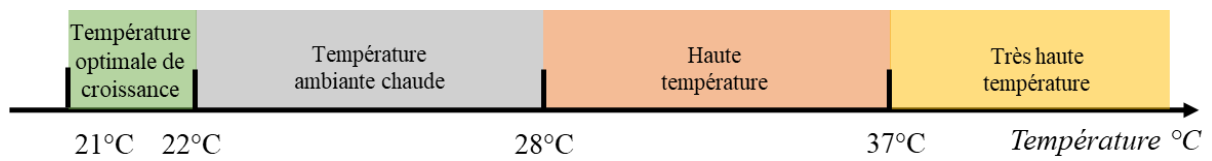


Figure I.3. : Les différentes intensités d'élevation de la température impactant la croissance d'*A. thaliana*. La température optimale de croissance d'*A. thaliana* est d'environ 21-22 °C. Plusieurs gammes de température peuvent conduire à différents niveaux de contrainte thermique : 1) une température ambiante chaude lors de l'application d'une température entre 22° et 28°C, 2) une haute température lors de l'application d'une température comprise entre 28°C et 37°C et 3) une très haute température lorsque celle-ci dépasse 37°C. (A partir de Liu et al., 2015; Li et al., 2018; Gil and Park, 2019).



Figure I.4.: Représentation du phénotype de thermomorphogénèse d'*A. thaliana* au stade plantule (A) et mature (B) à 28°C. A) élongation de l'hypocotyle à 28°C et hyponastie des pétioles et des feuilles favorisant la capacité de refroidissement des parties aériennes.

1.1.2.1. *Impact d'une augmentation modérée de la température sur les plantes*

L'effet d'une élévation de la température est bien caractérisé chez *A. thaliana*. La température optimale de croissance pour *A. thaliana* est estimée à 21-22°C (Li *et al.*, 2018a), mais *Arabidopsis* est capable de se développer sur une plage de températures comprises entre 16 et 28°C (Gil & Park, 2019). Ainsi, pour cette espèce : 1) une température ambiante chaude est une température comprise entre 22° et 28°C, 2) une température haute est une température entre 28°C et 37°C et enfin 3) une très haute température ou un stress thermique est une température qui dépasse 37°C (**Fig. I. 3.**) (Liu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018; Gil & Park, 2019). Ces différentes gammes de température peuvent conduire à différents niveaux de contrainte thermique chez *Arabidopsis*. En conditions contrôlées, l'application d'un stress thermique est relativement simple, la seule limite étant le contrôle de la température et de l'hygrométrie des infrastructures. En effet, une augmentation de la température entraîne une baisse de l'humidité relative de l'air, ce qui peut également avoir un impact sur la croissance des plantes (Awbery & Griffiths, 1932).

Une hausse de la température ambiante à 28°C correspond aux prédictions les plus plausibles du GIEC (IPCC, 2023). Cette température, supérieure de 5°C à la température optimale de croissance d'*A. thaliana* conduit à une modification de la morphologie d'*A. thaliana* appelée thermomorphogénèse (Erwin *et al.*, 1989) avec notamment une élongation de l'hypocotyle (Gray *et al.*, 1998; Koini *et al.*, 2009) (**Fig. I.4.A**), du pétiole (Nomoto *et al.*, 2012; Raschke *et al.*, 2015) et des racines (Hanzawa *et al.*, 2013). L'application de cette température entraîne également une croissance hyponastique, c'est-à-dire une modification de l'angle des pétioles permettant ainsi la régulation de la température au niveau des tissus foliaires (van Zanten *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2019) (**Fig. I.4.B**). L'augmentation de la température entraîne également une baisse de la densité stomatale au niveau des feuilles et une augmentation de la transpiration, probablement grâce à l'augmentation de l'espace entre les stomates et l'optimisation de la diffusion des gaz (Jin *et al.*, 2011; Crawford *et al.*, 2012). Le nombre de siliques et de graines sont significativement réduits (Ibañez *et al.*, 2017) et Jin *et al.*, (2011) rapportent un effet négatif d'une augmentation de 5°C sur la biomasse totale des plantes, le poids des graines et la croissance des feuilles.

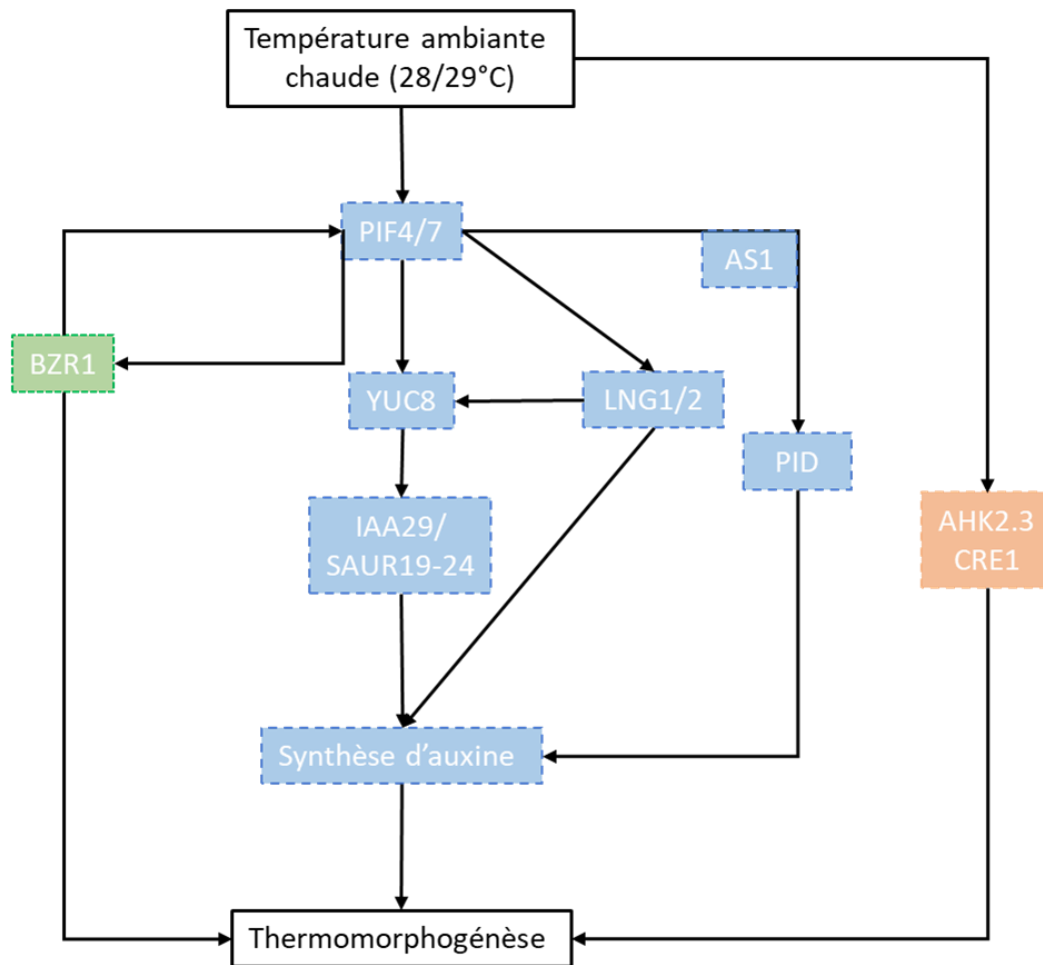


Figure I.5. : Implication des hormones lors de la thermomorphogénèse à 28/29°C chez *A. thaliana*. En bleu la voie de l'auxine : une augmentation de la température induit l'expression de *PIF4/7* conduisant à la synthèse et l'accumulation d'auxine par différentes voies de signalisation et l'élongation cellulaire. *BZR1* dans la voie des brassinostéroïdes (en vert) fait partie d'une boucle de rétrocontrôle positive du facteur *PIF4*. L'application de la température 28°C induit l'expression de gènes de la voie de signalisation des cytokinines avec notamment les récepteurs *AHK2.3* et *CRE1*. Adaptée de (Li *et al.*, 2021a).

Ces modifications morphologiques s'accompagnent d'une modulation de la balance hormonale de la plante (**Fig.I.5**). L'auxine, hormone impliquée dans le contrôle de la division cellulaire et l'expansion cellulaire (Spartz *et al.*, 2012), est accumulée lors de l'exposition des plantes à des températures de 28°C et 29°C. Ces températures entraînent l'expression de *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 7 et 4 (PIF4/7)*, du gène impliqué dans la biosynthèse de l'auxine *YUCCA8 (YUC8)* et d'autres facteurs impliqués dans la signalisation de la voie d'auxine *IAA29* et *SAUR19-24* ce qui conduit à l'élongation cellulaire et aux phénomènes de thermomorphogénèse décrits ci-dessus (Gray *et al.*, 1998; Franklin *et al.*, 2011; Spartz *et al.*, 2012; Sun *et al.*, 2012; Fiorucci *et al.*, 2020). De plus, *PIF4* coexprimé avec *ASYMMETRIC LEAVES (ASI)*, stimulent l'expression de *PINOID (PID)* ainsi que *LONGIFOLIA 1 (LNG1)* et *LONGIFOLIA2 (LNG2)* dans les parties abaxiales du pétiole ce qui entraîne l'accumulation d'auxine dans ces tissus, une élongation des cellules et un mouvement des feuilles vers le haut (Hwang *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2019). L'expression des transporteurs d'auxine *AUX1* et *EIR1* entraîne l'exportation d'auxine des racines vers les parties aériennes et permet de contrebalancer l'accumulation d'auxine dans les racines (Hanzawa *et al.*, 2013). La voie des brassinostéroïdes (BR), notamment du facteur de transcription *BRASSINAZOLE RESISTANT 1 (BZR 1)*, impliqué dans la signalisation des BR, est impliquée dans une boucle de rétrocontrôle positive de l'expression de *PIF4* et de gènes promouvant l'expansion cellulaire (Ibañez *et al.*, 2018). Les cytokinines (CK) participent également à l'élongation de l'hypocotyle lors de l'application d'une température de 29°C via notamment les récepteurs spécifiques de la voie des CK tels que *AHK2* et *3* ou *CRE1* (Černý *et al.*, 2014).

Certains travaux rapportent également l'expression de protéines impliquées dans la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS) tels que des catalases (CAT), des peroxydases ou des superoxydes dismutases (Jin *et al.*, 2011; Sriden & Charoensawan, 2022) lors de l'exposition d'*Arabidopsis* à des températures ambiantes chaudes (25/28°C). Ces températures altèrent le système photosynthétique via notamment la réduction du nombre de chloroplastes et de chlorophylle a (Jin *et al.*, 2011), l'expression des gènes *RBCL* et *RBCS1A* codant la sous-unité de la Rubisco n'étant altérée que lors de stress thermiques plus intenses (>30°) (Cavanagh *et al.*, 2023).

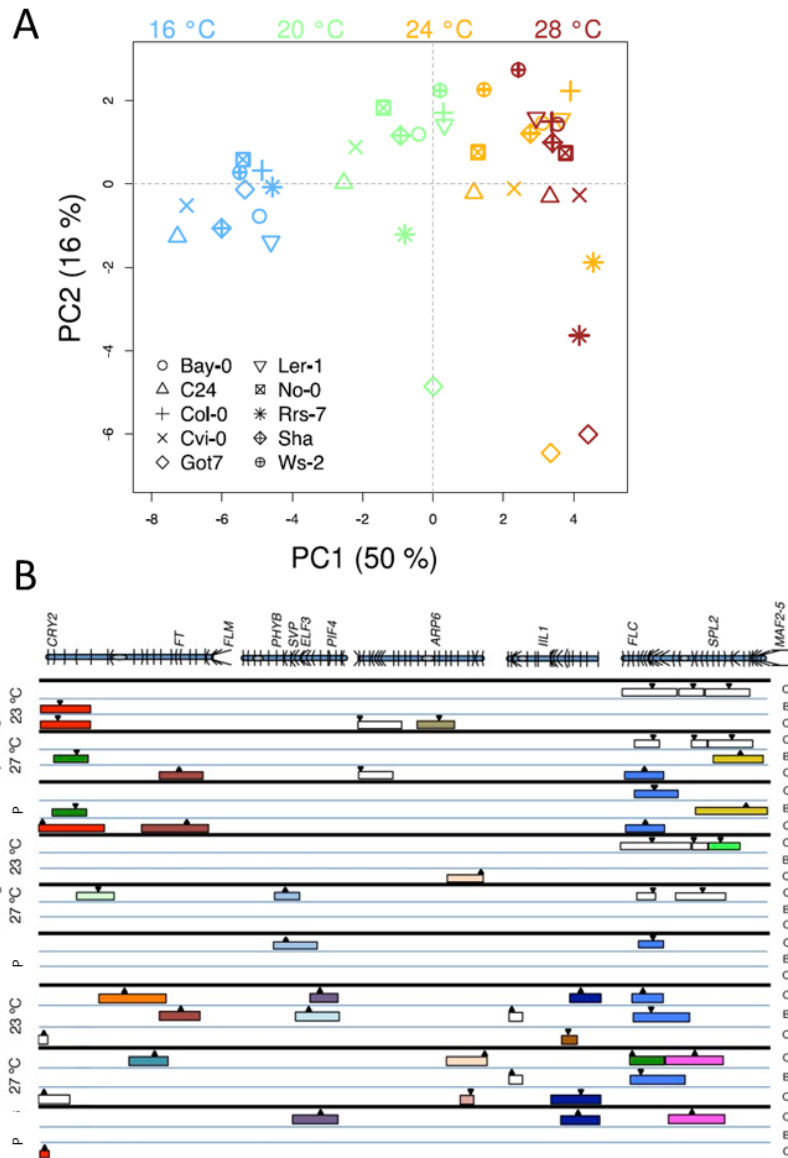


Figure I.6. : Effet du génotype sur la réponse d’*A. thaliana* à différentes températures. A) Analyse en composantes principales des effets génotype et température sur différents caractères mesurés chez *A. thaliana* dont notamment la taille de l’hypocotyle, la germination, la taille des plantes, la teneur en chlorophylle a et b pour un panel d’écotypes dont Col-0 (+), Bay-0 (o) ou Cvi-0 (x). B) Localisation des 53 QTL détectés sur trois populations RIL différentes. CT : Col-0 x Tsu-0, BS : Bay-0 x Sha et CC : Col-0 x Cvi-0 pour trois phénotypes : l’élargissement de l’hypocotyle, des racines ou le nombre de feuilles par rosette. Pour chaque phénotype, une détection de QTL a été réalisée sur les traits obtenus à 23°C, à 27°C ou sur l’estimation de la plasticité entre ces deux conditions (P). Les intervalles de confiance sont donnés par les boîtes colorées. Les QTL représentant potentiellement les mêmes loci sont ombrés dans la même couleur. Les positions des gènes connus pour être associés à la réponse à la température ambiante sont indiquées au-dessus des chromosomes. Figure adaptée de Ibañez et al., 2017 et Sanchez-Bermejo et al., 2015.

La réponse d'*A. thaliana* aux hausses modérées de la température est aussi dépendante du génotype (Ibañez *et al.*, 2017) (**Fig. I.6.A**). Une étude portant sur l'effet d'une température de 27°C sur la taille de l'hypocotyle, l'élongation des racines et le nombre de feuilles par rosette chez trois populations issues de trois croisements entre cinq génotypes différents d'*A. thaliana* (Tsu-0 x Col-0, Cvi-0 x Col-0 et Bay-0 x Sha) a montré que 44% de la variabilité observée dans la longueur de l'hypocotyle dépendait du génotype et 33% de la température (Sanchez-Bermejo *et al.*, 2015). L'analyse génétique de ces caractères réalisée dans deux conditions, à 23 °C et à 27 °C a permis la détection de 21 QTL à 23°C, 20 QTL à 27°C et 12 QTL contrôlant la plasticité (capacité des plantes à modifier leur phénotype en fonction des conditions) des différents traits (**Fig. I.6.B**).

1.1.2.2. *Impact d'un stress hydrique sur les plantes*

Les plantes peuvent subir un stress par déficit hydrique (sécheresse) ou par excès d'eau (saturation en eau), l'intensité du stress étant plus complexe à définir que pour d'autres stress abiotiques. Pour le déficit hydrique, l'intensité du stress appliqué peut être légère (« mild drought »), modérée (« moderate stress ») ou sévère (« severe drought ») (Marchin *et al.*, 2020) (**Fig. I.7**) mais les seuils de chaque catégorie restent flous. L'excès d'eau, plus communément appelé « inondation » peut en réalité être décomposée en deux types de stress : 1) un engorgement et 2) une inondation, elle-même subdivisée en submersion partielle ou submersion complète. L'engorgement consiste à ajouter de l'eau pour recouvrir la totalité du système racinaire tandis que les submersions partielle et complète sont caractérisées par le recouvrement partiel ou complet des parties aériennes (Striker, 2012) (**Fig. I.8**).

L'étude de l'effet d'un stress hydrique sur une plante est plus difficile à aborder que d'autres stress notamment du fait des méthodes d'application du stress. D'après Earl (2003), l'évaluation d'un stress hydrique doit comprendre 1) un maintien uniforme du contenu en eau dans le sol, 2) un contrôle précis des conditions hydriques appliquées, 3) l'application d'une gamme d'intensités du stress hydrique, et 4) l'évaluation de manière précise de l'impact du stress sur les plantes. L'application d'un déficit hydrique étant beaucoup plus complexe que celle d'un stress par excès d'eau (Munns *et al.*, 2010).

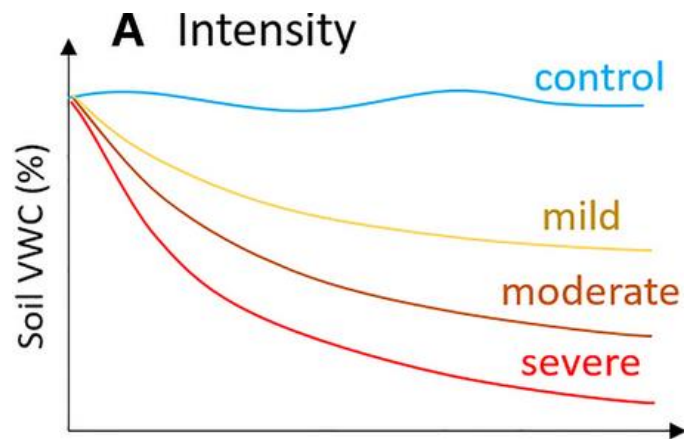


Figure I.7.: Les différentes intensités de déficit hydrique impactant la croissance des plantes. La quantité en eau du sol (soil Volumetric Water Content (VWC en %)) est réduite de 30% environ pour un stress léger par rapport au contrôle, de 50% pour un stress modéré et de 60 % pour un stress sévère (Marchina et al.,2020).

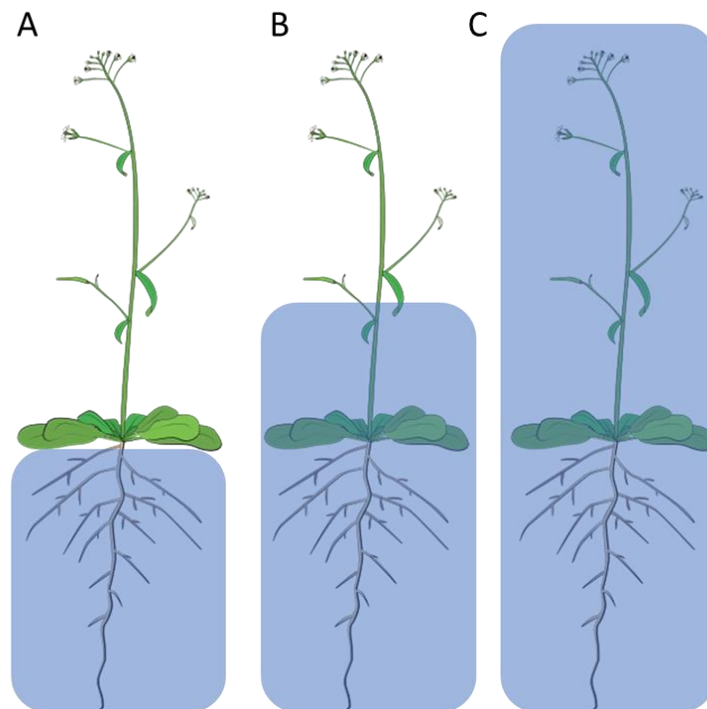


Figure I.8.: Les différentes intensités d'excès d'eau impactant la croissance des plantes. A) un engorgement durant lequel l'eau recouvre seulement les parties racinaires, B) une submersion des racines et d'une partie des parties aériennes et C) une submersion complète de la plante. Figure adaptée de Striker et al., 2012.

Parmi les méthodes d'application d'un déficit hydrique, l'application passive du stress via l'arrêt de l'arrosage entraînant l'évaporation de l'eau du substrat au fil du temps est la plus facile à mettre en œuvre, mais ne permet pas un contrôle précis ni une homogénéité du déficit hydrique (Poorter *et al.*, 2012). L'application de composés chimiques réduisant le potentiel hydrique du sol permet de façon indirecte d'étudier l'impact d'un déficit hydrique. Ainsi le polyéthylène glycol (PEG) a été largement utilisé bien qu'il entraîne des problèmes de circulation d'oxygène dans les racines causant, en plus d'un stress hydrique, un stress hypoxique (Mexal *et al.*, 1975). L'utilisation d'une solution riche en sel, NaCl, est également une façon de simuler l'impact d'un déficit hydrique (Munns *et al.*, 2010). La méthode la plus utilisée et qui regroupe une grande majorité des critères recherchés est l'automatisation de la pesée des pots afin d'en calculer la quantité en eau dans le sol au fil du temps et d'adapter ainsi les arrosages, ce qui demande une logistique importante (Earl, 2003). Le suivi des conditions hydriques, qu'elles soient un déficit ou un excès d'eau, peut être réalisé par la mesure du contenu volumétrique du sol (VWC ; %) qui correspond au pourcentage d'eau dans le sol (Marchin *et al.*, 2020) ou bien du potentiel hydrique du sol en mégapascal (MPa) (McKay *et al.*, 2008 ; Iwama *et al.*, 1991). Il est également possible d'évaluer le contenu relatif en eau du sol (relative soil water content, RSWC). La relation entre le potentiel hydrique et le contenu relatif en eau du sol dépend du type de sol évalué (Datta *et al.*, 2017).

Impact d'un déficit hydrique modéré sur les plantes

Le déficit hydrique a un impact sur la morphologie des plantes avec une réduction de leur croissance aérienne (Yao *et al.*, 2018) et une modulation de l'élongation racinaire selon l'intensité du stress : un stress modéré aura plutôt un effet positif sur la taille des racines alors qu'un stress plus sévère aura un effet négatif, chez *A. thaliana* (van der Weele *et al.*, 2000). Une sécheresse modérée entraîne également une baisse du niveau relatif d'eau dans les feuilles (Sperdouli & Moustakas, 2012), la modification des parois végétales (Clauw *et al.*, 2015), l'accumulation de cires sur les feuilles des plantes stressées (Aharoni *et al.*, 2004) et une baisse de rendement (Samarah *et al.*, 2009). Pour conserver l'eau et éviter la transpiration, les plantes ferment leurs stomates *via* notamment la voie de l'acide abscissique (ABA).

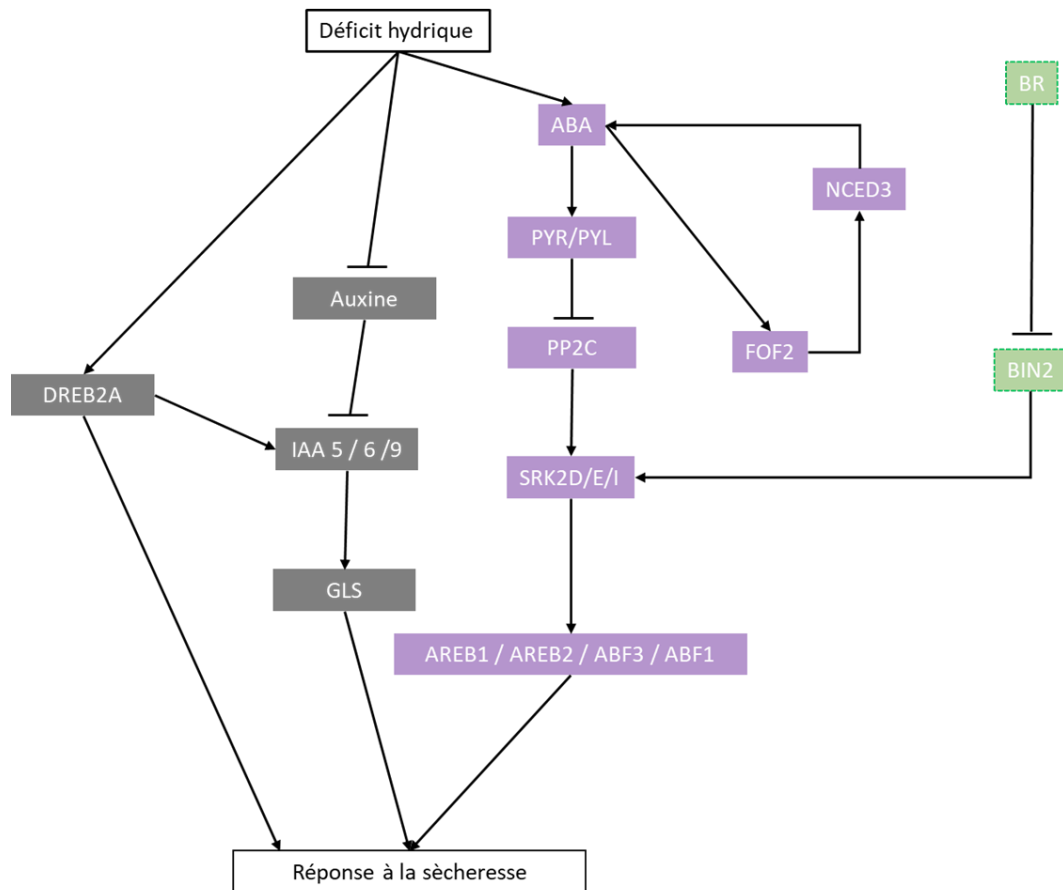


Figure I.9. : Implication des voies de signalisation ABA-dépendante (en violet) et ABA-indépendante (gris) dans la réponse d'*A. thaliana* à un déficit hydrique. En violet, la voie dépendante de l'acide abscissique (ABA) : Un déficit hydrique entraîne l'accumulation d'ABA et la mise en place d'une voie de rétrocontrôle positive de la biosynthèse d'ABA par l'action de *FOF2* et *NCDE3*. L'ABA se fixe sur les récepteurs PYR/PYL et réprime PP2C ce qui permet la phosphorylation de SKR2D/E/I et l'induction des facteurs de transcription AREB1, 2, ABF3 et 1. La protéine kinase BIN2, partie intégrante de la voie de signalisation des brassinostéroïdes (vert) est induite sous l'effet d'un déficit hydrique et permet la phosphorylation de SKR2. Au cours de la voie ABA-indépendante (gris), le stress hydrique réprime l'auxine et induit le facteur de transcription DREB2A entraînant l'expression des *IAA 5/6/9* et l'accumulation de glucosinolates. Toutes ces voies déclenchent la réponse des plantes à la sécheresse ce qui inclut la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) et d'espèces antioxydantes, de molécules osmoprotectrices et de sucres. Adapté d'après Park et al., 2009 ; Kim et al., 2004 ; Qu et al., 2020 ; Lee et al., 2021 ; Shani et al., 2017 et Salehin et al., 2019.

L'ABA est en effet accumulée dans les tissus lors d'un déficit hydrique intense, induisant une réponse des plantes au stress *via* une cascade de signalisation (**Fig. I.9.**), impliquant les récepteurs PYR/PYL, les protéines phosphate 2 PP2C et *SRK2D/E/I* (Park *et al.*, 2009) et de facteurs répondant à l'ABA tels que *AREB/AREB2/ABF1* et *ABF3* (Kim *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2005, 2009; Yoshida *et al.*, 2010, 2015). L'induction par l'ABA de la protéine F-box FOF2 permet une boucle de rétrocontrôle positif de la synthèse d'ABA *via* l'expression de *NCED3* (Qu *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2021). D'autres voies de signalisation hormonale sont également impliquées dans la réponse des plantes à la sécheresse. En effet, la protéine kinase BIN2, réprimée par les brassinostéroïdes, phosphoryle et active *SRK2* (**Fig. I.9.**). Un déficit hydrique supprime la réponse auxinique puisque les facteurs *DREB2A* induisent l'expression des facteurs sensibles à l'auxine *IAA5/6/9* de manière ABA-indépendant et entraîne une accumulation de glucosinolates au niveau des feuilles (Shani *et al.*, 2017; Salehin *et al.*, 2019) (**Fig. I.9.**).

La production d'isothiocyanates, de nitriles et de thiocyanates conduit à une oscillation de calcium (Ca^{2+}) ainsi que l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), représentatif d'un stress oxydatif provoquant des dégâts au niveau cellulaire (Niu *et al.*, 2013; Hossain *et al.*, 2022). L'induction d'oxyde nitrique (NO) et d'autres molécules à propriétés anti-oxydantes permettent le contrôle de l'effet des ROS (Hasanuzzaman *et al.*, 2020; Lau *et al.*, 2021). Un stress hydrique entraîne également la production de molécules à effet osmoprotectant, comme la proline, le raffinose ou le galactinol (Taji *et al.*, 2002; Urano *et al.*, 2009; Clauw *et al.*, 2015). Cette accumulation de sucres lors d'un déficit hydrique s'accompagne également d'une relocalisation des ressources de carbone au niveau des racines *via* notamment l'expression de transporteurs de sucres *AtSUC* et *AtSWEET* (Durand *et al.*, 2016).

D'autres stress entraînent des réponses similaires chez la plante à celle observée lors de déficit hydrique (stress osmotique et oxydatif), et notamment le stress salin, par ailleurs souvent amplifié par les périodes de sécheresse (Miller *et al.*, 2010; Zhuang *et al.*, 2021).

Impact d'un engorgement des racines sur les plantes

Un excès d'eau entraîne un manque d'oxygène au niveau des tissus touchés et donc une réponse hypoxique de la part de la plante (Steffens & Rasmussen, 2016; Pan *et al.*, 2021; Wang & Komatsu, 2022).

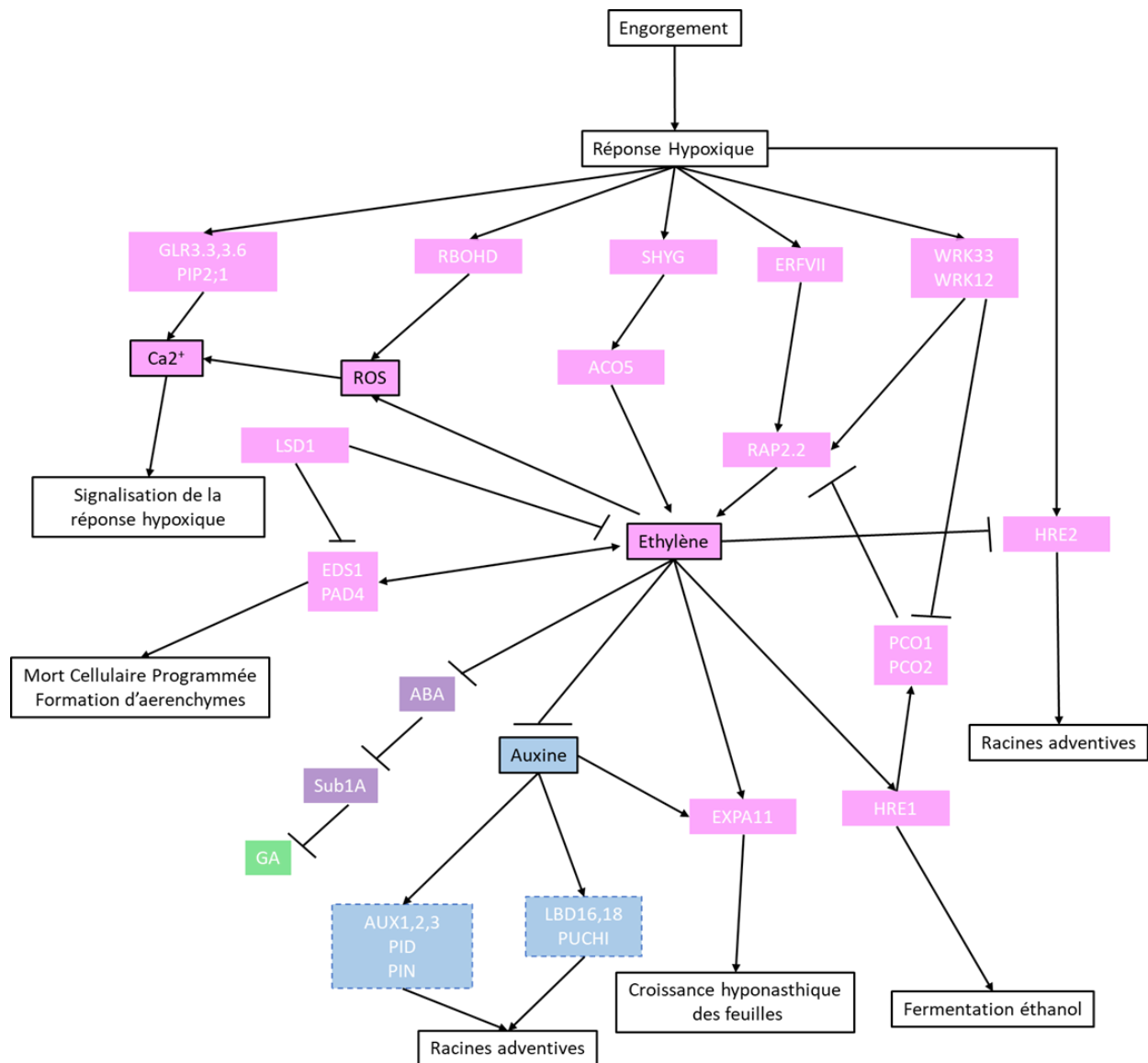


Figure I.10. : Implication de différentes voies de signalisation dans la réponse à un engorgement au niveau des racines. La réponse hypoxique entraîne l'accumulation d'éthylène, la mise en place de signaux calciques, la formation d'aerenchymes et module l'élongation de racines adventives, l'accumulation d'auxine, d'acide abscissique (ABA) et des gibbérellines (GA). La réponse hypoxique des plantes en condition d'engorgement est finement régulée par des boucles de rétrocontrôle positif ou négatif. En rose, les voies liées à l'éthylène, en bleu celles liées à l'auxine, en violet celles liées à l'ABA et en vert celles liées aux GA. Adapté d'après Rauf et al., 2013 ; Mühlenbock et al., 2007 ; Weits et al., 2014 ; Shukla et al., 2019 ; da Costa et al., 2020 ; Eysholdt-Derzsó and Sauter, 2017 ; Wang et al., 2021 ; Liu et al., 2017 ; Pelàez-Vico et al., 2023 ; Lu et al., 2017.

Cette contrainte entraîne une modification structurale dont une mort cellulaire programmée des tissus sous contrainte hypoxique et la formation d'aérenchymes qui permettent le transport de l'oxygène vers les tissus submergés et le transport du CO₂ vers les tissus non submergés (Yamauchi *et al.*, 2017). Chez certaines plantes, dont *Brassica napus*, la présence d'un film gazeux au niveau des tissus hydrophobes submergés, par exemple les racines, permet également une optimisation des échanges gazeux (Winkel *et al.*, 2016; Kurokawa *et al.*, 2018). Une saturation en eau peut entraîner une altération du système photosynthétique, comme montré chez *Helianthus tuberosus* ou chez *A. thaliana* (Hsu *et al.*, 2011; Yan *et al.*, 2018). Chez *A. thaliana*, l'engorgement des racines entraîne une croissance hyponastique des feuilles, c'est-à-dire une modification de l'angle des pétioles afin d'assurer une bonne captation de l'oxygène (Rauf *et al.*, 2013). D'autres modifications morphologiques, telles que la formation de racines adventives au niveau de l'hypocotyle, peuvent être observées en fonction des espèces et des génotypes (Steffens & Rasmussen, 2016; Qi *et al.*, 2020) suggérant l'existence de différents mécanismes de tolérance au sein du règne végétal (Vashisht *et al.*, 2011; Eysholdt-Derzsó & Sauter, 2019).

L'hormone principale impliquée dans la réponse des plantes à une saturation hydrique est l'éthylène (**Fig. I.10.**). Lorsque la concentration en oxygène est faible, les facteurs de transcription *WRK33* et *WRK12* entraînent la libération de la protéine RAP2 (membre des facteurs de transcription *ERFVII*) de la membrane plasmique vers le noyau déclenchant l'expression de gènes impliqués dans la réponse hypoxique, avec notamment des gènes de biosynthèse de l'éthylène (Hinz *et al.*, 2010; Licausi *et al.*, 2011) tels que l'*ACC oxydase 5 (ACO5)* positivement régulé par *SPEEDY HYPONASTIC GROWTH (SHYG)* (Rauf *et al.*, 2013). L'éthylène est également impliqué dans une boucle de rétrocontrôle positif avec *EDS1/ PAD4* pour la formation d'aérenchymes dans les racines en conditions d'hypoxie (Mühlenbock *et al.*, 2007). L'homéostasie de l'éthylène est finement régulée par les *plant cysteine oxidases PCO1/PCO2* et *LESION SIMULATING DISEASE (LSD1)* qui contrôlent négativement l'expression de *RAP2.2* et l'accumulation de l'éthylène (Weits *et al.*, 2014). La voie de l'éthylène croise celle de l'auxine via l'induction de l'*EXPANSIN 11 (EXP11)* qui permet l'élongation cellulaire et la croissance hyponastique (Rauf *et al.*, 2013). Chez *A. thaliana*, l'éthylène réprime le gène *HRE2* ainsi que l'accumulation de l'auxine et l'expression de gènes répondant à l'auxine tels que *AUX1,2,3* ou *PID, PIN, LBD16, 18* et *PUCI*, impliqués dans le développement de racines adventives (Shukla *et al.*, 2019; da Costa *et al.*, 2020).

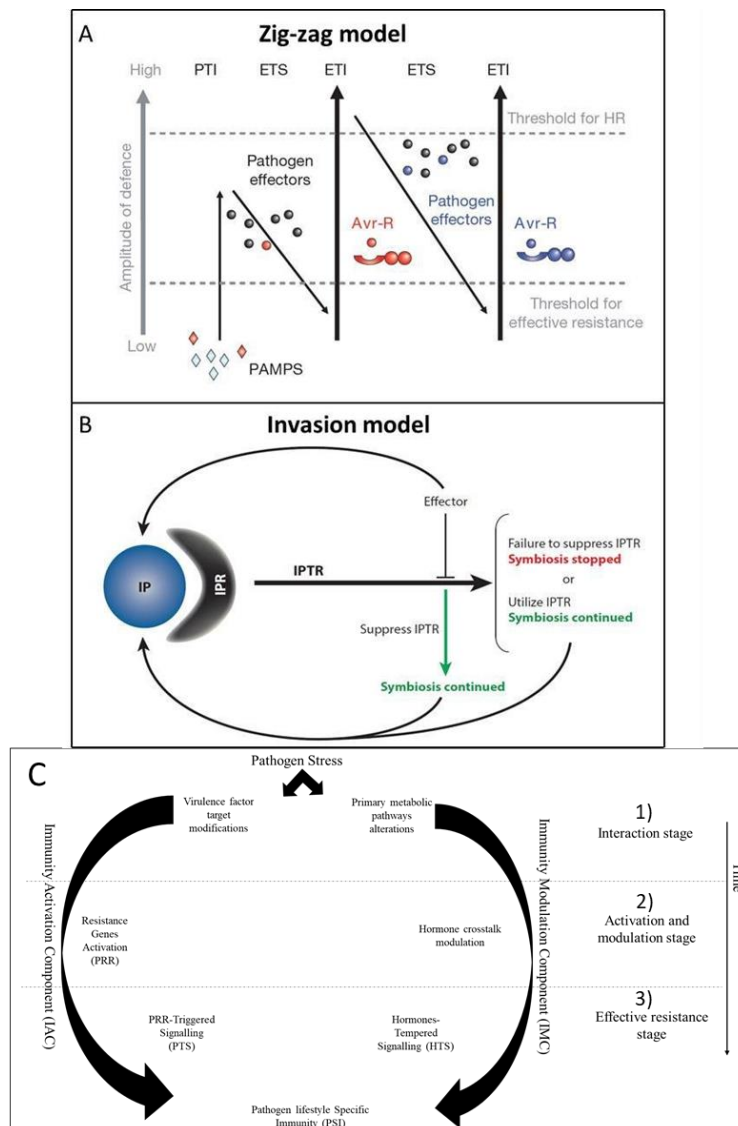


Figure I.11. : Comparaison des modèles A) Zig-Zag de Jones et Dangl (2006), B) invasion de Cook et al., 2015 et C) circulaire d'Andolfo and Ercolano (2015). A) Pendant la première phase d'infection, les plantes détectent les motifs moléculaires associés aux agents pathogènes et microbes (MAMP, pour *microbe associated molecular pattern*, de PAMP pour *pathogen associated molecular pattern*, diamants rouges) par l'intermédiaire des PRR (*pattern recognition receptors*). Cette reconnaissance conduit à la mise en place de la PAMP-triggered immunity (ou PTI). Lors de la seconde phase, les agents pathogènes sécrètent des effecteurs qui interfèrent avec la PTI pouvant ainsi se développer et entraînant la réponse de *effector triggered susceptibility* (ETS). En phase 3, les plantes produisent des protéines NB-LRR reconnaissant les effecteurs (rond en rouge) activant une réponse d'*effector triggered immunity* (ETI) conduisant à l'induction de la mort cellulaire programmée et donc la réponse hypersensible

(HR). B) Lors d'une tentative de symbiose, les profils d'invasion (IP, *invasion pattern*) sont perçus par les récepteurs IP des plantes (IPR, IP receptor), induisant une réponse déclenchée par IP (IPTR, *IP triggered response*). Les envahisseurs peuvent utiliser des effecteurs pour influencer l'interaction, mais si l'envahisseur ne parvient pas à manipuler l'IPTR, la symbiose s'arrête. L'IPTR peut être supprimée (par exemple par les biotrophes) ou utilisée (par exemple par les nécrotrophes) pour poursuivre la symbiose. La symbiose continue et l'utilisation des effecteurs peut générer des IP perceptibles par l'hôte, conduisant à un IPTR continu. Collectivement, de multiples événements de reconnaissance et stratégies d'envahisseurs influencent l'IPTR et aboutissent finalement à la fin ou à la poursuite de la symbiose. C) Le mécanisme de résistance des plantes lors d'une interaction incompatible peut être divisé en trois phases : (1) l'interaction, (2) l'activation/modulation et (3) la résistance effective (immunité). Pendant la phase d'interaction, deux effets principaux sont détectés : (A) des modifications des cibles des facteurs de virulence et (B) des altérations spécifiques du métabolisme primaire de la plante. Dans la phase d'activation : les modifications des cibles des facteurs de virulence induisent la signalisation déclenchée par les PRR (PTS), médiées par l'activation des gènes R. Ces altérations métaboliques induisent une régulation rétroactive des voies métaboliques primaires, entraînant une Résistance Tempérée par les Hormones (HTR). Dans la phase de résistance effective, le PTS et le HTR convergent pour conférer une résistance spécifique au mode de vie de l'agent pathogène (Résistance Spécifique au Mode de Vie du Pathogène, PSR). Adapté de (Jones & Dangl, 2006; Andolfo & Ercolano, 2015; Cook *et al.*, 2015).

Les facteurs répondant à l'éthylène, *ERFVII*s, répriment les canaux d'efflux d'auxine *PIN2* et participent à la balance hormonale lors de la réponse hypoxique (Eysholdt-Derzsó & Sauter, 2017). L'*ABA* est également négativement régulé par l'éthylène, induisant la surexpression de *SUBMERGENCE1A* (*Sub1A*) et la répression de la production de gibbérellines (GA) (Wang *et al.*, 2021b).

La réponse hypoxique entraîne l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) via l'induction de *RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOGS D* et *E* (*RBOHD*) et de l'alcool déshydrogénase 1 (*ADH1*) (Liu *et al.*, 2017). Des vagues d'ions calcium (Ca^{2+}) induites par l'accumulation de ROS et l'expression de *GLUTAMATE-LIKE RECEPTOR GLR3.3,3.6* et *PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN2, 1* (*PIP2,1*) participent à la signalisation de la réponse hypoxique et au déclenchement de la réponse des plantes à une saturation hydrique (Liu *et al.*, 2017; Peláez-Vico *et al.*, 2023). De plus, l'hypoxie racinaire entraîne une modulation du métabolisme carboné avec une dégradation de l'amidon et du sucrose dans les parties aériennes des plantes ainsi que l'induction de gènes codant des transporteurs de sucres (Hsu *et al.*, 2011; van Veen *et al.*, 2016). Durant l'hypoxie, les plantes induisent des processus fermentaires pour la production d'énergie à travers notamment l'expression de *PDC1* (*PYRUVATE DECARBOXYLASE 1*) (Liu *et al.*, 2017) et *PDC2* (Luo *et al.*, 2017, p. 2).

1.2. Réponse des plantes aux stress biotiques

1.2.1. Concepts et définitions de la réponse des plantes aux organismes pathogènes

L'immunité des plantes repose sur la capacité de chaque cellule à mettre en place une défense localisée. Il existe plusieurs types de résistance chez les plantes : la résistance « hôte » et la résistance « non-hôte ». La résistance est dite « hôte » lorsque l'agent pathogène peut infecter certains génotypes de l'hôte mais pas d'autres qui sont alors résistants. La résistance non-hôte est définie comme « la capacité de tous les génotypes d'une espèce végétale à présenter une résistance à tous les génotypes d'une espèce pathogène » (Mysore & Ryu, 2004; Panstruga & Moscou, 2020). Plusieurs modèles ont été proposés pour expliquer la réponse des plantes aux stress biotiques : le modèle Zig-Zag proposé par Jones & Dangl (2006) (**Fig. I.11.A**), le modèle d'invasion proposé par Cook *et al.* (2015) (**Fig. I.11.B**) et le modèle circulaire par Andolfo & Ercolano, (2015) (**Fig. I.11.C**).

Le modèle Zig-Zag

Jones & Dangl (2006) ont conceptualisé le système immunitaire des plantes en deux niveaux distincts basés sur les capacités des plantes et des agents pathogènes à améliorer leur processus de défense ou d'infection, respectivement. Le premier niveau de ce système consiste en la reconnaissance des molécules communes à de nombreuses classes de microbes, pathogènes comme non-pathogènes tandis que le deuxième niveau correspond à la reconnaissance spécifique des agents pathogènes via la reconnaissance de leurs effecteurs. Les récepteurs transmembranaires PRR pour *pattern recognition receptors* détectent la présence de MAMP, pour *microbe associated molecular pattern*, de PAMP pour *pathogen associated molecular pattern* ou de DAMP pour *damage associated molecular pattern* et déclenchent une réponse d'immunité appelée PTI ou *PAMP-triggered immunity*. Les agents pathogènes, *via* la sécrétion d'effecteurs, sont en mesure de détourner les défenses basales de la plante via l'altération de la PTI ce qui déclenche une réponse ETS ou *effector triggered susceptibility*. La reconnaissance des effecteurs par des gènes de résistance (gènes R) chez les plantes entraîne une ETI ou *effector triggered immunity* et un contournement de cette reconnaissance conduit à une perte de résistance. Les mécanismes moléculaires de résistances sont détaillés dans le **paragraphe 1.2.2**.

Alternatives au modèle Zig-Zag

En 2015, Cook *et al.* ont proposé le modèle d'invasion comme alternative au modèle Zig-Zag. Les auteurs soulignent les limitations du modèle Zig-Zag par rapport à la distinction des phases ETI et PTI, et à son application réduite principalement aux agents pathogènes biotrophes (Pritchard & Birch, 2014). Le modèle d'invasion offre une approche moins restrictive, tant du point de vue des réponses que de leur temporalité. Dans le modèle d'invasion, la surveillance de la plante et la reconnaissance de molécules extérieures, appelées ligands jouent un rôle central. Ces ligands correspondent à des motifs d'invasion (IP) qui sont reconnus par des récepteurs IP de la plante (IPRs). Cette interaction déclenche une réponse que les auteurs appellent une réponse déclenchée par les motifs d'invasion (IPTR, pour IP-triggered response). Le modèle d'invasion présente la réponse immunitaire de la plante comme un continuum, soulignant ainsi la diversité des réponses possibles en fonction des stimuli et des contextes.

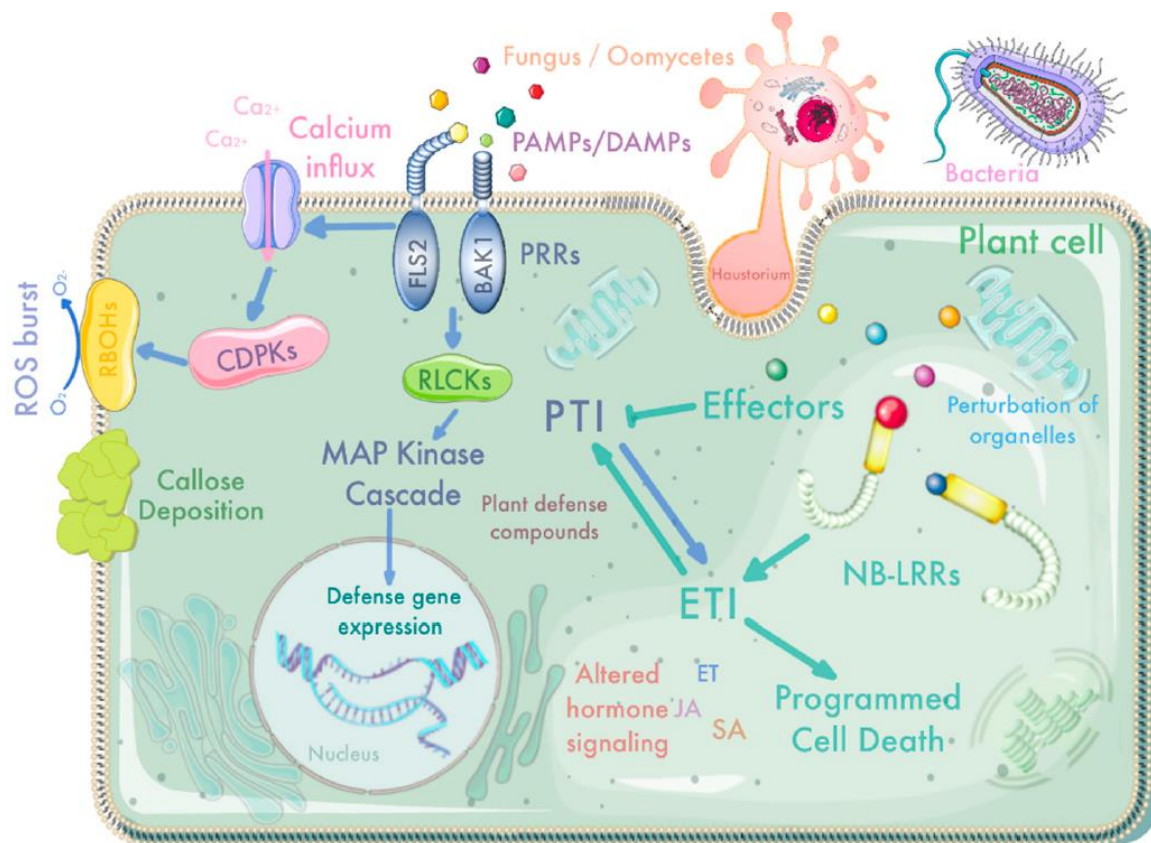


Figure I.12. : Représentation du système immunitaire des plantes en deux couches : la PTI (PAMP-triggered immunity) et l'ETI (effecteur triggered immunity). La PTI est déclenchée par la reconnaissance de PAMPs/MAMPs/DAMPs par les PRR (*pattern recognition receptors*) (par exemple FLS2) avec le recrutement de co-récepteurs (par exemple BAK1). Cette interaction entraîne la phosphorylation des RLCK (receptor like cytoplasmic kinase) et déclenche des phosphorylations en cascade aboutissant à l'expression de gènes de défense. La reconnaissance des PAMPs/MAMPs/DAMPs entraîne également la création de canaux calciques, déclenche un burst oxydatif et un dépôt de callose. Figure de Zhang et al., 2022.

En 2015, Andolfo & Ercolano (2015) proposent un modèle qui puisse s'adapter au maximum d'interactions possibles : le modèle à multiple composantes ou modèle circulaire. Ce modèle peut être divisé en trois phases : (1) interaction, (2) activation/modulation et (3) résistance effective (immunité). Au cours de la phase d'interaction, deux effets principaux sont détectés : (A) des modifications des cibles des facteurs de virulence et (B) des altérations spécifiques du métabolisme primaire de la plante (Ávila Méndez & Romero, 2017).

Cependant, malgré la conceptualisation de nouveaux modèles, le modèle Zig-Zag de Jones & Dangl (2006) est aujourd'hui le modèle d'interaction plante-agent pathogène le plus accepté et reconnu (Zhang *et al.*, 2022a).

1.2.2. Mécanismes de l'immunité végétale selon le modèle Zig-Zag

La première couche de défense, la MTI (MAMP-triggered immunity) est la réponse primaire d'immunité innée basée sur la reconnaissance d'éliciteurs très conservés (ou MAMP, DAMP et PAMP) (Janeway Jr. & Medzhitov, 1998) par les récepteurs transmembranaires PRR (**Fig. I.12.**). Ces PRR possèdent un domaine extracellulaire de fixation des ligands et un domaine intracellulaire possédant une activité kinase (Macho & Zipfel, 2014) et sont généralement des récepteurs de type receptor like kinase (RLKs) ou des receptor like proteins (RLPs) (Boutrot & Zipfel, 2017). Lorsque les PRR reconnaissent un ligand, ils recrutent un co-récepteur, permettant la phosphorylation et l'activation des receptor like cytoplasmic kinase (RCLKs) (Chinchilla *et al.*, 2007; Lu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010; Sun *et al.*, 2013). Suite à des phosphorylations successives des protéines kinases MAPK (Bi *et al.*, 2018) et l'activation des gènes de la PTI il y a une accumulation de certaines hormones telles que l'acide jasmonique (JA), l'acide salicylique (SA) ou l'éthylène (ET) (Meng *et al.*, 2013; Lal *et al.*, 2018), la déposition de callose et un « burst » oxydatif via l'expression de *RBOHD* et l'accumulation de ROS (Sreekanta *et al.*, 2015). L'activation des RCLKs entraîne également la phosphorylation et l'activation de *calcium-dependent protein kinases* (CDPKs) entraînant la formation des canaux transporteurs d'ion calcium (Ca^{2+}) (Tian *et al.*, 2019), ion impliqué dans la signalisation cellulaire de nombreux processus physiologiques (Clapham, 2007).

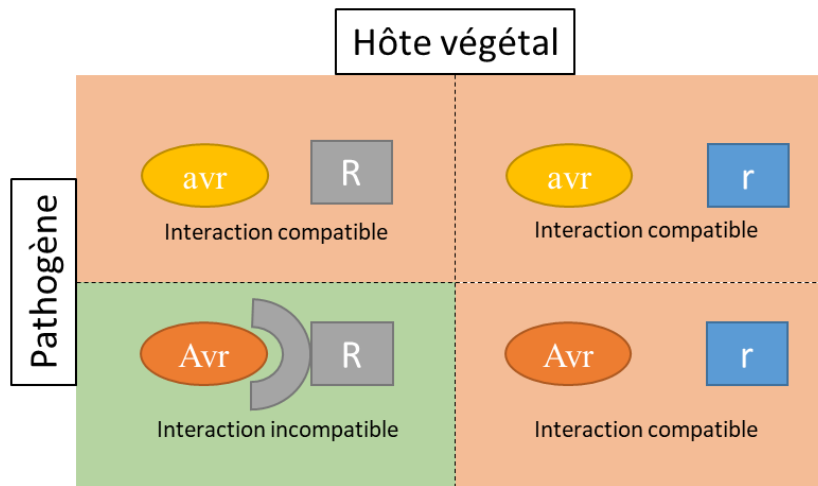


Figure I.13. : Modèle d'interaction gène pour gène décrit par Flor et al. (1971). Une interaction compatible suppose la non reconnaissance de la protéine d'avirulence *Avr* par le récepteur de résistance codé par le gène *R* et déclenche une ETS (*effector triggered susceptibility*) (orange). Une interaction incompatible entre l'hôte et le pathogène suppose une reconnaissance de la protéine d'avirulence *Avr* par le récepteur codé par le gène de résistance de la plante, *R* et déclenche une ETI (*effector triggered immunity*) (Vert).

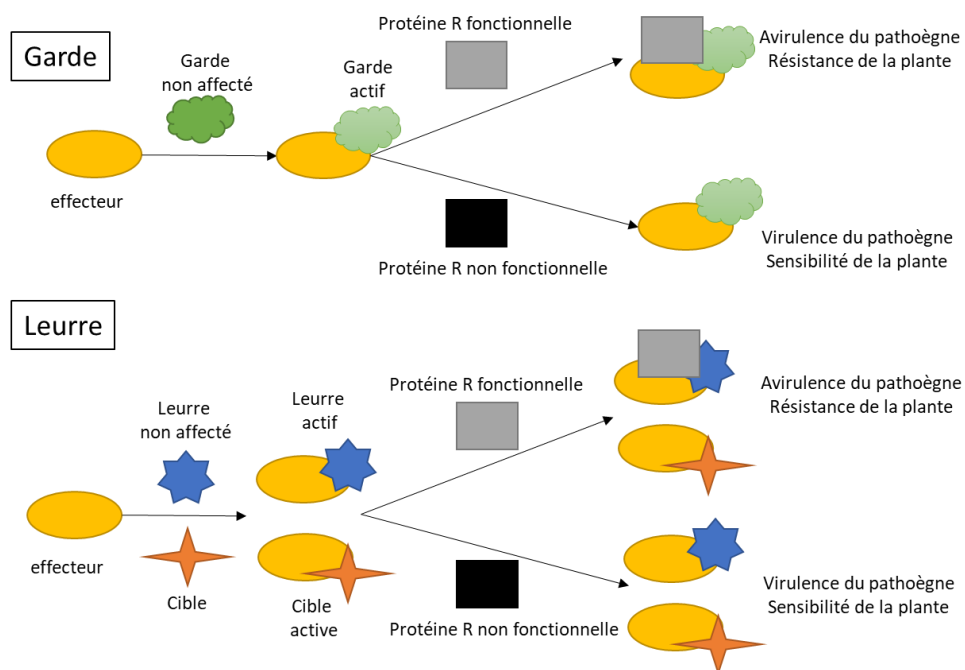


Figure I.14. : Mode d'action des protéines R codées par les gènes de résistance R. Les protéines R peuvent reconnaître des "protéines de garde" dont la conformation est modifiée lorsqu'elles sont liées à des effecteurs, déclenchant ainsi les défenses de la plante. Les protéines R peuvent également reconnaître des "protéines leurres" ou "protéines decoy". Dans ce cas, la plante produit une protéine leurre qui ressemble à la protéine cible de l'effecteur pathogénique. Lorsque l'effecteur se lie à cette protéine leurre, il provoque un changement de conformation qui est détecté par la protéine R et déclenche une réponse résistance (Adaptée de Głowacki et al., 2010).

Les agents pathogènes sont cependant en mesure de contrer cette première couche de défense grâce à la sécrétion d'effecteurs à l'intérieur des cellules végétales par des mécanismes de sécrétion, notamment des types III et IV (Baker *et al.*, 1997). Les effecteurs sont des protéines et petites molécules qui altèrent la structure et la fonction de la cellule hôte et permettent la colonisation par l'agent pathogène (Horbach *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2022a). Les effecteurs sont reconnus par des récepteurs intracellulaires de l'hôte, de type Nucleotide Binding Domain Leucine Rich Repeat (NBS-LRR ou NLR). L'interaction NLR-Effecteur repose sur le principe d'interaction gène pour gène (Flor, 1956) et par conséquent sur la présence d'un gène de résistance (*R*) chez la plante et d'un gène d'avirulence (*Avr*) chez l'agent pathogène (**Fig. I.13.**). Une interaction compatible suppose la non reconnaissance du gène d'avirulence *Avr* par le gène de résistance *R* et déclenche une ETS. Une interaction incompatible entre l'hôte et l'agent pathogène suppose une reconnaissance du gène d'avirulence *Avr* par le gène de résistance *R* de la plante et déclenche une ETI.

Les protéines R sont des récepteurs intracellulaires qui présentent pour la plupart un site central de liaison à l'ADN (nucleotide binding site : NBS) (Kourelis & van der Hoorn, 2018), une région en C-terminal riche en leucines (LRR) et un domaine en N-terminal qui peut être soit un domaine TIR pour toll/interleukin-1 récepteur (TNL) (Pan *et al.*, 2000), soit un domaine coiled-coil (CNL) (Collier *et al.*, 2011) ou un domaine resistance to powdery mildew 8 (RPW8) (Liu *et al.*, 2023). Il existe une diversité des gènes de résistance, source de réservoir pour la reconnaissance des souches futures des agents pathogènes (Jones *et al.*, 2016; Monteiro & Nishimura, 2018; Barragan & Weigel, 2021). L'interaction NLR-effecteur met en place une réponse de défense de manière plus intense mais moins rapide que la PTI, souvent caractérisée par une réponse hypersensible (HR), c'est-à-dire la mort cellulaire programmée de la zone infectée, afin de limiter l'infection (Levine *et al.*, 1994). Cette HR est notamment causée par un burst oxydatif, une signalisation calcique et une cascade de signalisation des MAPK (Grant *et al.*, 2000; Su *et al.*, 2018; Yoshioka *et al.*, 2023). Les protéines R peuvent reconnaître des "protéines de garde" dont la conformation est modifiée lorsqu'elles sont liées à des effecteurs, déclenchant ainsi les défenses de la plante. Les protéines R peuvent également reconnaître des "protéines leurres". Dans ce cas, la plante produit une protéine leurre qui ressemble à la protéine cible de l'effecteur pathogène. La liaison de l'effecteur à cette protéine leurre provoque un changement de conformation de la protéine leurre détectée par la protéine R, initiant le déclenchement de la réponse de résistance (Głowacki *et al.*, 2010) (**Fig. I.14.**).

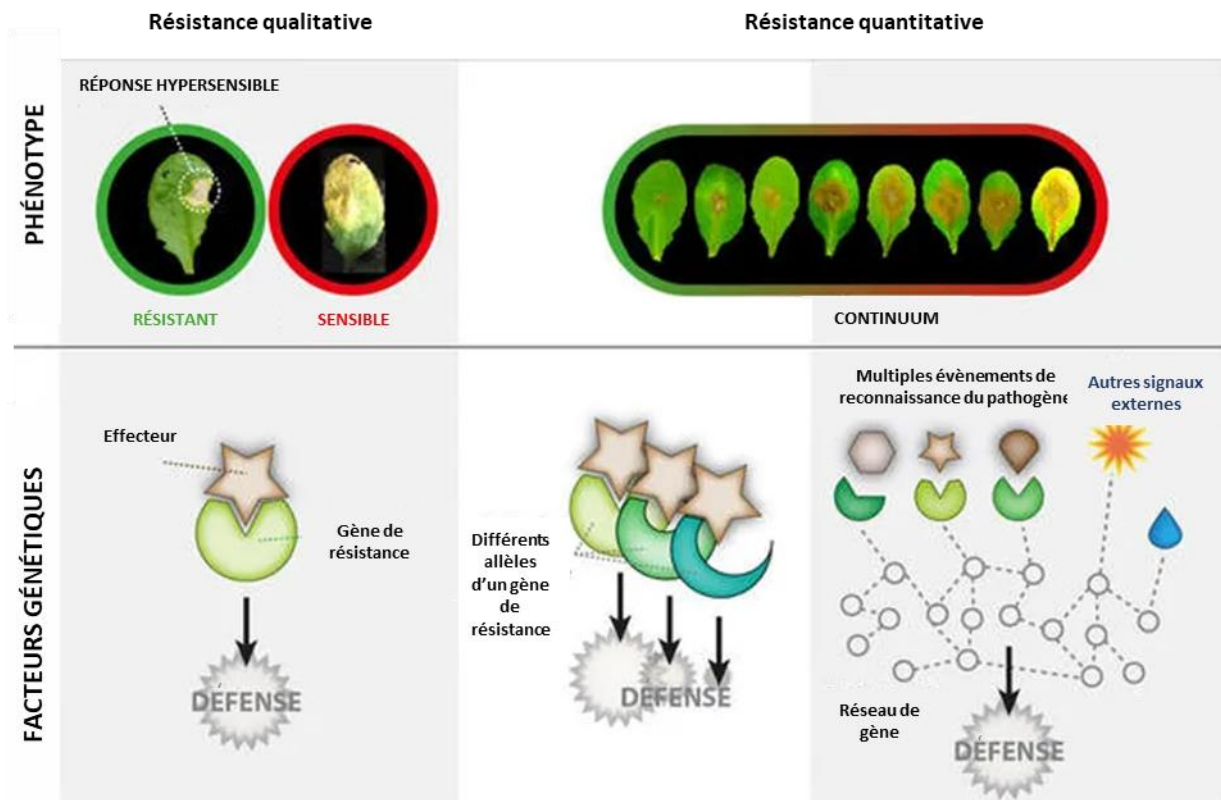


Figure I.15. : Phénotype et contrôle génétique des résistances qualitative et quantitative.

La résistance qualitative est basée sur l'interaction gène pour gène entre un effecteur de l'agent pathogène et un gène de résistance de la plante hôte. Elle est caractérisée par une distribution bimodale du phénotype de résistance au sein d'une population. La résistance quantitative sous contrôle polygénique est caractérisée par un phénotype de résistance continue au sein d'une population. (Figure de Lannou et al., 2021).

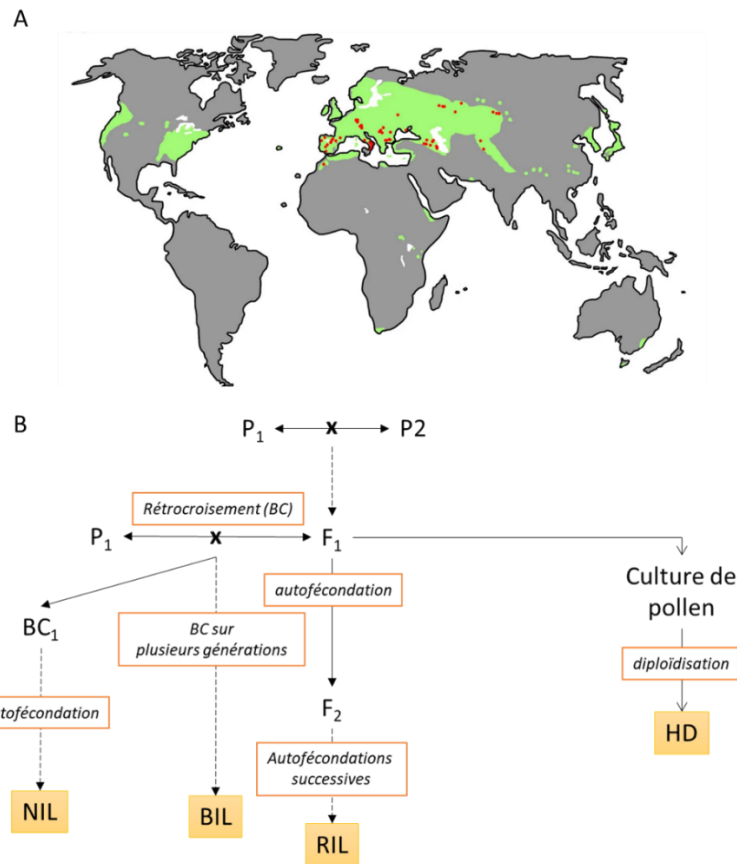
Le modèle Zig-Zag proposé par Jones & Dangl (2006) conceptualise donc le système immunitaire végétal en deux réponses distinctes. Certaines études rapportent cependant des réponses similaires entre l'ETI et la PTI, notamment au niveau transcriptomique (Navarro *et al.*, 2004) ou bien à travers la production de ROS déclenchée par l'expression des gènes *RBOHD* durant l'ETI et la phosphorylation des protéines RBODH par les PRR (Yuan *et al.*, 2021; Ngou *et al.*, 2021). Certains PRR, comme BIK1 sont indispensables pour la mise en place du burst oxydatif (Yuan *et al.*, 2021) ou la mise en place de la HR (Ngou *et al.*, 2021). De plus, certains RLCK impliqués dans la PTI ont également été montrés comme étant des protéines leurres impliquées dans l'ETI (Bastedo *et al.*, 2019).

1.2.3. La résistance qualitative et quantitative des plantes aux agents pathogènes

Les protéines R et la relation « gène pour gène » posent les bases de la résistance qualitative durant laquelle un gène majeur contrôle la résistance (une résistance quasi complète) à une souche spécifique (ou un ensemble de souches) de l'agent pathogène. Cette résistance qualitative se traduit, dans une population, par une distribution bimodale des phénotypes de résistance (phénotype résistant et phénotype sensible) (**Fig. I.15**). La résistance qualitative présente toutefois des limites puisqu'elle impose des fortes pressions de sélection sur les populations pathogènes et conduit à des contournements de résistances récurrent.

La résistance quantitative est sous contrôle multigénique et confère à la population, en fonction des allèles de chaque gène considéré, des phénotypes montrant un continuum entre une résistance complète et une sensibilité complète (**Fig. I.15**). La résistance quantitative entraîne une réduction de la maladie plutôt que l'absence complète de symptômes. La résistance contrôlée par plusieurs gènes est également considérée comme une résistance plus durable puisqu'elle est partielle et apporte ainsi une pression moindre sur les communautés des populations pathogènes, comparée à une résistance qualitative (St.Clair, 2010; Pilet-Nayel *et al.*, 2017). En outre, la résistance quantitative est plus efficace contre les agents pathogènes nécrotrophes et hémibiotrophes, puisqu'elle n'implique pas de réaction hypersensible pouvant être détournée par ces agents pathogènes et confère ainsi une résistance partielle à une gamme plus large de microorganismes (French *et al.*, 2016). La résistance quantitative joue ainsi un rôle essentiel dans les stratégies de déploiement des résistances afin de limiter leur contournement et augmenter la durabilité de la résistance.

Encadré I. 1. : Utilisation de populations naturelles ou artificielles pour l'identification de régions génomiques contrôlant des traits complexes ou QTL (Quantitative Trait Locus).



A) Utilisation de populations naturelles pour l'identification de régions génomiques contrôlant un caractère d'intérêt *via* la réalisation d'analyses d'associations ou GWAS pour *GENOME WIDE ASSOCIATION STUDIES*. B) Création de populations en ségrégation, artificielles, pour l'identification de régions génomiques contrôlant un caractère d'intérêt *via* les analyses de liaison. La génération F₁ issue du croisement entre le parent P₁ et le parent P₂ peut être autofécondée sur plusieurs générations pour produire une population de lignées recombinantes (*Recombinant Inbred Lines*, RIL). Le pollen des plantes de la génération F₁ peut également être utilisé en culture *in vitro* pour régénérer des plantes haploïdes. Le doublement chromosomique permet ensuite de produire des lignées dites haploïdes doublées (*doubled haploid*, HD). La génération F₁ peut être rétrocroisée (*backcross*, BC) avec l'un de ses parents pour donner la génération BC₁. L'autofécondation de la BC₁ sur plusieurs générations permet la production d'une population de lignées quasi-isogéniques (c'est-à-dire identiques au niveau génétique sauf au niveau de quelques loci) (*Near Isogenic Lines*, NIL). La génération BC₁ peut être rétrocroisée avec l'un de ses parents sur plusieurs générations ou aboutir à la formation d'une population rétrocroisée recombinante (*Backcrossed inbred lines*, BIL). Si les populations F₂ ou BC₁ peuvent être utilisées rapidement pour la cartographie de gènes contrôlant des traits complexes, l'avantage des populations NIL, BIL, RIL et HD est qu'elles sont fixées dans le temps (homozygotes pour une majorité des loci) et peuvent être maintenues *via* l'autofécondation. L'utilisation de ces populations naturelles ou artificielles permet des études d'associations ou de liaison génétique. Ces analyses ont pour but d'identifier des régions génomiques (ou *quantitative trait locus*, **QTL**) contribuant de manière significative à la variation d'un trait particulier au sein d'une population.

La durabilité de la résistance peut être augmentée notamment en pyramidant des gènes *R* et des QTL (*quantitative trait loci*) de résistance dans différents tissus (Roux *et al.*, 2014; Kushalappa *et al.*, 2016; Pilet-Nayel *et al.*, 2017). L'hypothèse sous-jacente est que les mécanismes moléculaires associées aux gènes *R* et aux QTL sont différents et putativement complémentaires.

Plusieurs hypothèses ont été émises quant aux mécanismes contrôlés par les gènes sous-jacents aux QTL de résistance : 1) les gènes causaux aux QTL ont des fonctions de défense basale ou dans la transduction des signaux de défense, 2) les gènes causaux aux QTL sont des gènes *R* altérés ou 3) des gènes impliqués dans le développement de la plante (Poland *et al.*, 2009; Roux *et al.*, 2014). L'effet à large spectre de certains QTL pourrait suggérer un rôle des gènes causaux dans la perception des PAMPs ou des effecteurs (Roux *et al.*, 2014). La diversité des fonctions des gènes sous-jacents pourrait suggérer que ces QTL agissent à différents stades de l'infection, comme démontré dans l'interaction maïs/*Setosphaeria turcica* (Chung *et al.*, 2010). Des analyses de liaison ou d'association (GWAS pour *GENOME WIDE Association STUDIES*) ont identifié des régions génomiques contrôlant la résistance à des organismes pathogènes au sein de populations artificielles (**Encadré I.1.**) ou naturelles (St.Clair, 2010). Sur les nombreux QTL de résistance identifiés, peu de gènes causaux ont pu être clonés et validés fonctionnellement (Gou *et al.*, 2023) (**Tableau I.I.**). Parmi les gènes causaux à des QTL de résistance clonés, plusieurs codent des récepteurs de l'immunité végétale, avec par exemple des *WAK/WALK* comme *RFO1* impliqué dans la résistance d'*A. thaliana* à *Fusarium oxysporum* (Diener & Ausubel, 2005), des *LRR-RLK/RLP* comme *FLS2*, *RFO2/3* impliqué dans la résistance d'*Arabidopsis* à *Pseudomonas syringae* ou *F. oxyporum* (Forsyth *et al.*, 2010; Cole & Diener, 2013; Shen & Diener, 2013), des *NLR* comme *RRS1/RPS4* chez *A. thaliana* (Debieu *et al.*, 2016) ou *RppK* chez le maïs (Chen *et al.*, 2022). D'autres gènes sont impliqués dans la transduction des signaux comme la protéine kinase *RKSI* impliquée dans la réponse d'*A. thaliana* à *Xanthomonas campestris* (Huard-Chauveau *et al.*, 2013) ou le facteur de transcription *ZmMM1* qui confère au maïs une résistance à *Exserohilum turcicum* (Wang *et al.*, 2021a). Certains gènes causaux sont impliqués dans la production de lignine comme *TaDIR-B1* identifié chez le blé (Yang *et al.*, 2021b), ou dans la régulation de l'auxine ou de SA (Yang *et al.*, 2010; Fu *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2011b; Wang *et al.*, 2014; Ye *et al.*, 2019) chez le riz et le maïs. De nouveaux gènes non caractérisés ont également été identifiés comme *POQDR* qui confère une résistance à *Arabidopsis* face à *Sclerotinia sclerotiorum* (Badet *et al.*, 2017).

Tableau I.I.: Gènes causaux identifiés sous-jacents à des QTL de résistance.
Adapté de (Gou *et al.*, 2023).

Rôle biologique	Type/Famille	Plante	Pathogène	Gène/Loci	Type de population utilisé	Méthode d'identification	Validation fonctionnelle	Référence
Récepteurs de l'immunité	WAK/WAKL	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	RFO1	Ty-0 x Col-0	Génétique de liaison	Mutant	Diener and Ausubel (2005)
		Blé dur	<i>Fusarium graminearum</i>	WAK2	RIL	Génétique de liaison	Mutant	Gadaleta <i>et al.</i> (2019)
		Mais	<i>Setosphaeria turcica</i>	ZmWAK-RLK1	RIL	Génétique de liaison	Mutant	Yang <i>et al.</i> (2021)
Récepteurs de l'immunité	LRR-RLK/RLP	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>	FLS2	Nd x Ws (F2) / Col-0 x Nd (RIL)	Génétique de liaison	Mutant	Forsyth <i>et al.</i> (2010)
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	RFO2	Ty-0 x Col-0	Génétique de liaison	Mutant	Shen and Diener (2013)
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Fusarium oxysporum</i>	RFO3	Ty-0 x Col-0	Génétique de liaison	Mutant	Cole and Diener (2013)
Transduction des signaux	NLR	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	RRS1/RPS4	380 accèsions naturelles	GWAS	T-DNA	Debieu <i>et al.</i> (2016)
		Mais	<i>Puccinia polysora</i>	SCRQL / RppC	RIL	Génétique de liaison	Mutant	Deng <i>et al.</i> (2022)
		Mais	<i>Puccinia polysora</i>	RppK	RIL	Génétique de liaison	Mutant	Chen <i>et al.</i> (2022)
Transduction des signaux	Protéine Kinase	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Xanthomonas campestris</i>	RKS1	384 accèsions naturelles	GWAS	Mutant	Bettgerhaeuser <i>et al.</i> (2021)
		Mais	<i>Exserohilum turcicum</i>	ZmMM1	BC2F2/NIL	Génétique de liaison	Mutant	Huard-Chauveau <i>et al.</i> (2013)
		Mais	<i>Rhizoctonia solani</i>	ZmFBL41	318 différentes lignées	GWAS	Expression chez <i>E. coli</i> + Co-Immunoprécipitation	Li <i>et al.</i> (2019)
Métabolites	Lignines	Blé	<i>Fusarium pseudograminearum</i>	TaDIR-B1	435 lignées d'introgessions	GWAS	Mutant + VIGS	Yang <i>et al.</i> (2021)
		Riz	<i>Xanthomonas oryzae</i>	GH3-2	RIL	Génétique de liaison	Mutant OE	Fu <i>et al.</i> (2011)
		Mais	<i>Fusarium graminearum</i>	qRfg2 (ZmAuxRP2)	BC ₁ F ₁	Génétique de liaison	Mutant	Ye <i>et al.</i> (2019), Yang <i>et al.</i> (2010)
Phytohormones	Auxine	Mais	<i>Rice stripe virus</i>	STV11	BLs, BC ₁ F ₈	Génétique de liaison	Mutant, qPCR	Wang <i>et al.</i> (2014), Zhang <i>et al.</i> (2011)
		Riz	<i>Fusarium graminearum</i>	qRfg1/ZnCCT	NIL	Génétique de liaison	Mutant	Wang <i>et al.</i> (2017)
		Mais	<i>Fusarium graminearum</i>	Fhb7	RIL	Génétique de liaison	Génération de lignées d'introgessions	Zhang <i>et al.</i> (2011), Wang <i>et al.</i> (2020)
Régulations épigénétiques	SA	Blé	<i>Fusarium graminearum</i>	POQR	84 accèsions naturelles	GWAS	Mutant	Badet <i>et al.</i> (2017)
		<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>					

1.2.4. Rôle des hormones dans la défense des plantes aux pathogènes

De nombreuses phytohormones sont impliquées dans la défense des plantes aux attaques biotiques, notamment l'acide salicylique (SA) dans la résistance des plantes aux agents pathogènes biotrophes ou l'éthylène (ET) et l'acide jasmonique (JA) dans la résistances aux nécrotrophes (Glazebrook, 2005; Dempsey *et al.*, 2011; Rahman *et al.*, 2012; Ghozlan *et al.*, 2020) (**Fig. I.16.**).

L'accumulation de SA induit une défense de longue durée et à large spectre appelée résistance systémique acquise (SAR) (Fu & Dong, 2013). L'infection entraîne une accumulation de SA qui se lie à des récepteurs *nonexpresseur of PR gene* NPR1 (Wu *et al.*, 2012b; Liu *et al.*, 2020c). L'interaction SA/NPR1 conduit à l'expression de gènes appelés *PR* ou *pathogenesis-related genes* (Niki *et al.*, 1998). La signalisation et la mise en place de la SAR se fait à travers la mobilité du méthylsalicylate (MeSA), molécule inactive qui est convertie en SA par l'action d'une methyl salicylate esterase SABP2 (Park *et al.*, 2007). D'autres hormones sont également impliquées dans la réponse des plantes aux organismes pathogènes et notamment aux nécrotrophes (Li *et al.*, 2022). En effet, l'apparition d'une nécrose des tissus entraîne une accumulation de JA qui se lie au récepteur COI1 (pour *coronatine insensitive 1*) (Yan *et al.*, 2009). Cette interaction JA/COI1 entraîne la dégradation de JAZ1 (Thines *et al.*, 2007) et donc l'expression de facteurs de transcription tels que *MYC2/3/4* (Fernández-Calvo *et al.*, 2011; Niu *et al.*, 2011). Ces facteurs de transcription induisent l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse du JA dont *LOX2* (Macioszek *et al.*, 2023) ou de facteurs de transcription *WRKY75* et *ORA59* (membre des facteurs de transcription répondant à l'éthylène) qui induisent *PDF1.2* pour *plant defensin* (Chen *et al.*, 2021). L'éthylène (ET) accumulé après la nécrose entraîne également l'induction de *PDF1.2* via l'expression de différents facteurs de transcription tels que *EIN2* (Li *et al.*, 2019b) ainsi que de *ORA59* (Penninckx *et al.*, 1998; Pré *et al.*, 2008). Les JA et l'ET sont également impliqués dans un mécanisme de résistance systémique induite, ISR (Pieterse *et al.*, 2014). Il existe toutefois une réponse antagoniste entre SA et l'ET/JA. L'acide jasmonique est notamment amené à réprimer l'expression des *PR* (Niki *et al.*, 1998) tandis que l'acide salicylique réprime l'expression de *PDF1.2* (Leon-Reyes *et al.*, 2010).

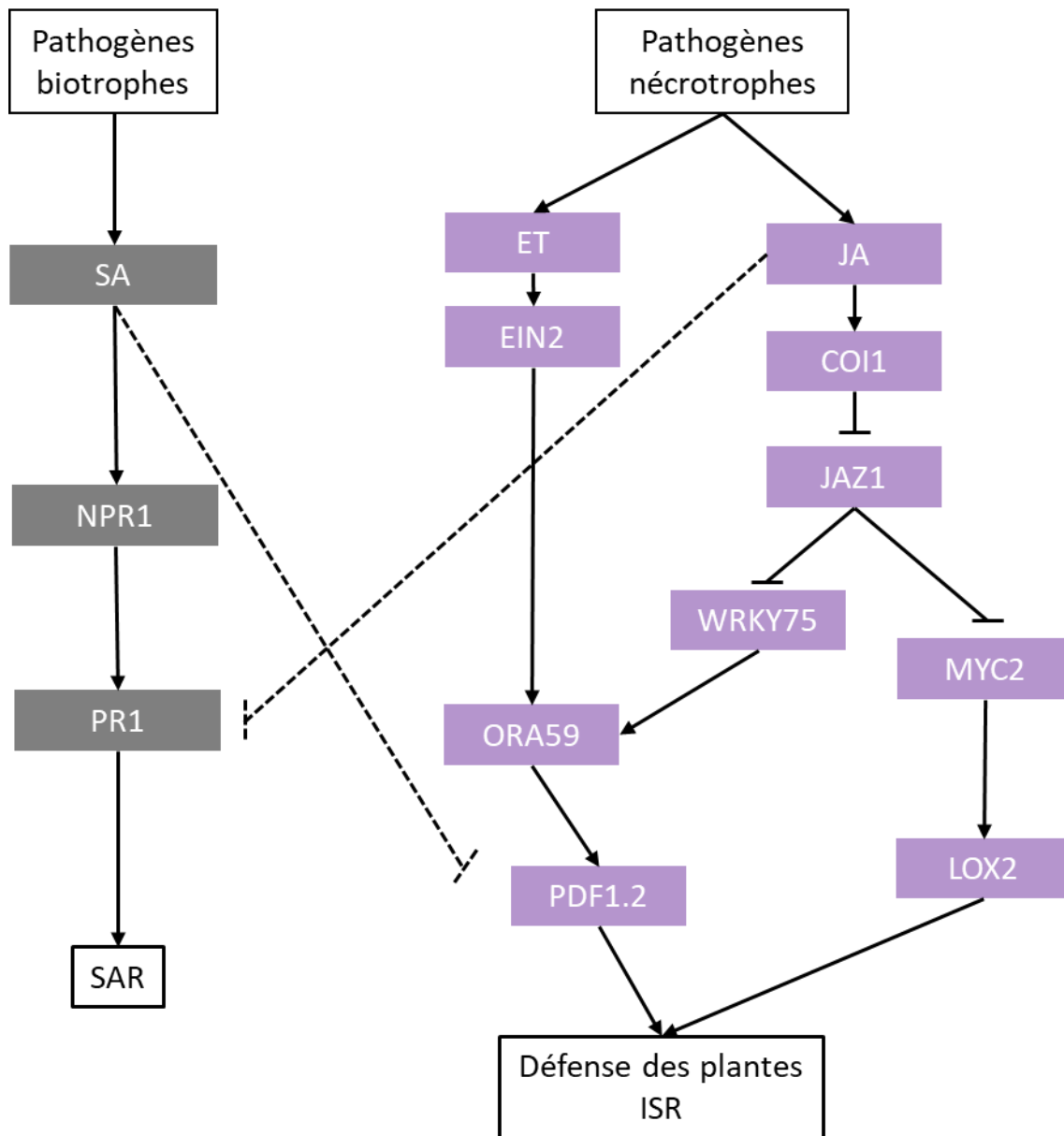


Figure I.16. : Rôle des hormones dans la réponse des plantes à différents types d'agents pathogènes. L'acide salicylique (SA) est accumulé lors de l'infection par des agents pathogènes biotrophes. Cette accumulation entraîne l'expression de différents récepteurs et des gènes *PR* (*PATHOGENS RELATED GENES*) dont *PR1* (gris) ce qui conduit à une résistance systémique acquise (SAR). L'infection par des agents pathogènes nécrotrophes entraîne l'accumulation d'éthylène (ET) et d'acide jasmonique (JA) (violet) qui vont permettre l'expression de gènes de défense comme *PDF1.2* ou l'augmentation de la biosynthèse de JA (*LOX2*). JA et ET sont également impliqués dans un mécanisme de résistance systémique induite, ISR. Les réponses antagonistes entre JA/ET et SA sont représentées par des traits en pointillé. Figure adaptée de Li et al., 2019

1.3. Impact de contraintes biotiques et abiotiques combinées sur les plantes

1.3.1. La combinaison de stress : modalités d'application et interaction des stress

Les plantes font rarement face à des stress seuls et sont ainsi soumises à des stress combinés, qu'ils soient biotiques ou abiotiques. L'évaluation de l'impact de ces stress combinés sur la réponse des plantes dépend des modes d'application et de la potentielle interaction entre ces contraintes. Ainsi, il existe plusieurs façons d'appliquer des combinaisons de stress (Desaint *et al.*, 2021) : de manière simultanée (**Fig. I. 17.A**) ou en décalé, de manière séquentielle (**Fig. I. 17.B**), à moins de 24 heures d'intervalle ou en acclimatation (**Fig. I. 17.C**), à plus de 24 heures d'intervalle.

La mesure de l'impact d'une combinaison de stress, quels qu'ils soient, peut s'avérer complexe dû aux possibles interactions entre ces derniers (**Fig. I.18.**). Ces interactions peuvent être de différente nature : i) dans l'effet de dominance, les stress en combinaison n'interagissent pas entre eux et l'effet des stress combinés est ainsi égal à l'effet de l'un ou l'autre des stress appliqués seuls ; ii) l'effet additif implique que l'effet des stress combinés est égal au cumul des effets de chaque stress appliqué seul ; iii) les stress peuvent interagir de manière positive, c'est-à-dire en synergie et donc l'effet des stress combinés est plus important que l'effet additif de ces stress, iv) ou bien de manière négative, c'est-à-dire de manière antagoniste et donc l'effet des stress combinés est plus faible que l'effet additif (Côté *et al.*, 2016; Zandalinas & Mittler, 2022).

Dans tous les cas, il n'est pas aisé de déterminer, lors de l'application d'une combinaison de stress, lequel a un impact plus important sur les plantes, c'est-à-dire le stress dominant. Dans la revue réalisée par Pandey *et al.*, (2015) le stress dominant est défini comme le stress induisant le plus de changements au niveau transcriptomique. Par ailleurs, la réponse des plantes à des stress appliqués en combinaison dépend des combinaison de stress (Zandalinas & Mittler, 2022) et des génotypes chez *A. thaliana* et le riz (Vile *et al.*, 2012; Habibpournmehraban *et al.*, 2022). Il est important aussi de souligner que l'état nutritionnel de la plante conditionne la réponse à un stress biotique ou abiotique (Kumari *et al.*, 2022).

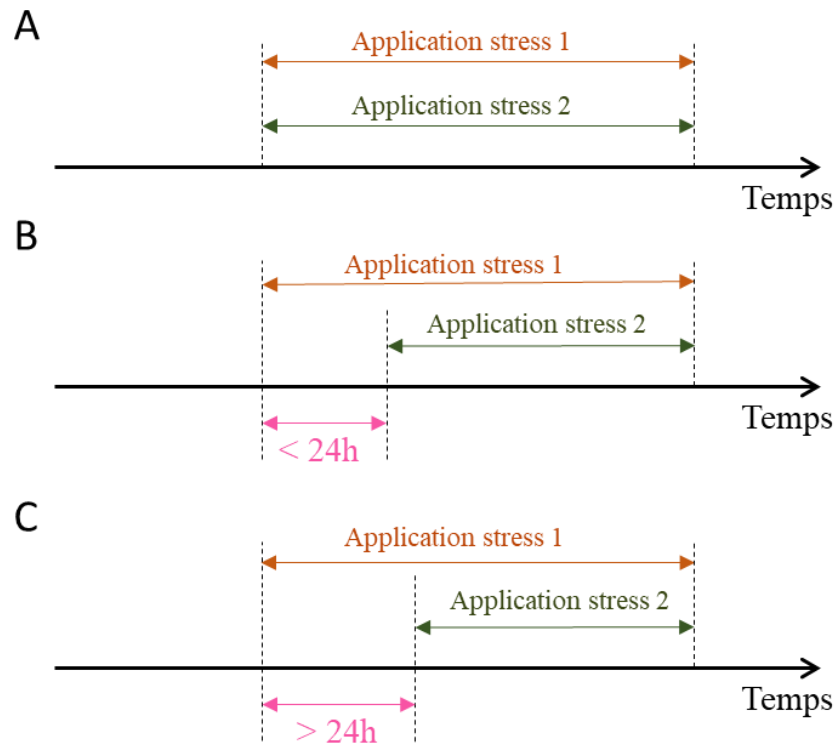


Figure I.17. : Méthodes d'application de stress combinés. En A) application de deux stress de manière simultanée, en B) application de deux stress de manière séquentielle à moins de 24 heures d'intervalle et en C), application de deux stress en acclimatation, c'est-à-dire à plus 24 heures d'intervalle. Adaptée de Desaint et al. (2021).

Par exemple, des apports en azote, en potassium et en phosphore (P) permettent une augmentation de la biomasse aérienne et sous-terrainne du maïs soumis à un stress salin (Zhang *et al.*, 2006a), du blé lors d'une hausse de température de quelques degrés (Liu *et al.*, 2019) ou de la moutarde en condition de déficit hydrique (Rani *et al.*, 2021).

L'impossibilité de prédire l'effet de stress combinés en étudiant individuellement l'impact des stress seuls est confirmée par une littérature abondante (Rasmussen *et al.*, 2013; Prasch & Sonnewald, 2013a; Barah *et al.*, 2016; Shaar-Moshe *et al.*, 2017; Georgii *et al.*, 2017). Dans les **paragraphe 1.3.2. et 1.3.3.**, des exemples de l'impact de l'application de contraintes combinées seront présentés, notamment la combinaison des deux stress abiotiques sécheresse/ hausse de la température et la combinaison de différentes conditions abiotiques sur la réponse des plantes à des stress biotiques.

1.3.2. Impact de la combinaison de contraintes abiotiques sur les plantes

La combinaison de stress abiotiques la plus étudiée est l'association d'une augmentation de la température et d'un déficit hydrique. Chez *A. thaliana*, il a été démontré au niveau transcriptomique que la réponse à ces deux stress combinés est différente de celle de chaque stress appliqué seul et que le stress sécheresse est dominant sur le stress thermique (Rizhsky *et al.*, 2004). En condition de hausse de température, les plantes augmentent leur transpiration et ouvrent leurs stomates. En condition de sécheresse, la photosynthèse est supprimée, les stomates sont fermés et les plantes accumulent de la proline. En conditions combinées de sécheresse et de hausse de la température, il y a une augmentation de la respiration, une suppression de la photosynthèse et l'accumulation de différents sucres (sucrose, maltose, melibiose et mannitol) à la place de la proline (Rizhsky *et al.*, 2004). Dans d'autres études les résultats de l'interaction entre ces deux stress sont légèrement différents. Sewelam *et al.* (2020) rapportent notamment un effet prédominant d'une hausse de la température par rapport à un stress osmotique, mimant un déficit hydrique. En se basant sur la définition donnée par Pandey *et al.* (2015) d'un stress dominant, c'est-à-dire celui qui entraîne le plus de modifications transcriptomiques, l'effet des stress dépend également des écotypes considérés. En effet, dans l'étude de Barah *et al.* (2016) le stress température a un effet dominant chez l'écotype Ler, tandis que le stress osmotique (salin) est dominant chez l'écotype Kas-1.

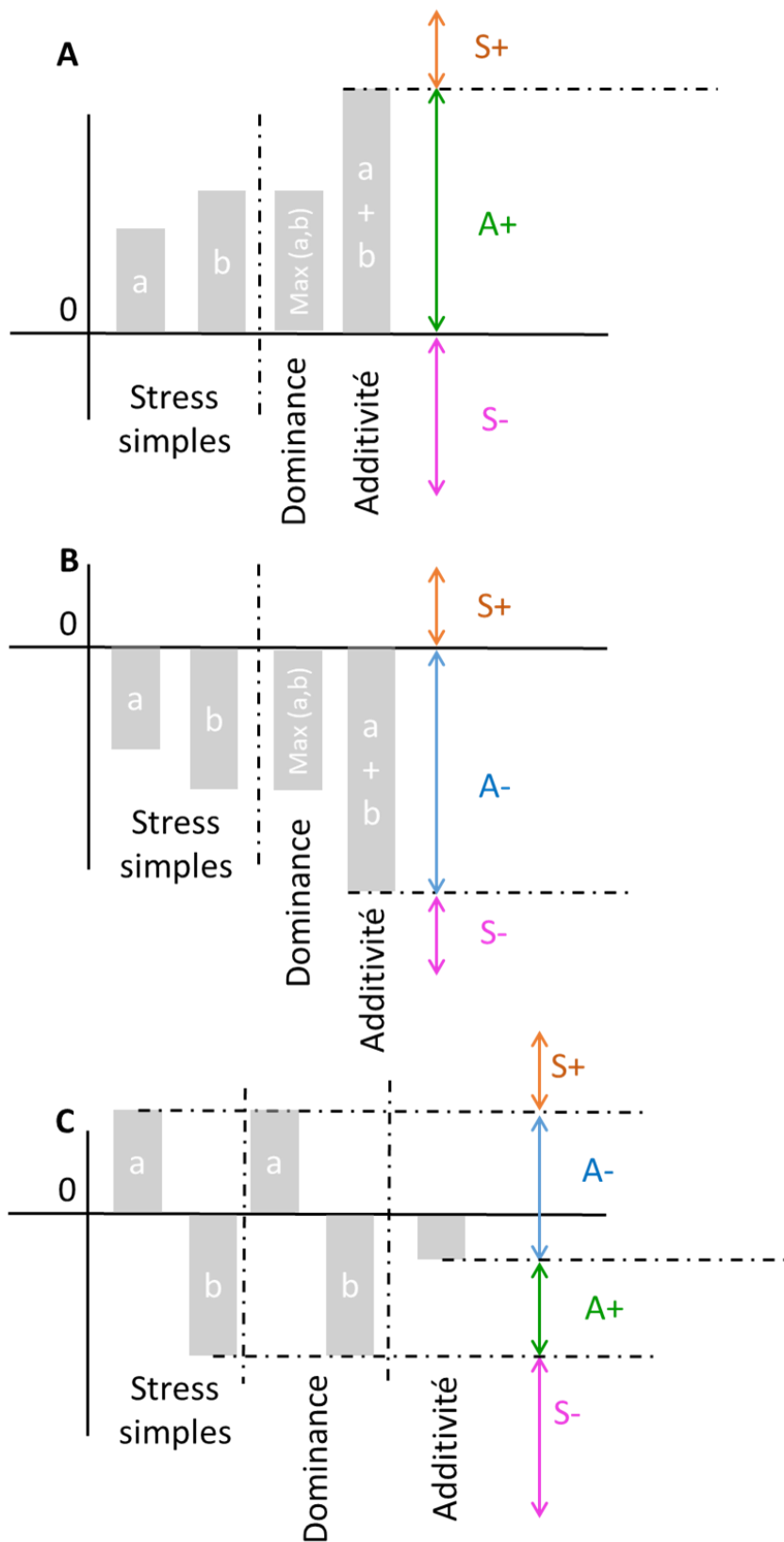


Figure I.18. : Interactions entre les effets de stress multiples. A) Cas de deux stress ayant des impacts positifs, B) Cas de deux stress ayant des impacts négatifs. Lors de l'application de la combinaison de stress, l'effet de dominance signifie que l'effet de ces deux stress en combinaison est égal à l'effet de l'un ou l'autre des stress appliqués seul. Lorsque l'effet de deux stress combinés est égal à la somme de leurs effets pris séparément, les stress ont un effet additif. Les stress combinés peuvent également avoir effet synergétique positif (S+), c'est-à-dire que l'effet combiné de deux stress est plus positif que l'effet additif de chaque stress appliqué individuellement ou un effet synergétique négatif (S-) lorsque l'effet combiné de deux stress est plus négatif que l'effet additif de chaque stress appliqué individuellement. Il existe également un effet antagoniste positif (A+), c'est-à-dire que la combinaison de stress a un effet moins positif que l'effet additif calculé ou un effet antagoniste négatif (A-), c'est-à-dire que la combinaison de stress a un effet moins négatif que l'effet additif calculé. **C) Dans le cas où les impacts des stress ne vont pas dans le même sens : S+** correspond à un effet plus positif que l'effet additif et plus grand que l'effet de « a » ; **S-** correspond à un effet plus négatif que l'effet additif et plus grand que l'effet de « b » ; **A+** correspond à un effet plus négatif que l'effet additif, mais moins négatif que l'effet de « b » et **A-** correspond à un effet moins négatif que l'effet additif et moins positif que l'effet de « a ». Adapté Piggott et al. (2015).

1.3.3. Impact des conditions environnementales sur l'issue de l'interaction plante-agent pathogène

Dans le contexte de changement climatique, la répartition des niches écologiques des plantes et des microorganismes pathogènes est amenée à évoluer avec de nouvelles aires de répartition pour les végétaux et les agents pathogènes, suggérant ainsi des interactions plantes-agents pathogènes inédites ou réémergentes (Chakraborty, 2013; Chaloner *et al.*, 2021; Trivedi *et al.*, 2022). L'étude de l'impact d'une combinaison de stress biotiques et abiotiques est encore plus complexe à évaluer car les conditions environnementales, en plus d'avoir un impact sur la physiologie de la plante impactent également le développement des microorganismes phytopathogènes.

L'effet de la température sur l'issue de différentes interactions hôte/pathogène chez *Arabidopsis* a été très documenté. A une température de 28°C (augmentation de 6°C par rapport à la température optimale d'*A. thaliana* de 22 °C), la réponse basale ainsi que la résistance médiée par les gènes *R* (*RPS2*, *RPM1* et *RPS4*) sont réprimées face à l'infection par *P. syringae*, se traduisant notamment par une suppression de la réponse d'hypersensibilité (Wang *et al.*, 2009). Aoun *et al.* (2017) rapportent également un effet négatif de la température sur la résistance à *R. solanacearum* via la répression de l'ETI et des gènes *RPSA/RRS1* mais ont mis en évidence une résistance quantitative effective sous ces conditions *via* notamment l'effet du locus *SSL5*. Ce même type de réponse à la température est observé chez d'autres espèces végétales telles que le riz, par exemple, où certains gènes de résistance à *Xanthomonas oryzae* sont induits lors de l'augmentation de la température, notamment le gène *RXA7* (Webb *et al.*, 2010) tandis que d'autres gènes *R* étaient réprimés (Chen *et al.*, 2019a). D'autres études rapportent également qu'une température de 28°C sur *A. thaliana* ou *Solanum lycopersicum* conduit à la répression des voies de défense dépendantes de l'acide salicylique (SA) et entraîne l'accumulation de l'acide jasmonique (JA) (Huot *et al.*, 2017; Havko *et al.*, 2020; Kim *et al.*, 2022).

La teneur en eau du sol peut également moduler l'issue des interactions plante-agent pathogène. Par exemple, un déficit hydrique entraîne une réduction des symptômes de la maladie dans le pathosystème *R. solanacearum*-*Solanum lycopersicum* (Islam & Toyota, 2004) mais une augmentation de la maladie lors de l'interaction *O. sativa*-*Magnaporthe oryzae* (Bidzinski *et al.*, 2016). Chez *A. thaliana*, une sécheresse conduit à une plus grande sensibilité (Choudhary & Senthil-Kumar, 2022) ou une plus grande résistance (Gupta *et al.*, 2016) à *P. synrigae*.

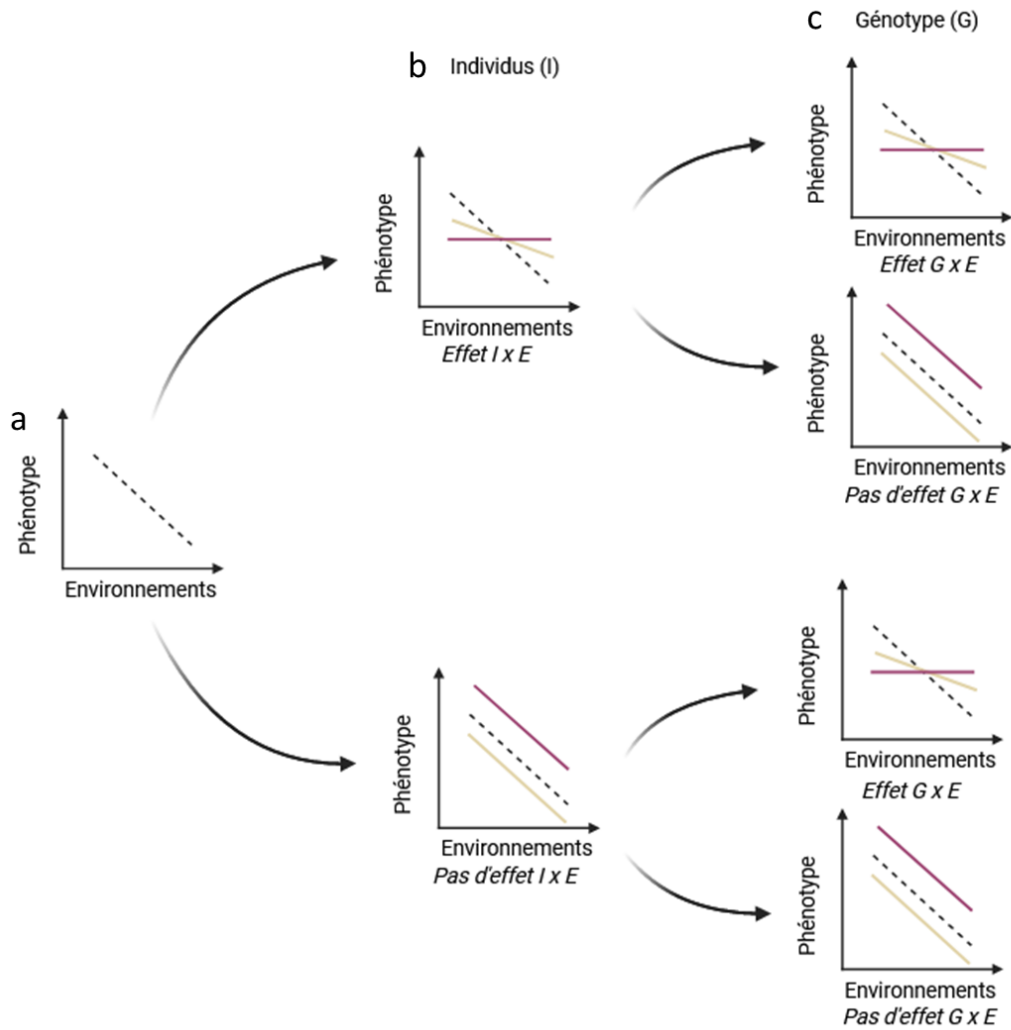


Figure I.19 : Modèle des normes de réactions. a) moyenne phénotypique de la population à travers les environnements. b) L'effet "Individu par Environnement" (I x E) prend en compte à la fois les effets génétiques et non génétiques sur la manière dont chaque individu réagit à son environnement. c) L'effet "Génotype par Environnement" (G x E) se concentre spécifiquement sur l'influence des gènes sur la réaction d'un individu à son environnement.

Lors d'un stress sécheresse, la plante produit de l'ABA qui entraîne de nombreux processus physiologiques qui pourraient prévenir l'infection tels que la fermeture des stomates déjà montré comme impliqué dans la résistance d'*A. thaliana* à l'infection par *P. syringae* (Melotto *et al.*, 2006) ou la biosynthèse de cutine qui permettrait de prévenir l'entrée des agents pathogènes au niveau des feuilles. Le rôle que pourraient jouer ces processus physiologiques dans la résistance des plantes à l'infection dépend cependant des agents pathogènes. Par exemple, le mutant *sma4*, altéré dans l'expression du gène *LONG-CHAIN ACYL-COENZYME A SYNTHETASE*, impliqué dans la synthèse de la cutine, présente une plus grande résistance à *Botrytis cinerea* et une plus grande sensibilité à *P. syringae* (Tang *et al.*, 2007; Bi *et al.*, 2017). L'application d'un déficit hydrique entraîne l'expression de gènes impliqués dans la défense chez la vigne (Cramer *et al.*, 2007; Guan *et al.*, 2018) et chez le pois chiche (Sinha *et al.*, 2016).

L'impact des conditions abiotiques sur l'issue de l'interaction plante-agent pathogène dépend des conditions évaluées, des plantes ainsi que de l'agent pathogène considéré (Leisner *et al.*, 2023).

1.4. Plasticité de la réponse des plantes sous des contraintes abiotiques

Les plantes ont la remarquable capacité de s'adapter à leur environnement grâce à la plasticité phénotypique. Cette plasticité est définie dans la littérature comme la capacité d'un génotype à ajuster son phénotype en réponse aux conditions environnementales (Bradshaw, 1965). Par exemple, comme précédemment décrit, certains génotypes d'*A. thaliana* sont capables de déclencher des réponses de thermomorphogénèse lorsque soumis à des températures de 28°C.

La plasticité phénotypique est couramment représentée sous forme de courbes appelées « normes de réaction » (Via *et al.*, 1995) (**Fig. I.19.**), qui illustrent les phénotypes d'un individu dans différentes conditions environnementales. Ces normes de réaction (Nussey *et al.*, 2007) permettent de déterminer deux aspects importants :

- L'effet "Individu par Environnement" (I x E) : Il prend en compte à la fois les effets génétiques et non génétiques sur la manière dont chaque individu réagit à son environnement. En d'autres termes, les différences observées entre les individus dans leur réaction à l'environnement peuvent être dues à des facteurs génétiques ainsi qu'à d'autres facteurs non génétiques.

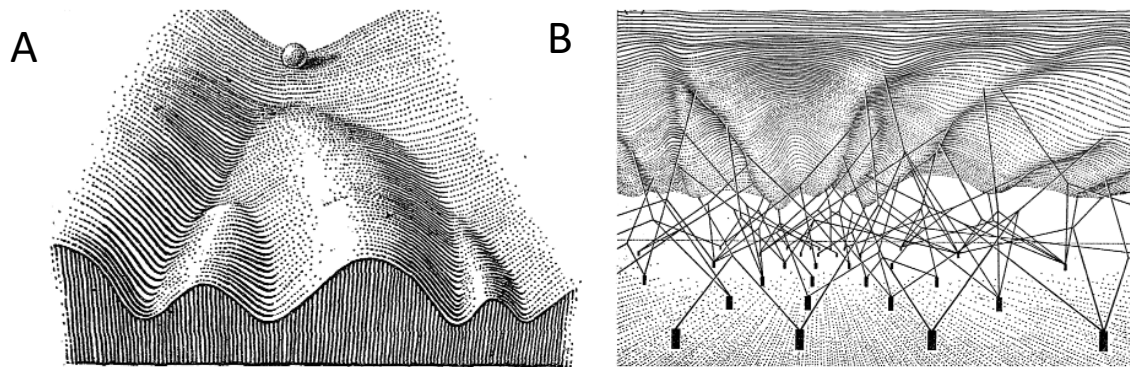


Figure I.20. : Représentation du concept de « paysage épigénétique » par Waddington (1942). A) La bille représente un système biologique, comme une cellule, qui par des événements aléatoires va être entraînée vers des états de plus en plus différenciés. B) Représentation de l'arrière du paysage épigénétique. Les pentes du paysage présenté en A) sont formés par l'interconnexion de l'environnement. Figure tirée de Fusco et al., 2014.

- L'effet "Génotype par Environnement" (G x E) : Il se concentre spécifiquement sur l'influence des gènes sur la réaction d'un individu à son environnement. Cela signifie que si l'on observe des variations dans la réaction des individus à l'environnement, ces variations sont principalement dues à des différences génétiques entre ces individus.

Cependant, il est important de noter que les facteurs génétiques ne suffisent pas à expliquer la totalité de la variation phénotypique observée entre les individus exposés à différents environnements. De plus en plus d'études mettent en lumière le rôle des mécanismes épigénétiques dans la plasticité phénotypique, que ce soit chez les mammifères (Duncan *et al.*, 2014) ou chez les plantes (Dar *et al.*, 2022; Jiang *et al.*, 2023). Ces mécanismes épigénétiques contribuent à la variabilité phénotypique en réponse à des environnements changeants. Kooke *et al.* (2015) ont notamment mis en évidence le contrôle de la plasticité d'*A. thaliana* entre des conditions abiotiques standard et un stress salin par des épimutations liées à différents niveaux de méthylation de l'ADN et González *et al.* (2013) ont démontré le rôle de la méthylation de l'ADN dans la plasticité de la tomate entre des conditions de sécheresse et des conditions standard.

2. Épigénétique et réponse des plantes aux stress abiotiques et biotiques

2.1. Définitions de l'épigénétique

L'épigénétique a été définie pour la première fois par Waddington (1942) comme le changement d'un phénotype sans modification du génotype (**Fig.I.20.**). D'autres définitions s'en sont suivies comme celle de Holliday (1987) décrivant l'épigénétique comme le changement d'activité des gènes durant le développement. En 2001, Wu & Morris (2001) y ajoutent la notion d'héritabilité. L'épigénétique est décrite alors comme « l'étude des mécanismes hértables lors de la mitose et/ou de la méiose qui modifient l'expression des gènes sans impacter la séquence de l'ADN » (Wu & Morris, 2001), définition qui sera celle utilisée par la suite dans ce manuscrit de thèse. Heard & Martienssen (2014) précisent que les mécanismes épigénétiques peuvent être hértables ou bien adaptatifs. Les mécanismes épigénétiques dit « hértables » ne sont pas soumis à une réinitialisation lors des divisions méiotiques et mitotiques et sont alors transmis sur plusieurs générations (Fitz-James & Cavalli, 2022; Burton & Greer, 2022). Les mécanismes épigénétiques dit « adaptatifs » permettent l'adaptation d'un individu à son environnement à un instant précis et ne sont pas transmis d'une génération à l'autre.

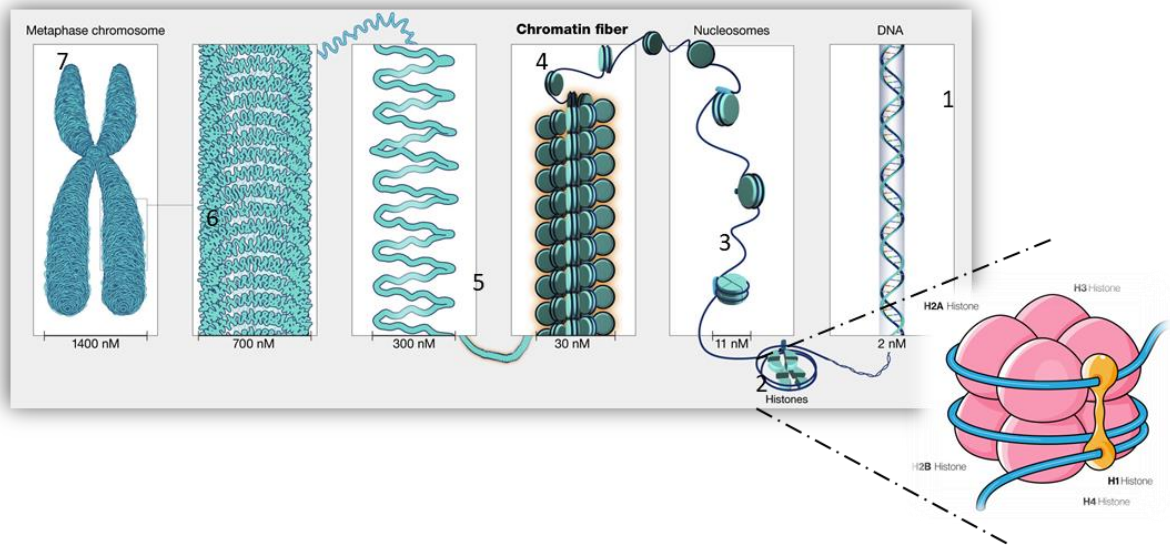


Figure I.21. : Représentation de la structure chromatinienne. La molécule d'ADN est organisée en double hélice (1) de 2 nanomètres de diamètre (nm). Elle s'enroule autour d'octamères d'histones, appelés nucléosomes, composés de 2 histones H2A, 2 H2B, 2 H3, 2 H4 (2) (3). Certains ARNnc, comme les miARN, sont encodés par des gènes, les gènes MIR, soulevant parfois la question de leur appartenance aux mécanismes épigénétiques. Les miARN ont cependant un rôle dans la régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel sans impacter l'intégrité de la séquence nucléotidique de leur gène cible et seront donc, dans ce manuscrit de thèse, considérés comme un mécanisme épigénétique. La chromatine se replie pour former une fibre de chromatine de 30 nm de diamètre (4), qui forme des boucles d'une longueur moyenne d'environ 300 nanomètres de diamètre (5). Ces fibres de chromatine sont compactées et pliées pour former une fibre de 700 nt (7). Image adaptée du National Human Genome Research Institute. @genome.gov

2.2. Les mécanismes épigénétiques

Au sein de la cellule, un fragment de 146 ou 147 paires de bases (pb) de la molécule d'ADN est enroulée autour d'un octamère d'histones constituant un nucléosome. Les octamères sont constitués de 4 paires d'histones : 2 H2A, 2 H2B, 2 H3 et 2 H4. Le nucléosome est l'unité de base de la chromatine, qui est la structure sous laquelle est compactée l'ADN (**Fig. I.21.**). Les nucléosomes sont stabilisés par l'histone H1 appelée « linker » (Luger *et al.*, 1997). La chromatine présente deux niveaux de compaction desquels dépend l'expression des gènes : l'hétérochromatine (constitutive et facultative), présentant une chromatine compactée où les gènes ne sont pas transcrits et l'euchromatine, pour laquelle la chromatine est relâchée et les gènes sont transcrits. L'hétérochromatine constitutive reste compactée et les gènes ou les éléments transposables n'y sont jamais exprimés, tandis que l'hétérochromatine facultative peut se décompacter. Le niveau de compaction de la chromatine est modulé par différentes marques épigénétiques (Roudier *et al.*, 2011).

Ces différentes modifications épigénétiques, c'est-à-dire modifications d'histones et méthylation de l'ADN sont présentées brièvement par la suite. Par ailleurs, certains ARN non codants (ARNnc) ayant un rôle fondamental dans la régulation de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel sans impacter l'intégrité de la séquence nucléotidique de leur gène cible peuvent être aussi considérés comme un mécanisme épigénétique. Dans ce manuscrit de thèse, et malgré le fait que les ARNnc soient codés par des gènes, ils seront considérés comme un mécanisme épigénétique et présentés à la suite des autres mécanismes.

Modifications et variants d'histones

Les histones sont des protéines conservées et nécessaires à la stabilité du génome (Prakash & Fournier, 2017). Les histones sont soumises à des modifications post-traductionnelles notamment sous la forme d'acétylation (Ac), de méthylation (Me) ou de phosphorylation (P) (Torres-Perez *et al.*, 2021) (**Fig.I.22.B**). Il existe une nomenclature spécifique permettant de décrire ces différentes modifications : par exemple, dans le cas de la modification d'histone H3K27me3, le numéro de l'histone est défini par « H3 », l'acide aminé modifié, ici la lysine, par le « K », le numéro de l'acide aminé modifié en partant de l'extrémité N terminal de la queue d'histone, ici par le « 27 » et le type et le nombre de modifications sur ce résidu, ici « me3 », c'est-à-dire ajout de 3 groupements méthyl (**Fig. I.22.A**).

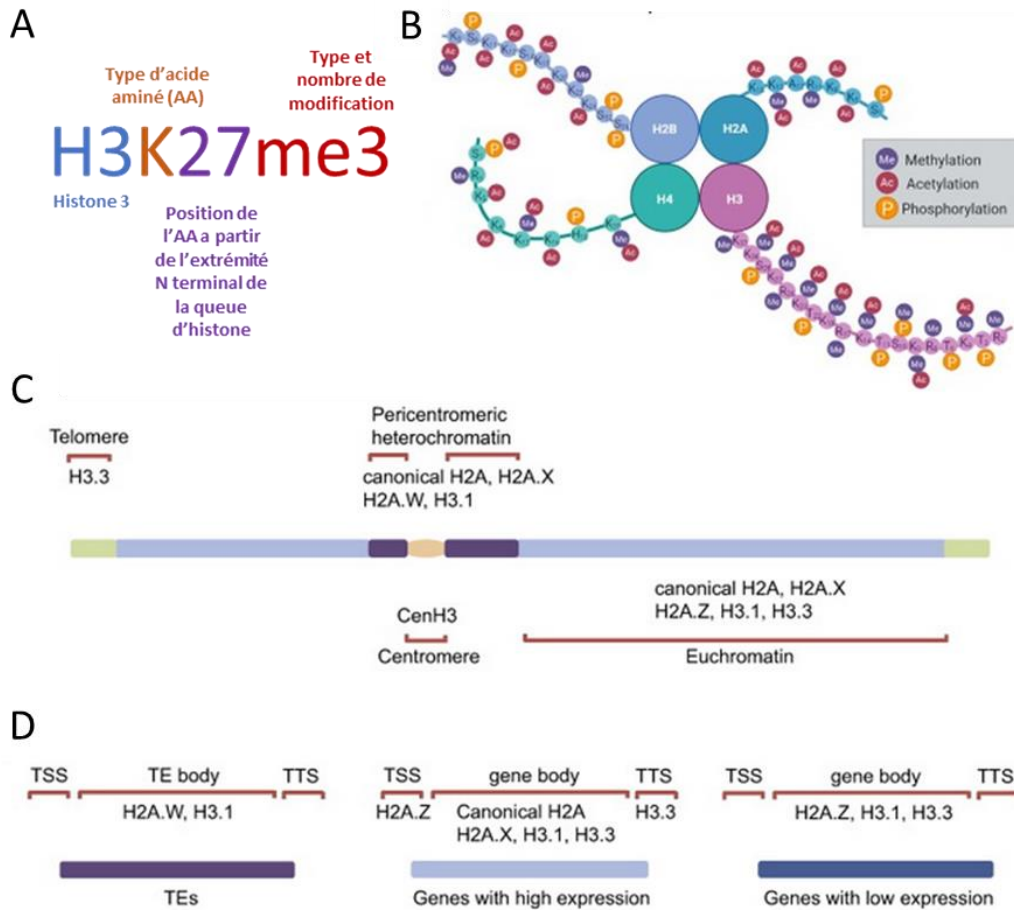


Figure I.22. : Modifications d'histones et variants d'histones. (A) Nomenclature des modifications d'histones : dans le cas de la marque H3K27me3, le numéro de l'histone est défini par « H3 », l'acide aminé modifié, ici la lysine, par le « K », le numéro de l'acide aminé modifié en partant de l'extrémité N terminale de la queue d'histone, ici par le « 27 » et le type et le nombre de modification sur ce résidu, ici « me3 ». (B) Les histones peuvent être méthylées, acétylées ou phosphorylées. Localisation des variants d'histones sur (C) un chromosome et (D) au niveau d'éléments nucléotidiques comme les éléments transposables (TEs) et les gènes hautement ou très peu exprimés. Figure adaptée de Diagenode et Prakash and Fournier, (2017) et Torres-Perez et al. (2021).

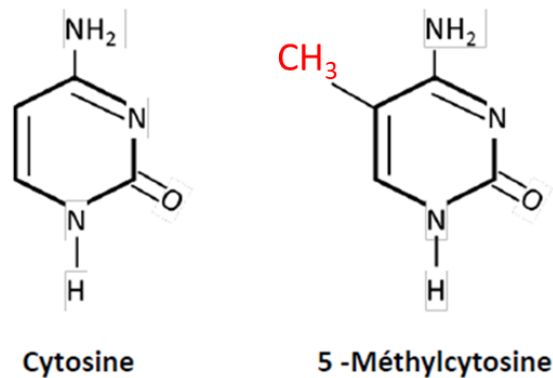


Figure I.23. : Représentation graphique de la cytosine et de sa forme modifiée : la 5-méthylcytosine.

Parmi les modifications d’histones les plus étudiées, H3K9me2 permet la stabilité du génome *via* la répression de l’expression d’éléments transposables ou de séquences répétées et le maintien des frontières structurales entre eu- et hétérochromatine (Poleshko *et al.*, 2019; Xu & Jiang, 2020). D’autres marques, comme l’apposition de groupe méthyle, H3K4me3 ou H3K36me2/3 sont de leur côté des modifications d’histones associées à la transcription génique. La marque H3K4me3 est notamment impliquée dans de nombreux processus physiologiques comme le temps de floraison, le développement végétatif ou la réponse des plantes à des stress biotiques et abiotiques (Foroozani *et al.*, 2021). Par ailleurs, les histones H2A, H2B, H3 et H1 possèdent des variants dont la localisation spécifique permet la modulation de l’épigénome et influe la présence d’autres marques épigénétiques. Par exemple, les variants H2A.X, H2A.Z et H2A.W sont localisés respectivement dans les promoteurs des gènes actifs, dans le corps des gènes inactifs et au niveau des transposons (Kawashima *et al.*, 2015; Jiang & Berger, 2017; Lei & Berger, 2019) (**Fig.I.22.D**). Les variants H3.3 et CenH3 sont respectivement localisés dans les régions télomériques et centromériques des chromosomes (Lermontova *et al.*, 2006; Fukagawa & Earnshaw, 2014; Otero *et al.*, 2016) (**Fig.I.22.C**). D’autres variants d’histones, notamment H1.3, sont impliqués dans la réponse d’*Arabidopsis* aux stress abiotiques (Rutowicz *et al.*, 2015; Foroozani *et al.*, 2022).

Méthylation de l’ADN

Les modifications et variants d’histones ne sont en mesure de stabiliser le génome qu’en synergie avec d’autres modifications épigénétiques, et notamment la méthylation de l’ADN (Prakash & Fournier, 2017). La méthylation de l’ADN a tout d’abord été identifiée par Hotchkiss (1948) avant d’être associée, bien plus tard, au contrôle de l’expression des gènes chez les cellules eucaryotes (Compere & Palmiter, 1981). Elle consiste en l’addition d’un groupement méthyl sur le 5^{ème} carbone d’une cytosine pour ainsi former la 5-méthylcytosine (He *et al.*, 2011) (**Fig. I.23**). Chez les plantes, il existe trois contextes de méthylation : CG, CHG et CHH (où H est soit A, T ou C) (Downen *et al.*, 2012; Deleris *et al.*, 2016). La méthylation dans les contextes CHG et CHH est généralement associée à la répression de la transcription des gènes et des transposons, assurant ainsi la stabilité du génome (Muyle *et al.*, 2022). La méthylation en CG se trouvant dans les promoteurs des gènes assure également ce rôle d’inhibiteur transcriptionnel. Celle présente dans le corps des gènes reste moins connue mais pourrait être impliquée dans le maintien évolutif de gènes fonctionnellement importants en limitant l’expression de promoteurs intra géniques ou *via* l’augmentation de la précision des processus d’épissage (Takuno & Gaut, 2012).

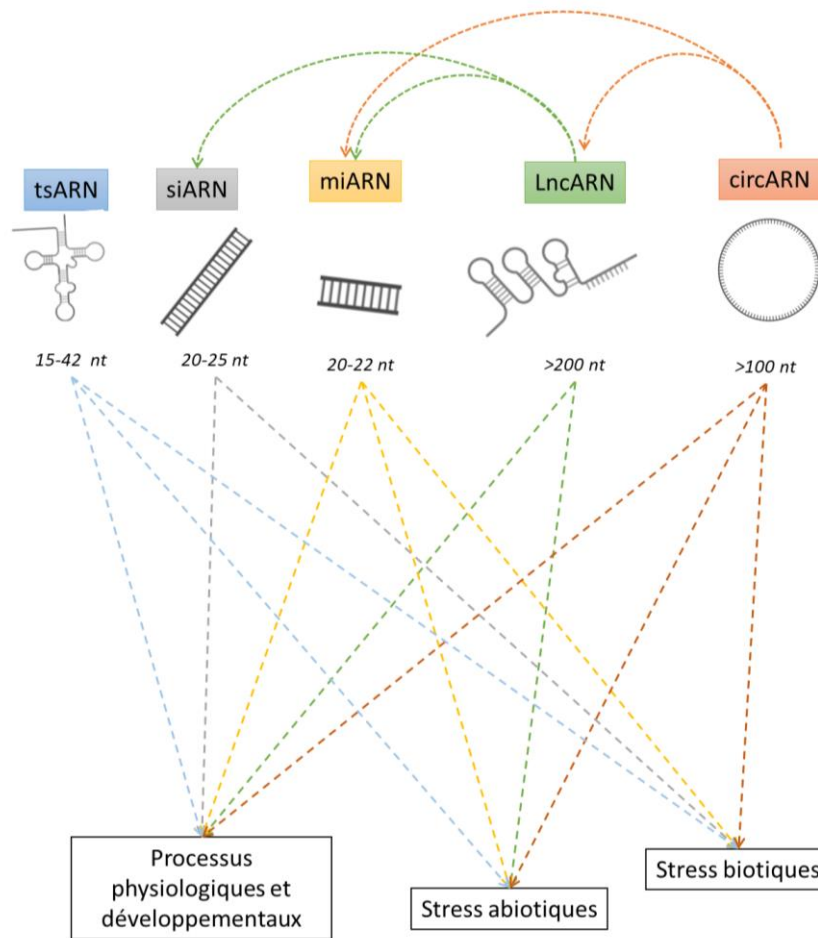


Figure I.24. : Structure, longueur et fonction non exhaustives des ARN non codants. Tous les ARN non codants (ARNnc) sont impliqués dans le contrôle de processus développementaux et dans la réponse des plantes aux agents pathogènes et aux stress abiotiques. Les lncARN et les circARN sont en mesure de contrôler l'activité des miARN. Les lncARN ont également un rôle de précurseur dans la production de siARN. tsARN : dérivant des ARN de transfert ; siARN : petits ARN interférants ; miARN : microARN ; lncARN : long ARN non codants ; circARN : ARN circulaires . Adapté de Chao et al. (2022).

ARN non codants

Les ARN non codants (ARNnc) (**Figure I.24.**) font également partie des mécanismes épigénétiques puisqu'ils sont impliqués dans la régulation de l'expression de gènes au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel, sans impacter leur séquence nucléotidique (Kaikkonen *et al.*, 2011; Wei *et al.*, 2017). Les ARNnc sont des ARN qui ne sont pas traduits en protéines et sont classés en fonction de leur taille : les petits ARNnc ont une longueur de 18 à 30 nucléotides (nt) ; les moyens ARNnc de 31 à 200 nt et les longs ARNnc de plus de 200 nt (Yu *et al.*, 2019). Parmi les petits ARNnc, on peut notamment retrouver les microARN (Cf **paragraphe 2.5**) et les petits ARN interférants (siARN), impliqués dans le processus de méthylation de l'ADN (Liu *et al.*, 2004). Au niveau des longs ARNnc, il est possible de donner l'exemple des ARN circulaires (circARN) qui, par leur structure sont plus stables que d'autres ARNnc (Suzuki *et al.*, 2006) et les long ARN non codants (lncARN). Plus récemment, les tsARN, dérivant des ARN de transfert, indispensables à la traduction, ont été identifiés comme impliqués dans de nombreux processus chez les plantes (Wang *et al.*, 2023). Tous ces ARNnc ont des rôles dans plusieurs processus physiologiques ou de développement ainsi que dans la réponse des plantes au stress biotiques et abiotiques (Wang & Chekanova, 2017; Hou *et al.*, 2019; Kong *et al.*, 2022; Wang *et al.*, 2023). Il existe également des interactions entre les ARNnc, ainsi les lncARN et les circARN peuvent réguler négativement les microARNs (Han *et al.*, 2020; Chao *et al.*, 2022; Ma *et al.*, 2023).

États Chromatiniens

La localisation et la combinaison de certaines marques épigénétiques, dont la méthylation de l'ADN et les modifications d'histones, conduisent à différents états chromatiniens. Chez *A. thaliana*, quatre états chromatiniens prédominants, couvrant 90% du génome, ont ainsi été décrits et associés à 12 modifications épigénétiques (11 modifications d'histones et la méthylation des cytosines de l'ADN) (Roudier *et al.*, 2011) (**Fig. I.25.A**). 54% des gènes présentent l'état chromatiniens 1 (CS1, combinaison de 6 marques histones) et sont situés dans des régions transcriptionnellement actives, tandis que les états chromatiniens 2 et 3 (CS2 et CS3, combinaisons de 3 marques histones, et 4 marques histones et la méthylation de l'ADN, respectivement) correspondent à des régions transcriptionnellement inactives, avec une majorité d'éléments transposables pour le CS3. L'état chromatiniens 4 (CS4) est associé à peu de marques épigénétiques et une très faible expression génique (Roudier *et al.*, 2011).

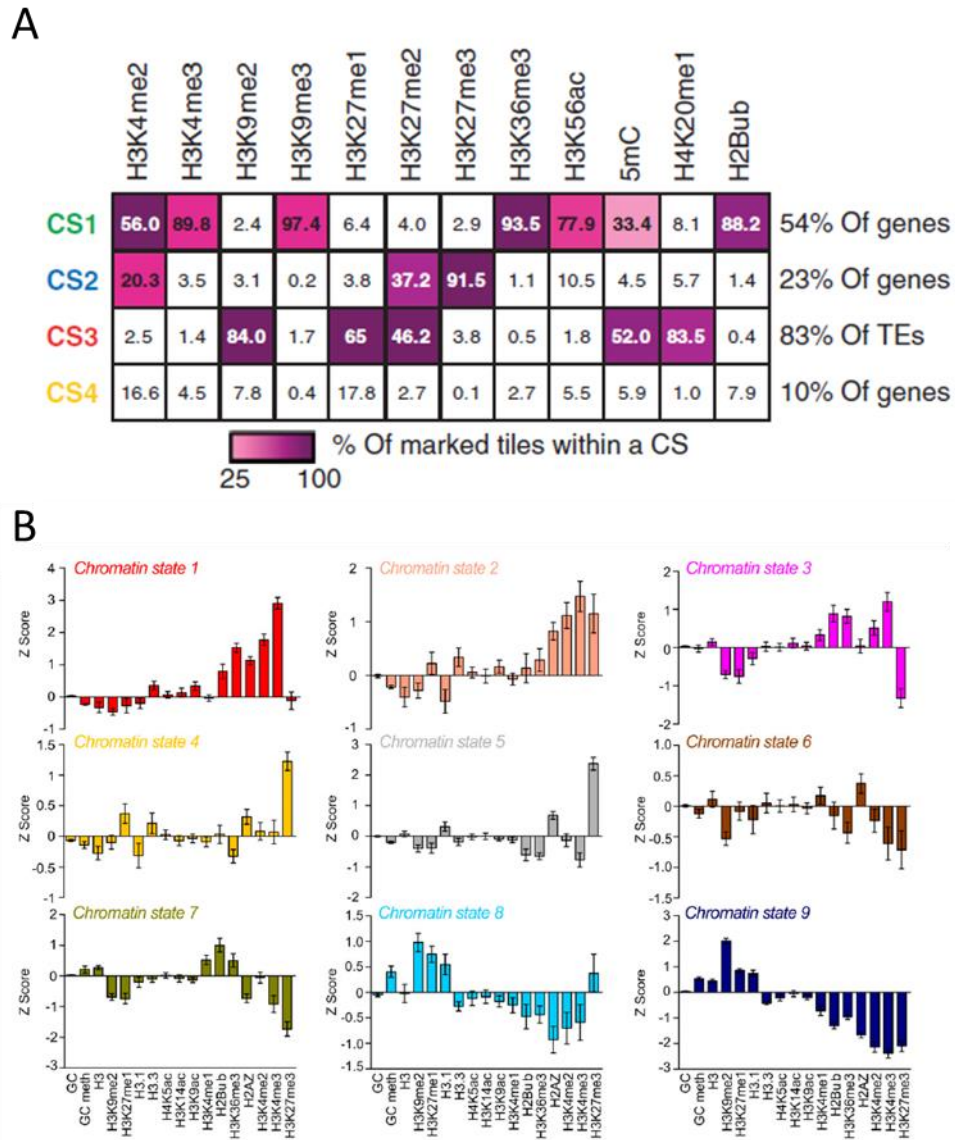


Figure I. 25. : Caractérisation des états chromatinien (CS) chez *A. thaliana* par (A) Roudier et al. (2011) et (B) Sequeira-Mendes et al. (2014). (A) Il existe selon Roudier et al. (2011) 4 états chromatinien caractérisés par 12 marques épigénétiques. Les lignes correspondent aux états chromatinien (CS1 à CS4) et les colonnes aux marques épigénétiques étudiées. La distribution des 12 marques chromatinienne sur les quatre CS est indiquée en couleurs pour des valeurs allant de 25 % (violet clair) à 100 % (violet foncé). (B) Plus tardivement, en utilisant 17 marques épigénétiques, Sequeira-Mendes et al. (2014) ont caractérisé 9 états chromatinien. Ces box-plot présentent la prévalence de chaque marque chromatinienne (sur l'axe des abscisses) au sein des 9 CS (en axe des ordonnées les z-score).

En utilisant plus de marques épigénétiques, Sequeira-Mendes et al. (2014) ont par la suite mis en évidence 9 états chromatiniens en se basant sur la répartition de 16 modifications épigénétiques sur la totalité du génome d'*Arabidopsis* dont 11 modifications d'histones, 4 variants d'histones et la méthylation des cytosines de l'ADN (Sequeira-Mendes *et al.*, 2014) (**Fig. I.25.B**).

Dans les prochains paragraphes, nous traiterons plus en détail les deux mécanismes épigénétiques que j'ai étudiés dans mon travail de thèse, la méthylation de l'ADN et les miARN.

2.3. Méthylation de l'ADN

2.3.1. Mise en place, maintenance et processus de déméthylation

La méthylation *de novo* de l'ADN chez les plantes peut se faire par la voie des ARN (RNA-directed DNA methylation, RdDM) de manière indépendante du contexte nucléotidique CG, CHG ou CHH. Cette voie se décompose en plusieurs étapes qui consistent 1) en la biosynthèse de petits ARN interférants (siRNA), 2) la production d'un ARN double brin, 3) l'assemblage d'un complexe composé des siARN double brin et de protéines ARGONAUTES (AGO) et 4) le recrutement de protéines méthyltransférases qui apposent un groupe méthyle sur les cytosines de l'ADN (revue dans Zhang et al., 2018).

La première étape est donc la transcription d'ARN simple brin complémentaire de la région cible, par l'ARN polymérase IV (**Fig I.26.A**), spécifique des plantes, et qui possède deux sous unités *NRPD1a* and *NRPD2* avec une activité catalytique (Onodera *et al.*, 2005; Herr *et al.*, 2005). Le recrutement de l'ARN polymérase IV se fait grâce à d'autres protéines telles que SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1 (SHH1) qui reconnaissent les marques H3K9me2 (Law *et al.*, 2011), DNA BINDING TRANSCRIPTION FACTOR 1 (DTF1) (Zhang *et al.*, 2013) et CLASSY1 (CLSY1), une protéine possédant un domaine SNF2 (Smith *et al.*, 2007). L'ARN simple brin ainsi transcrit est ensuite répliqué par l'ARN POLYMERASE ARN DEPENDANTE 2 (RDR2). Cet ARN double brin, aussi appelé pri-siARN (transcrit primaire) est clivé par l'action de protéines DICER LIKE (DCL), notamment DCL 3 et permet la production de petits ARN interférents (siARN) de 24 nucléotides (Wu *et al.*, 2012a). Enfin, un brin de siARN est chargé sur les protéines ARGONAUTE, AGO6 ou AGO4, recrutées elles-mêmes par la protéine KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR (KTF1) (He *et al.*, 2009).

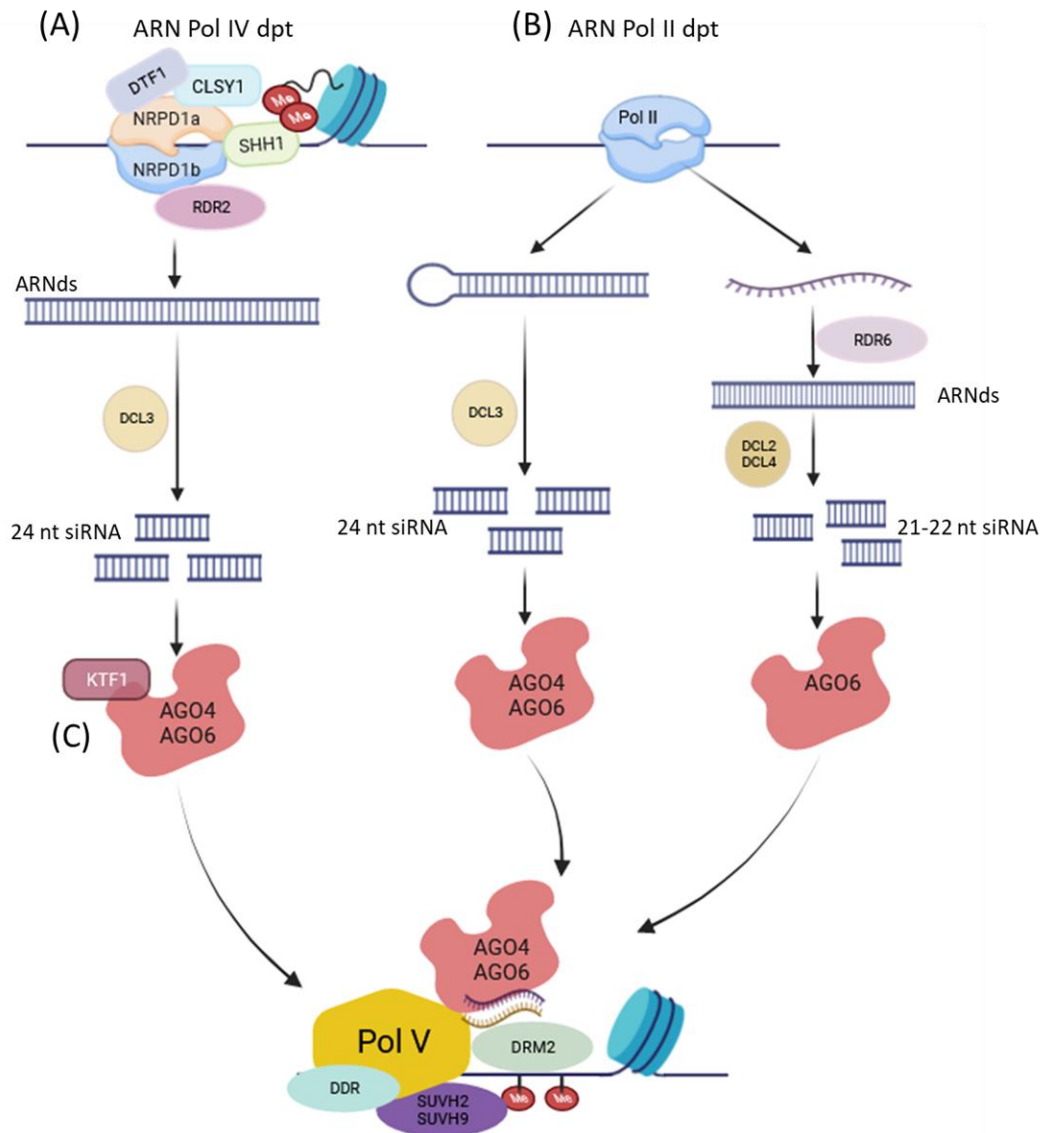


Figure I.26. : Méthylation *de novo* de l'ADN via la voie (A) ARN Pol IV dépendant et (B) ARN Pol II dépendant. (A) La protéine SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1 (SHH1) reconnaît les marques H3K3me2 et avec les protéines CLASSY1 (CLSY1) et DNA BINDING TRANSCRIPTION FACTOR 1 (DTF1), elles recrutent les deux sous-unités de l'ARN Pol IV, NRPD1a et NRPD1b qui permettent la transcription d'ARN simple brin répliqué par l'ARN POLYMERASE ARN DÉPENDANTE 2 (RDR2) en ARN double brin (ARNds). Cet ARN double brin, aussi appelé pri-siARN (transcrit primaire) est ensuite clivé par l'action de protéines DICER LIKE (DCL), notamment DCL 3 et coupé en petits ARN interférents (siARN) de 24 nucléotides. Un brin de siARN est chargé sur les protéines ARGONAUTE, AGO6 ou AGO4, recrutées elles-mêmes par la protéine KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR (KTF1). (B) Au niveau de séquences répétées, l'ARN polymérase produit des ARN en épingle à cheveux qui seront clivés par l'action de DCL3 ce qui produit des siARN de 24 nt. L'ARN polymérase peut également transcrire des ARN simple brin qui sont répliqués par RDR6 puis clivés par DCL2 et DCL4 en siARN de 21/22nt ensuite chargés sur AGO6. (C) Ces siARN sont chargés sur les protéines AGO et forment alors un complexe protéique guidé par complémentarité de séquence vers sa cible. Ce complexe, guidé par un long ARN non codant produit par l'ARN polymérase V, se fixe dans la région génomique à réprimer. Le positionnement de l'ARN polymérase V est régulé par les protéines SUVH9, SUVH2 et DDR qui fixe l'ADN méthyltransférase 2 (DRM2) et entraîne la méthylation des cytosines. Figure adaptée de Zhang et al. (2018)

Une partie de la méthylation *de novo* de l'ADN peut également être mise en place de manière indépendante de la voie RdDM (**Fig I.26.B**). En effet, l'ARN polymérase II est impliquée dans la transcription de séquences répétées intergéniques à faible nombre de copies (Zheng *et al.*, 2009). L'ARN polymérase II conduit à la production de siARN de deux tailles différentes. L'ARN polymérase II produit des ARN en forme d'épingle à cheveux qui seront clivés par l'action de la protéine DCL3, produisant alors des siARN de 24 nt. L'ARN polymérase II peut également produire des ARN simple brin qui vont, par l'action de RDR6, être répliqués en ARN double brin. Ces ARN double brin sont clivés par les protéines DCL2, DLC4 et forment des siARN de 21/22 nt. Ils sont ensuite chargés sur les protéines AGO6.

Qu'elle passe par la voie RdDM ou non, la méthylation *de novo* conduit à la production de siARN. Ces siARN sont chargés sur les protéines AGO et forment alors un complexe protéique guidé par complémentarité de séquence vers sa cible (**Fig I.26.C**). Ce complexe, guidé par un long ARN non codant produit par l'ARN polymérase V, se fixe dans la région génomique à réprimer (Wierzbicki, 2012). Le positionnement de l'ARN polymérase V est régulé par les protéines SUVH9 (SUPPRESSOR OF VARIATION 3-9 HOMOLOGUE PROTEIN), SUVH2 possédant un domaine SRA (Johnson *et al.*, 2008) et la protéine DDR (Zhong *et al.*, 2012). Ce complexe ainsi fixé recrute l'ADN méthyltransférase 2 (DRM2) qui méthyle les cytosines de la région génomique ciblée (Zheng *et al.*, 2007).

Après la réplication de l'ADN lors de la division cellulaire, le brin d'ADN fille est dénué de toute méthylation. L'ADN est donc hémi-méthylé et plusieurs mécanismes permettent sa méthylation et donc le maintien du niveau de méthylation dans la cellule. Ces mécanismes dépendent du contexte de méthylation des cytosines (**Fig I.27.A**).

Dans le contexte de la méthylation en CG de l'ADN, les deux protéines principales du maintien de la méthylation sont la CYTOSINE-DNA-METHYL-TRANSFERASE (MET1) et *VARIANT IN METHYLATION 1* (VIM1). MET1 et VIM1 sont capables de reconnaître les sites CG hémi-méthylés lors de la réplication (Saze *et al.*, 2003; Woo *et al.*, 2007, 2008). Ce complexe protéique MET1/VIM1 permet l'apposition de groupement méthyle sur les brins d'ADN juste transcrits (Kankel *et al.*, 2003).

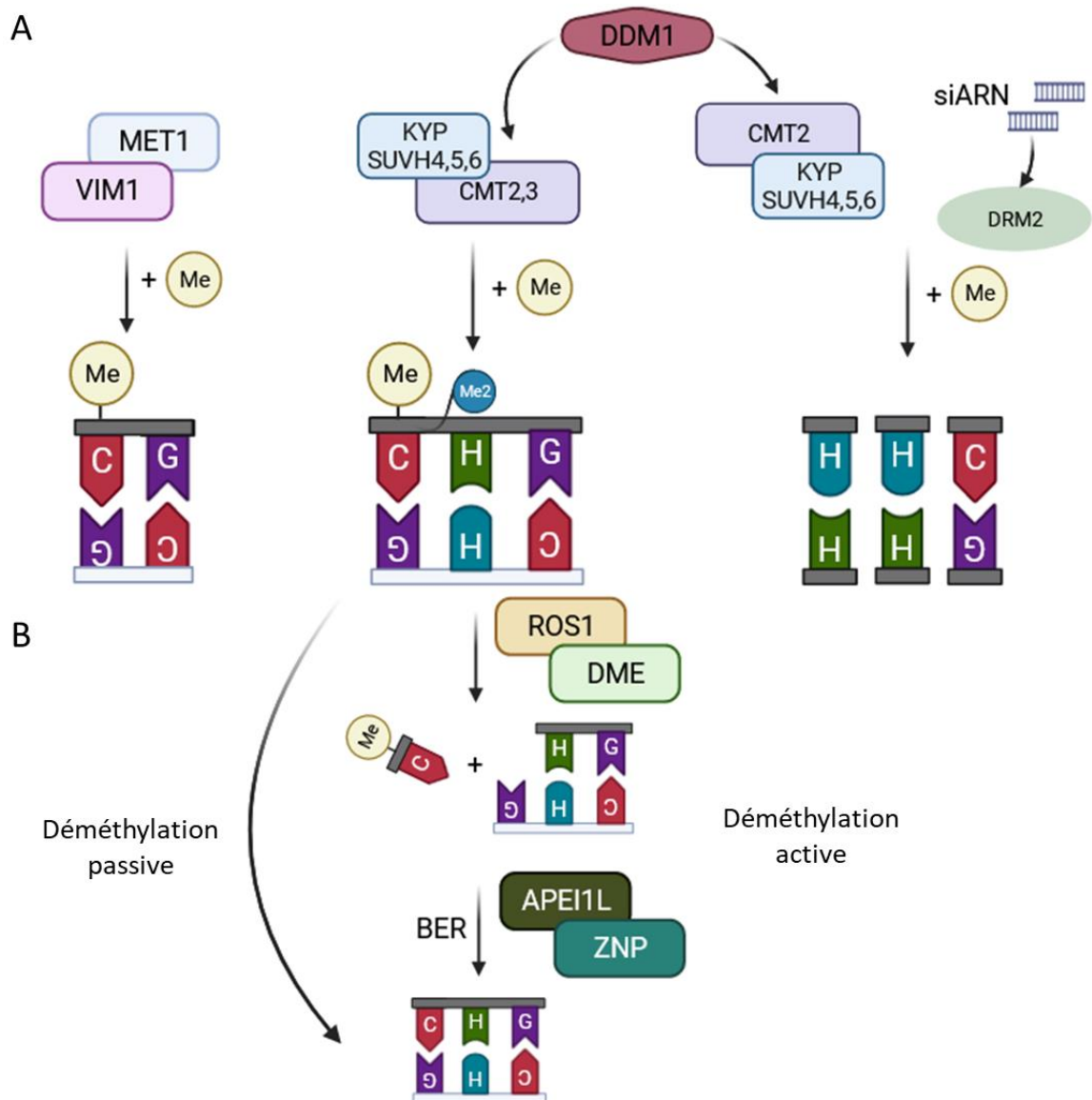


Figure I.27. : Maintenance et déméthylation de l'ADN. La maintenance de la méthylation de l'ADN (A) dépendant du contexte nucléotidique de la méthylation. Dans le contexte CG, le maintien de la méthylation dépend de CYTOSINE-DNA-METHYL-TRANSFERASE (MET1) et *VARIANT IN METHYLATION 1* (VIM1), reconnaissant le brin d'ADN hémi-méthylé et l'ajout d'un groupe méthyle sur le brin non méthylé. Dans le contexte CHG, les protéines KRYPTONITE (KYP), SUPPRESSOR OF VARIATION 3-9 HOMOLOGUE PROTEIN 4,5, 6 (SUVH) et les CHROMOMETHYLASES 3 et 2 (CMT2, CMT3) reconnaissent la marque histone H3K9me2 et l'apposition d'un groupe méthyle. Dans le contexte CHH, deux voies de maintien de la méthylation sont possibles : une voie passant par CMT2/KYP/SUVH et une voie passant par la voie dépendante de l'ARN (RddM) et les siARNs. La déméthylation de l'ADN (B) se fait passivement lorsque les mécanismes de maintien de la méthylation ne sont pas actifs ou de manière active. Lors de la déméthylation active, les protéines REPRESSOR OF SILENCING 1 (ROS1) ou DEMETER (DME) excisent la cytosine méthylée. Le processus de réparation des bases excisées (BER) via l'action d'enzymes telles que DNA-APURINIC OR APYRIMIDINIC SITE LYASE (APE1L), DNA phosphatase POLYNUCLEOTIDE 3'-PHOSPHATASE (ZNP) permettent le remplacement de la base excisée par une base non méthylée. (Lindroth *et al.*, 2001; Jackson *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2002; Malagnac *et al.*, 2002; Kankel *et al.*, 2003; Saze *et al.*, 2003; Morales-Ruiz *et al.*, 2006; Huettel *et al.*, 2006; Agius *et al.*, 2006; Woo *et al.*, 2007; Zemach *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2018b; Liu & Lang, 2020)

Dans le contexte CHG, deux CHROMOMETHYLASES (CMT) participent au maintien de la méthylation : CMT3 (Lindroth *et al.*, 2001) et dans une moindre mesure CMT2 (Stroud *et al.*, 2014). L'homologue de CMT3 chez le maïs, CMT1, possède deux domaines BROMO-ADJACENT HOMOLOGY (BAH) et CHROMO DOMAINS lui permettant de se lier à la méthylation localisée sur les histones 3 en lysine 9 (H3K9me₂) et un domaine SRA lui permettant de reconnaître les brins hémi-méthylés en CHG. Les protéines KRYPTONITE (KYP) et SUVH4, SUVH5, SUVH6 sont également capables de se fixer sur les brins hémi-méthylés et les marques d'histones H3K9me₂ (Jackson *et al.*, 2002; Malagnac *et al.*, 2002). L'interaction de ces protéines mène non seulement à la maintenance de la méthylation CHG, mais également à la maintenance de la marque épigénétique H3K9me₂.

Dans le contexte de la méthylation en CHH, le maintien de la méthylation est région dépendante. Dans les régions génomiques possédant de jeunes ou de courts transposons ainsi que des séquences répétées (Huettel *et al.*, 2006), le maintien de la méthylation se fait à travers la voie RdDM et l'implication de DRM2 (Zhang *et al.*, 2018b). CMT2, en revanche, maintient la méthylation en CHH dans l'hétérochromatine contenant l'histone H1 et qui n'est pas accessible par la voie RdDM. De la même manière que pour la méthylation en CHG, CMT2 agit de concert avec les protéines KYP, SUVH5 et SUVH6 (Zhang *et al.*, 2018b). Le maintien de la méthylation par l'action de CMT2 est également rendu possible par l'action du remodeleur chromatinien DDM1 (Zemach *et al.*, 2013).

L'absence des mécanismes impliqués dans la maintenance de la méthylation précédemment décrits conduit à la déméthylation passive de l'ADN (**Fig I.27.B**). A l'inverse, l'action conjointe d'enzymes permettant la déméthylation de l'ADN conduit au phénomène de déméthylation active (Liu & Lang, 2020). L'initiation de la déméthylation active se fait à travers l'action de protéines des familles de déméthylases ROS1 (REPRESSOR OF SILENCING 1) ou DEMETER (DME) (Choi *et al.*, 2002; Gong *et al.*, 2002). Ces déméthylases possèdent des activités glycolase et lyase. L'activité glycosylase retire la 5-méthylcytosine du squelette nucléique tandis que l'activité lyase clive l'ADN au site de l'enlèvement par deux réactions d'élimination β - and δ - (Morales-Ruiz *et al.*, 2006; Agius *et al.*, 2006). Une fois la 5-méthylcytosine excisée, le processus de réparation des bases excisées (bases excisions repair, BER) permet le remplacement de la base excisée via l'action de plusieurs enzymes telles que DNA-APURINIC OR APYRIMIDINIC SITE LYASE (APE1L), DNA phosphatase POLYNUCLEOTIDE 3'-PHOSPHATASE (ZDP) ainsi que l'ADN polymérase (Zhang *et al.*, 2018b; Liu & Lang, 2020).

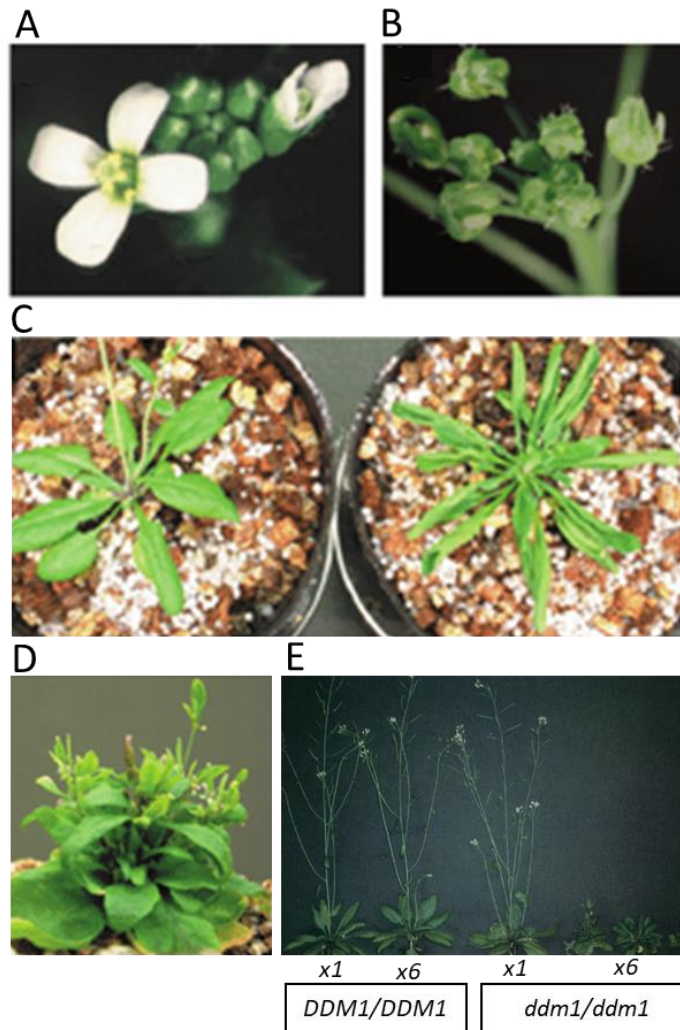


Figure I.28 : Phénotypes anormaux du mutant *ddm1* présentant une réduction du niveau global de méthylation de son génome. (A) Des fleurs normales de l'écotype sauvage Col-0 et (B) des fleurs présentant des sépales fins chez le mutant *ddm1-2*. (C) A gauche, une rosette de Col-0 et à droite, une rosette de *ddm1* présentant des feuilles enroulées. (D) exemple du phénotype « bonsaï » retrouvé chez *ddm1*. (E) Viabilité d'individus d'*Arabidopsis* portant l'allèle sauvage *DDM1/DDM1* ou l'allèle muté *ddm1/ddm1* à l'état homozygote après autofécondation sur une génération (x1) et 6 générations (x6). Images tirées de Kakutani et al., 1996; Kakutani et al., 2004.

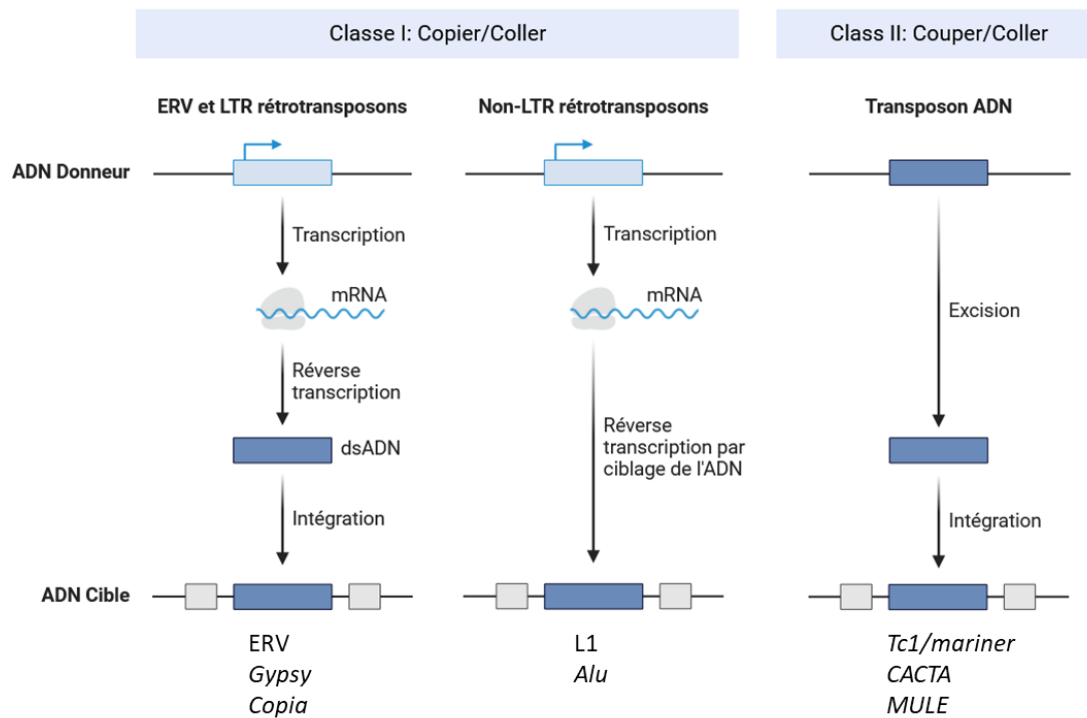
2.3.2. DDM1, une protéine remodelant la chromatine

DDM1 code une protéine SWI2/SNF2-like (SWItch/Sucrose Non-Fermentable) (Jeddeloh *et al.*, 1999) remodelant la chromatine et impliquée dans de nombreux processus de développement *via* le maintien de la méthylation. Un criblage de plusieurs mutants générés chez *A. thaliana* suite à l'action d'éthyl méthanesulfonate (EMS), agent mutagène, a permis l'identification de trois lignées présentant une réduction du niveau global de méthylation. Deux des lignées, nommées *ddm* pour leur phénotype de réduction du niveau de méthylation (decrease in DNA methylation), correspondent à deux allèles mutés différents du gène *DDM1* : l'allèle *ddm1-1/ddm1-1* (lignée A) et l'allèle *ddm1-2/ddm1-2* (lignée B) (Vongs *et al.*, 1993). La méthylation de ces mutants *ddm* est impactée au niveau du contexte CG mais également du contexte CHG. Les mutants *ddm1-1/ddm1-1* et *ddm1-2/ddm1-2* présentent une réduction de 85 à 70% par rapport à la méthylation de l'accession Col-0 sauvage et un développement anormal (**Fig. I. 28. A à D**) avec notamment des sépales plus fins, un enroulement des feuilles (phénotype « bonsaï ») et un retard du temps de floraison (Kakutani *et al.*, 1995, 2004; Kawanabe *et al.*, 2016). De plus, une perte de viabilité des plantes homozygotes *ddm1-2* a été observée lors de leur autofécondation sur six générations, suggérant un effet délétère de la mutation *ddm1* sur plusieurs générations (Kakutani *et al.*, 1996) (**Fig. I. 28. E**). DDM1 participe au maintien sous silence de certains transposons (**Encadré I.2**) dont les éléments transposables de type *TIR-MULE* ou *CACTA1* de classe II (Singer *et al.*, 2001; Kato *et al.*, 2004).

2.3.3. Méthylome chez *A. thaliana* et autres *Brassicaceae* et effet de la méthylation sur la transcription

Le niveau de méthylation des 5 chromosomes d'*A. thaliana* a été établi dans différents écotypes (Zhang *et al.*, 2006b; Cokus *et al.*, 2008). Le niveau de méthylation est très élevé au niveau des péricentromères, des séquences répétées et des régions produisant des petits ARN interférents (siARN) (Zhang *et al.*, 2006b; Cokus *et al.*, 2008) (**Fig I.29.A et B**). Au niveau des séquences codantes, les régions transcrites sont méthylées à hauteur de 30% pour le contexte CG, et à moins de 10% pour les contextes CHH et CHG. Au niveau des pseudogènes et des transposons, les régions comprises entre le site d'initiation de la transcription (TSS) et le site de terminaison de la transcription (TTS) sont méthylées à plus de 60% de méthylation en CG, 10% de méthylation en CHH et environ 30% de méthylation en CHG. Enfin, au niveau des séquences répétées inversées ou en tandem, le niveau de méthylation est élevé dans les trois contextes.

Encadré I.2. : Classification des éléments transposables chez les plantes.



Les éléments transposables de classe I sont également appelés rétrotransposons. Ces éléments transposent en suivant le principe d'un mécanisme « copier/coller » durant lequel l'ARN polymérase transcrit l'élément en ARN simple brin qui est ensuite rétrotranscrit en ADN et intégré dans la région génomique cible, pour les rétrotransposons LTR (*long terminal repeat*) tels que *Gypsy* ou *Copia*). Les rétrotransposons non-LTR, comme les LINE (*long interspersed elements*) ou les SINE (*short interspersed elements*) sont rétrotranscrits directement au niveau de la région génomique ciblée. Les éléments transposables de classe II, tels que *CACTA* ou *MULE*, sont des transposons ADN et reposent sur un mécanisme de « couper/coller » durant lequel ils sont excisés de leur localisation pour réintégrer une autre région génomique. Chaque classe regroupe des éléments transposables autonomes, c'est-à-dire codant toutes les enzymes nécessaires à leur transposition ou non-autonomes, qui utilisent la machinerie de transcription d'autres éléments. Encadré adapté de Lisch, 2013; Lanciano and Cristofari, 2020; Pedro et al., 2021.

Chez *A. thaliana*, des motifs nucléotidiques sont associés à la méthylation dans chaque contexte (Cokus et al., 2008). Dans le contexte CG, le motif CCG est associé à une plus forte méthylation que le motif ACGT. Dans le contexte CHG, le motif CCG est associé à une plus faible méthylation que CXG (ou X est A, T ou C) et dans le contexte CHH, le motif CTA semble être le plus favorable à la méthylation que le motif CCC (**Fig.I.29.C**). Par ailleurs dans le cadre du projet « 1001 genomes » d'*A. thaliana*, le méthylome des feuilles de 998 accessions cultivées à plusieurs températures (10, 16 et 23°C) a été caractérisé (Kawakatsu *et al.*, 2016a). Cette analyse globale a permis de mettre en évidence une corrélation entre le niveau moyen de méthylation des gènes et la localisation géographique des accessions (**Fig.I.30. A**) et que plus de 25% des gènes présentaient soit une méthylation type CH (*gene body methylation, gbm*) soit une méthylation de type CHG et CHH, comme la méthylation retrouvée au niveau des éléments transposables (**Fig.I.30. B**). Finalement, cette étude a également permis de mettre en évidence une variation épi-allélique de certains gènes (environ 7 000 gènes) entre les accessions présentant donc soit un épiallèle de type CG ou soit un de type CHG/CHH.

De manière similaire à *A. thaliana*, le génome du génotype Darmor-*bzh* de *B. napus* présente une méthylation importante de l'ADN au niveau des séquences répétées (Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020). De plus en plus d'études rapportent du rôle de la méthylation de l'ADN chez les *Brassica* dans les processus de dominance subgénomique (Parkin *et al.*, 2014; Bird *et al.*, 2021; Hu *et al.*, 2023) ou lors de l'application de contraintes abiotiques, par exemple dans la tolérance à une élévation de la température chez *B. rapa* (Liu *et al.*, 2018) ou la tolérance au froid de *B.napus* (Zheng *et al.*, 2022).

L'effet de la méthylation de l'ADN sur la transcription des gènes est dépendant de sa localisation. En effet, la méthylation des régions promotrices des gènes et des éléments transposables est majoritairement associée à une répression de l'expression (Xu *et al.*, 2019). Le rôle de la méthylation CG localisée au niveau du corps des gènes reste plus complexe mais de plus en plus de travaux rapportent une corrélation de la méthylation du corps des gènes avec une expression des gènes (Bewick & Schmitz, 2017; Muyle *et al.*, 2022)

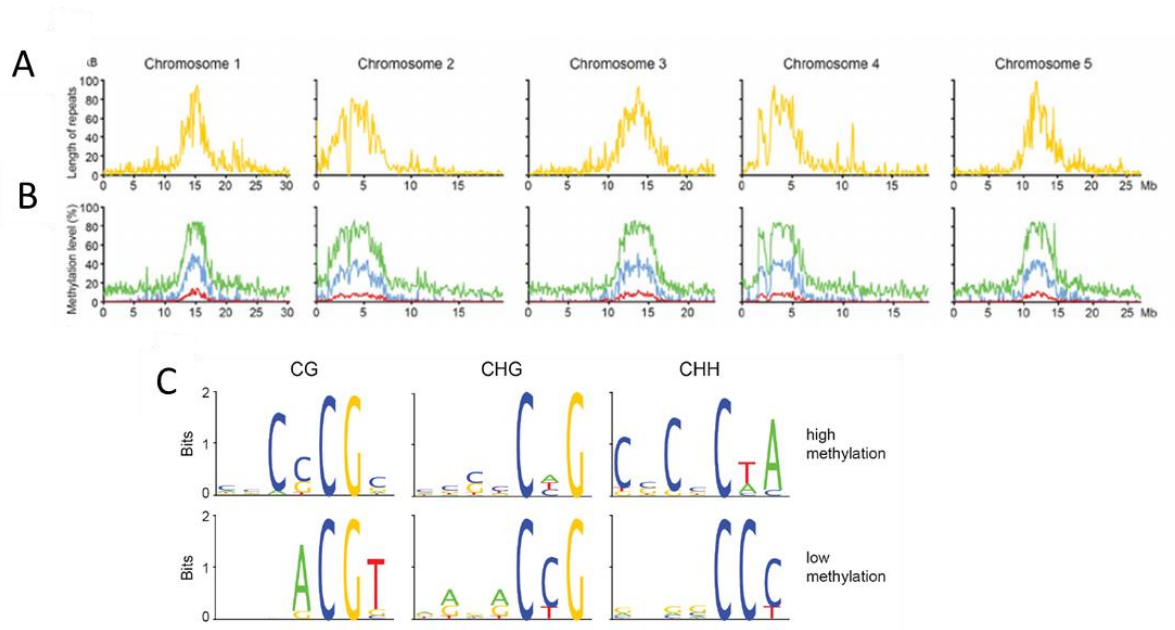


Figure I. 29. : Caractérisation de la méthylation du génome d'*A. thaliana* : A) Répartition de la méthylation de l'ADN sur les 5 chromosomes d'*A. thaliana*, B) Répartition des séquences répétées sur les 5 chromosomes d'*A. thaliana* et C) Contextes nucléotidiques préférentiellement méthylés (haut) ou non méthylés (bas) identifiés chez *A. thaliana* sur la totalité du génome. Figure adaptée de Cokus et al. (2008).

2.3.4. Implication de la méthylation dans le développement et les réponses des plantes aux stress biotiques et abiotiques

Le rôle de la méthylation dans le contrôle de l'expression génique au niveau transcriptionnel et de la stabilité du génome *via* la répression de l'expression des éléments transposables, lui confère une position essentielle dans le contrôle de différents processus physiologiques tels que le développement ou la réponse des plantes aux stress biotiques ou abiotiques.

La méthylation dans le développement des plantes

La création d'un quintuple mutant *mddcc* altéré au niveau des gènes codant les ADN méthyltransférases (*MET1*, *DRM1*, *DRM2*, *CMT3* et *CMT2*), et ne présentant plus de méthylation des cytosines, a permis l'évaluation du rôle de la méthylation dans le développement d'*A. thaliana* (He *et al.*, 2022). Le quintuple mutant *mddcc* présente un retard de croissance important avec une taille nettement plus réduite (environ 86 %) que les plantes sauvages et ne présente pas de transition florale. La méthylation de l'ADN est impliquée durant certains processus développementaux et notamment lors du développement embryonnaire chez *Arabidopsis* (Ibarra *et al.*, 2012; Ingouff *et al.*, 2017; Bouyer *et al.*, 2017) ou durant la formation des gamètes (Calarco *et al.*, 2012). Bartels *et al.* (2018), dans leur revue, montrent que le niveau de méthylation dans les trois contextes nucléotidiques CG, CHG et CHH dépend des tissus végétaux et des espèces, pouvant ainsi supposer un rôle de la méthylation de l'ADN spécifique au tissu au sein d'une espèce (He *et al.*, 2022).

La méthylation joue aussi un rôle dans les processus de division cellulaire au niveau des racines et des parties aériennes (Bartels *et al.*, 2018; Chen *et al.*, 2018). Bien que moins d'études ont été réalisées à ce niveau, chez *Arabidopsis* le gène *DDM1* est exprimé à l'extrémité de la racine et dans le méristème apical des parties aériennes (SAM), cette expression étant notamment dépendante de l'accumulation des SA (Bennett *et al.*, 2021). D'autres gènes impliqués dans les processus de méthylation sont exprimés dans les racines, comme la *chromométhylase 3* (*CMT3*) dont l'expression est augmentée lors de l'application d'auxine (Bennett *et al.*, 2021). Plusieurs gènes impliqués dans les processus de méthylation sont exprimés au niveau du SAM, dont *DDM1*, *CMT3* et *DRM3*, l'expression de certains étant modulé par les hormones. *DRM3*, par exemple, est exprimé plus fortement lors de l'application de cytokinines (Bennett *et al.*, 2021). La méthylation de l'ADN est aussi impliquée dans la coordination du cycle cellulaire (Shim *et al.*, 2022).

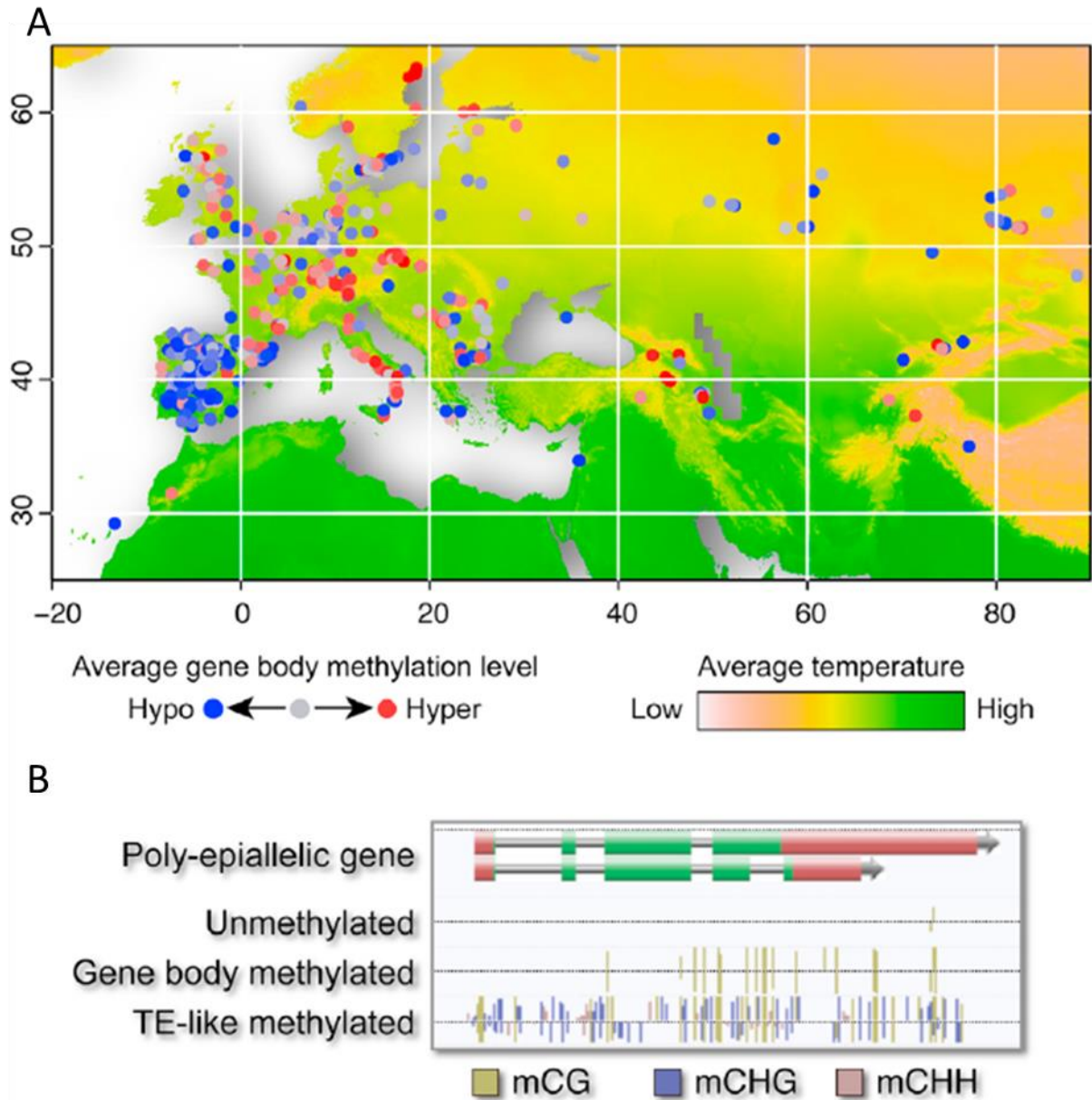


Figure I.30. : Caractérisation du niveau de méthylation d'accessions naturelles d'*A. thaliana* issues de différents climats et régions géographiques. A) Localisation géographique et température moyenne des accessions naturelles d'*A. thaliana* évaluées : certaines accessions présentent en moyenne une hypométhylation des gènes (rond bleu) et d'autres présentent en moyenne une hyperméthylation des gènes (rond rouge). B) Caractérisation des contextes de méthylation au niveau d'un gène : le corps des gènes est méthylé dans le contexte CG. Une méthylation type des transposons signifie une méthylation du corps du gène enrichie dans les contextes CHG et CHH. Figure de Kawakatsu et al. (2016).

La méthylation dans la réponse des plantes aux stress abiotiques

L'exposition des plantes à des stress abiotiques peut conduire à des modifications du niveau de méthylation de l'ADN. En effet, l'application d'une température de 32°C pendant 6h sur des cultures de microspores de *B. napus* entraîne une variation du niveau de méthylation de 96 régions génomiques (DMR) (Li *et al.*, 2016a), dont certaines sont impliquées dans le contrôle du statut redox des cellules. Lors d'un stress thermique (37°C pendant 2h), le taux de méthylation global du génome est plus faible chez le génotype tolérant à la température que chez le génotype sensible, suggérant un rôle de l'hypométhylation dans la tolérance des plantes au stress thermique (Gao *et al.*, 2014). Chez le maïs, Qian *et al.* (2019) ont identifié 325 DMR lors d'une exposition à une température de 42°C pendant 8h. Chez le sésame (*Sesamum indicum*), la sécheresse induit une augmentation massive du taux de méthylation global tandis qu'un excès hydrique entraîne sa diminution (Komivi *et al.*, 2018). Chez *A. thaliana*, l'application d'un stress salin conduit à une hypométhylation globale du génome des plantules soumises à cette contrainte (Arikan *et al.*, 2018).

Cette modulation du niveau de méthylation global lors de l'application de stress abiotiques peut notamment s'expliquer par l'impact direct des facteurs abiotiques sur les voies de la méthylation *de novo*, du maintien de la méthylation ou des processus de déméthylation. Le mutant *cmt2* d'*Arabidopsis*, altéré dans la méthylation *de novo* est ainsi plus tolérant à une température supérieure à 37°C que les individus sauvages (Shen *et al.*, 2014). L'application d'un stress thermique de 38°C pendant 24h conduit, chez *A. thaliana*, à l'induction des gènes impliqués dans la méthylation tels que *NRPD1* et *NRPE1*, les deux sous-unités de l'ARN Pol IV, les méthyltransférases *MET1*, *CMT3* et *DRM2* ainsi que de la déméthylase *ROS1* (Naydenov *et al.*, 2015). Lors de la combinaison d'un déficit hydrique et d'un stress thermique (40°C) chez le blé (*Triticum aestivum*), Gahlaut *et al.* (2020) rapportent l'induction de *CMT2*, *DRM10* et *DNMT2*. Une sécheresse appliquée seule entraîne également l'expression de *CMT2* et *DRM2* chez l'aubergine (*Solanum melongena*) (Moglia *et al.*, 2019). Les gènes codant les sous-unités de l'ARN polymérase IV sont également induits lors de l'application d'un stress salin chez *A. thaliana* (Arikan *et al.*, 2018). En revanche, la combinaison d'un stress thermique (50°C) et d'un stress salin chez *B. napus* entraîne une répression des chromométhylases et la surexpression de *DNMT2* (Fan *et al.*, 2020).

Les stress abiotiques peuvent également avoir un effet sur le niveau de méthylation de gènes impliqués dans les mécanismes de tolérance aux stress environnementaux. Chez le pois, une température de 4°C conduit en plus d'une modulation du niveau de méthylation globale à une méthylation des gènes spécifiques : l'hyperméthylation d'une E3 ubiquitine ligase pourrait, par exemple, conduire au maintien de l'intégrité de facteur de transcription de type *DREB* et participer à la réponse à un stress froid (Rakei *et al.*, 2016). Chez le pommier, un déficit hydrique entraîne une modulation du niveau de méthylation de nombreux facteurs de transcription tels que *AP/EREBP*, *WRKY* ou *NAC* (Xu *et al.*, 2018). Un déficit hydrique entraîne chez le riz une déméthylation du promoteur du gène *ZFP96* et une hyperméthylation des gènes *ZFP36* et *ZFP35* en aval du gène ou au niveau du promoteur, respectivement (Ahmad *et al.*, 2019). La méthylation d'autres gènes, codant des cytochromes P50 (CYP), jouerait également dans la réponse du riz à un stress hydrique (Waseem *et al.*, 2021).

La méthylation dans la réponse des plantes stress biotiques

Les contraintes biotiques conduisent également à une modification du méthylome chez les plantes. Une baisse de la méthylation globale a été observée lors de l'infection du peuplier par *Lonsdalea populi* (Xiao *et al.*, 2021), avec notamment une hypométhylation plus importante chez le génotype résistant que chez le génotype sensible. Chez le riz une hypométhylation du génome par un traitement chimique (5-azadeoxycytidine) entraîne une plus grande résistance à *Xanthomonas oryzae* (Akimoto *et al.*, 2007). L'infection d'*A. thaliana* par *H. schachtii* conduit par exemple à une déméthylation des gènes codant des protéines et des éléments transposables (Hewezi *et al.*, 2017).

Les voies de la méthylation *de novo*, de maintien de la méthylation et de déméthylation sont également impactées lors de l'application de stress biotiques. Chez *A. thaliana*, l'évaluation de plusieurs mutants altérés dans la méthylation *de novo* ou le maintien de la méthylation (*nrpe1*, *ago4*, *drd1*, *rdr2*, et *drm1drm2*) ont montré une plus grande sensibilité à l'infection par *Botrytis cinerea* et *Plectosphaerella cucumerina* (López *et al.*, 2011). Les mutants altérés dans leur niveau de méthylation (*met1-3*, *ddc*, *drm1-2*, *drm2-2*, *cmt3-11* et *ddm1*) chez *A. thaliana* sont plus résistants à l'infection par *P. syringae* (Downen *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2023). L'infection du peuplier par *L. populi* entraîne une modulation de l'expression d'enzymes impliquées dans la méthylation (Xiao *et al.*, 2021).

A. Obligatory epiallele



B. Faciliated epiallele



C. Pure epiallele

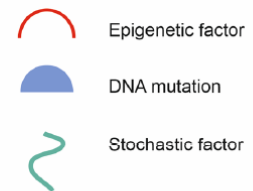


Figure I. 31. : Les différents types d'épiallele. A) Les épialleles obligatoires sont les épialleles uniquement liés à une variation nucléotidique. B) Les épialleles facilités sont liés à la présence d'une variation nucléotidique ainsi qu'à la présence d'un facteur aléatoire et C) les épialleles purs sont seulement dus à des événements aléatoires. Achrem et al. (2023)

Chez la vigne, l'infection par *Plasmopara viticola* entraîne une répression des *DNMT* et *CMT* et conduit à une hypométhylation globale lors d'une interaction incompatible. *A contrario*, l'interaction compatible est associée à une augmentation du niveau de méthylation global (Pereira *et al.*, 2022). Un traitement avec l'éliciteur *flg22* conduit à l'inhibition de la voie RdDM et à la restriction de la multiplication de *P. syringae* (Yu *et al.*, 2013).

Chez *A. thaliana*, les mutants altérés dans l'expression de l'ARN polymérase V accumulent plus de SA suite à l'infection par *P. syringae* et présentent une meilleure résistance par rapport au génotype sauvage (López *et al.*, 2011). Halter *et al.* (2021) ont également montré que la flagelline (*flg22*) induisait l'expression de *ROSI* qui déméthylait la région promotrice de facteurs de transcription type *WRKY*, impliqués dans l'immunité des plantes. L'infection du peuplier par *L. populi* entraîne également la surexpression des gènes *PR* notamment impliqués dans la production et l'accumulation de SA (Xiao *et al.*, 2021).

Une déméthylation globale du génome ne garantit cependant pas une réponse de résistance de la part de la plante. Dans l'interaction *A. thaliana* avec *Agrobacterium tumefaciens*, une hypométhylation des oncogènes favorise le développement des galles et une hyperméthylation globale du génome permet une meilleure résistance de la plante à l'infection (Gohlke *et al.*, 2013).

2.3.5. Stabilité de la méthylation : épigénétique transgénérationnelle

Une partie de la méthylation est considérée comme stable et transmise d'une génération à l'autre, faisant ainsi partie de l'épigénétique dite héréditaire, on parle dans ce cas d'épimutations et d'épiallèles. Il existe plusieurs types d'épiallèles héréditaires caractérisés par Richards (2011) qui dépendent du contexte nucléotidique de l'épimutation. Les épiallèles obligatoires, tout d'abord, sont des épimutations strictement liées à des variations de séquence. Un épiallèle obligatoire peut ainsi être dû à la présence d'un transposon. La méthylation de l'ADN destiné à réprimer l'activité de ce transposon se propage le long de l'ADN par le phénomène de « spreading » (Ahmed *et al.*, 2011; Quadrana *et al.*, 2016). Une seconde catégorie comporte les épiallèles facilités qui peuvent être dus à la présence d'une variation de séquence mais se produisent de manière probabiliste et ne sont donc pas systématiques. La troisième classe d'épimutations regroupe les épimutations appelées épiallèles purs, qui ne sont pas dus à des variations génétiques mais seulement à des événements aléatoires tels que des erreurs dans les mécanismes de maintien de méthylation de l'ADN (Richards, 2011; Achrem *et al.*, 2023) (**Fig. I.31.**).

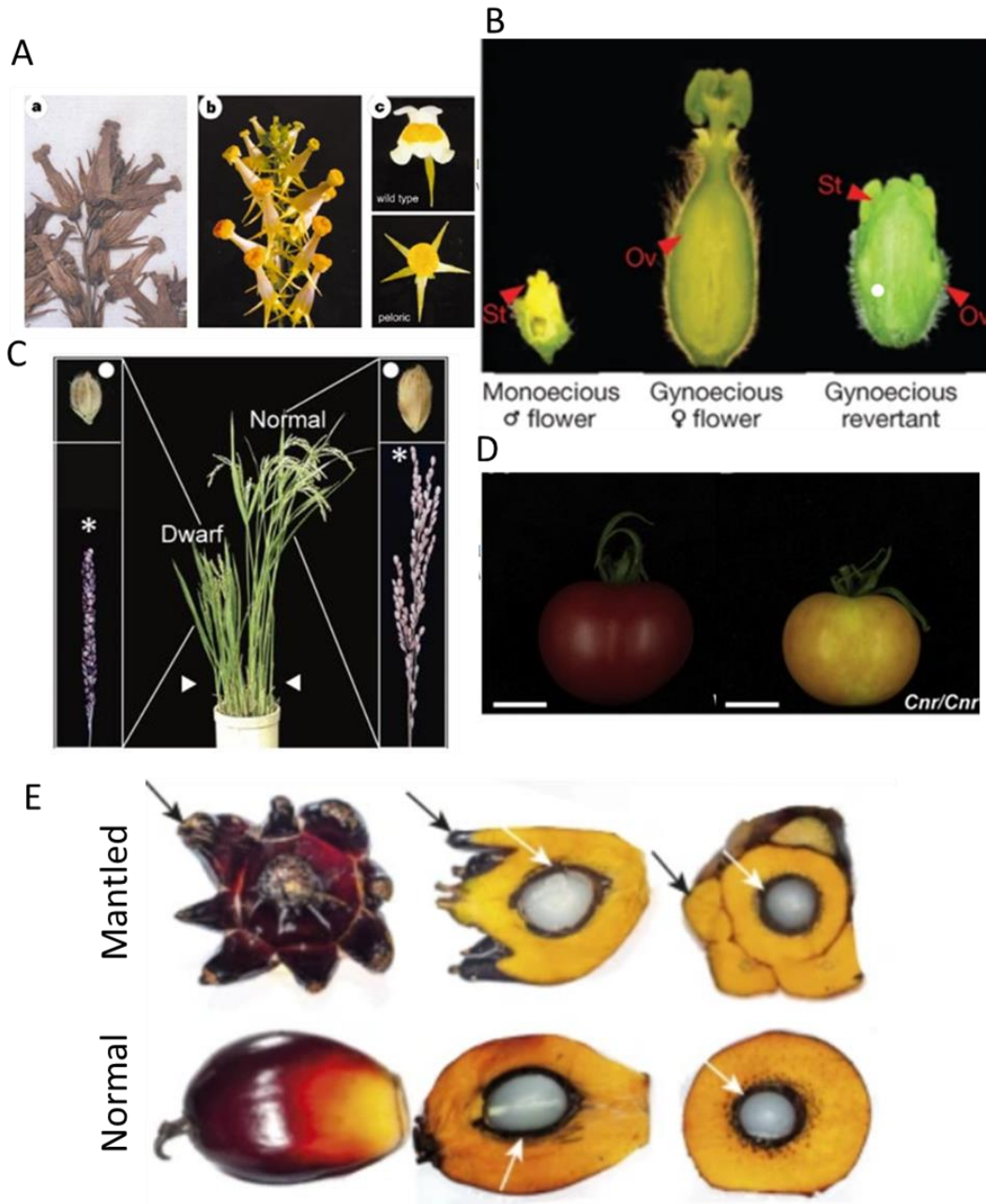


Figure I. 32. : Epimutations naturelles identifiées chez plusieurs espèces végétales et impact sur le phénotype. A) a, spécimen original du mutant *peloric* collecté par Linneaus ; b, inflorescence d'un mutant *peloric* vivant et c, vue de face de la fleur sauvage de *Linaria* comparée à la fleur du mutant *peloric* (Cubas *et al.*, 1999). B) Phénotypes de fleur mâle monoïque, fleur femelle gynoïque et fleur gynoïque partiellement inversée. Ov,ovaire; st, étamine chez le melon (Martin *et al.*, 2009). C) Morphologie globale du mutant *dwarf* (Centre) et vue agrandie de sa panicule et de ses graines naines dans les talles naines (à gauche) et panicule et graines normales dans des talles normaux (à droite). La pointes des flèches indiquent les talles (pousses de branches végétatives), les astérisques indiquent les panicules (inflorescences) et les points blancs indiquent les grains (Miura *et al.*, 2009). D) Phénotype d'individu sauvage et mutant *cnr/cnr* du cultivar Liberto de tomate à l'étape de maturité (Wang *et al.*, 2020). E) Phénotype d'un fruit normal et d'un fruit « mantled » du palmier à huile. Le fruit est montré en complet à gauche, en coupe longitudinale au milieu et en coupe transversale à droite. Les flèches noires indiquent la présence de pseudo-carpelles chez les fruits mantled. Les flèches blanches indiquent les noyaux (Ong-Abdullah *et al.*, 2015).

La fréquence d'apparition des épimutations naturelles chez *A. thaliana* a été estimée grâce à la création et l'utilisation de lignées accumulatrices de mutations (MA lines) (Shaw *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2011). L'utilisation de ces lignées a permis d'estimer que, dans un contexte de méthylation en CG, il y a $2,56 \cdot 10^{-4}$ nouvelles méthylations par génération tandis que la perte de méthylation était estimée à $6,30 \cdot 10^{-4}$ par génération (Schmitz *et al.*, 2011; van der Graaf *et al.*, 2015). Ces taux d'épimutations sont 10^5 fois plus élevés que le taux de mutation génétique rapporté par Weng *et al.* (2019) ($6,95 \cdot 10^{-9}$). Cependant, jusqu'à présent, aucune modification de phénotype n'a été décrite suite au changement du niveau de méthylation d'une cytosine seule et il convient donc de s'intéresser plutôt à l'identification de régions différentiellement méthylées, appelées DMR, dont le taux d'apparition est du même ordre de grandeur que le taux de mutation génétique (Becker *et al.*, 2011).

2.3.5.1. Identification d'épiallèles

Plusieurs épiallèles purs ont été identifiés chez les plantes. L'une des premières épimutations décrite est le mutant *peloric* ou *Peloria* de *Linaria vulgaris*. Ce mutant a été découvert en 1742 par un botaniste d'Uppsala sur une île près de Stockholm (Gustafsson, 1979). Le nom de ce mutant, *peloria*, signifie « monstre » en latin et a été donné par le botaniste Linnaeus quelques années plus tard, en 1744. Ce mutant présente une fleur à symétrie radiale avec 5 pétales. Luo *et al.* (1996) ont démontré que la différence phénotypique observée chez *peloria* était notamment due à une variation au niveau du gène *CYCLOIDEA*. Plus tard, Cubas *et al.* (1999) ont mis en évidence que la variation au niveau du gène *CYCLOIDEA* à l'origine du phénotype *peloria* est une épimutation naturelle : le phénotype mutant *peloria* est observé lorsque la région codante de ce gène est hyperméthylée, dans les trois contextes, CG, CHH et CHG (Ehrenhofer-Murray, 2021) (**Fig. I. 32.A**), entraînant l'expression réduite du gène *CYCLOIDEA*. Le maintien sur plusieurs décennies, voire siècles de l'épiallèle hyperméthylé serait majoritairement dû à l'action des chromométhylases CMT3 et CMT2.

D'autres épimutations, ont été identifiées et associées à des modifications de la séquence nucléotidique. Ainsi, l'insertion d'un transposon dans la région promotrice du locus *gynoecious* (*g*) entraîne l'hyperméthylation du gène *CmWIP1* chez le melon et la formation de fleurs mâles (Martin *et al.*, 2009) (**Fig. I. 32.B**). Chez le riz, la présence de séquences répétées en amont du gène *DWARF1* entraîne la méthylation de ce gène et sa répression.



Figure I.33. : Phénotype de la plante homozygote pour l'allèle sauvage *MET1* (+/+) et de la plante homozygote pour l'allèle mutant *met1* (-/-). La plante homozygote pour l'allèle muté *met1* présente un retard de floraison. Barre d'échelle = 2 cm. (Saze *et al.*, 2003)

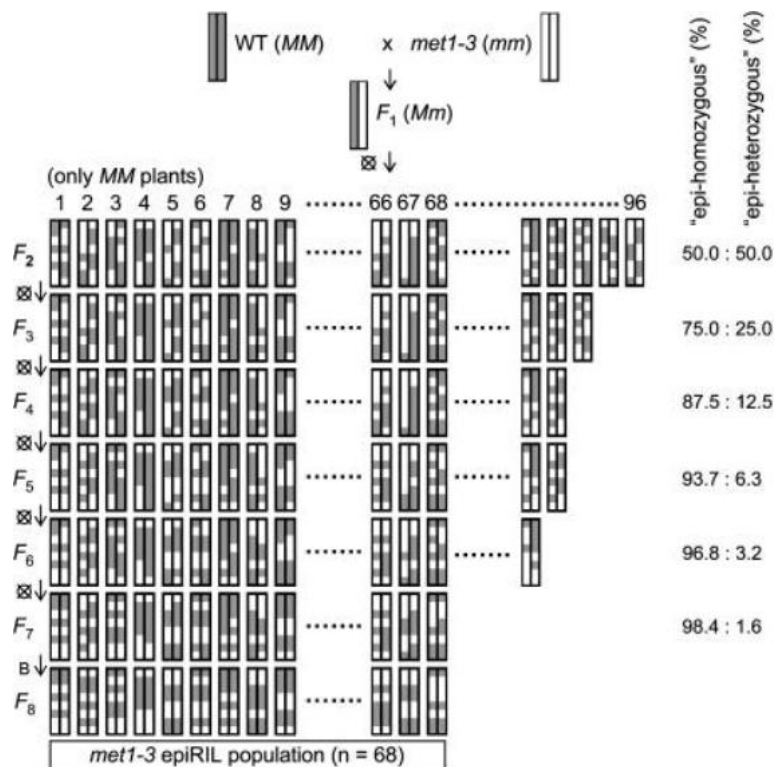


Figure I. 34. : Construction de la population epiRIL issue du croisement entre Col-0 sauvage et Col-0 muté dans le gène *MET1* (*met1-3*). Les segments de chromosomes hérités de chacun des deux parents sont indiqués en gris pour le type sauvage (WT, MM) et en blanc pour le type muté *met1-3* (*met1-3*, mm). Huit générations d'autofécondation (vertical) ont été réalisées (F₂ à F₈). Les niveaux d'épi-homozygotie/épi-hétérozygotie au sein de la population ont été évalués à chaque génération et sont présentés à droite. Schéma de (Reinders *et al.*, 2009)

Les plantes *dwarf* et les graines qu'elles produisent sont ainsi plus petites que celles du génotype sauvage de riz (Miura *et al.*, 2009) (**Fig. I. 32.C**). Quadrana *et al.* (2014) ont également démontré que l'état de méthylation du transposon *SINE* chez la tomate, localisé dans la région promotrice du gène *VTE3(1)* (*Vitamin E 3*) conduisait à la modulation de la quantité de la vitamine E via la synthèse des formes γ et α du tocophérol. Chez le cultivar de tomate Liberto (à chair rouge), le mutant *Colorless non-ripening* (*cnr*) est caractérisé phénotypiquement par un retard de maturation du fruit et une couleur orangée de sa chair (Manning *et al.*, 2006). Ce phénotype est dû à l'hyperméthylation d'une région de 300 paires de bases 2kbp en amont du locus *CNR* et qui pourrait être un élément transposable du type COPIA (**Fig. I. 32.D**). Le phénotype anormal du fruit chez le palmier à huile appelé « Mantled » est causé par un épiallèle dû à la présence du rétrotransposon *karma* au niveau d'un intron du gène *DEFICIENS* : la forme hyperméthylée de cet épiallèle (The Good Karma epiallele) conduit à la formation de fruit normaux tandis que la forme hypométhylée de cet épiallèle (the Bad Karma epiallele) mène à une version altérée du fruit (Ong-Abdullah *et al.*, 2015) (**Fig. I. 32.E**).

2.3.5.2. Identification d'épimutations induites impliquées dans la variabilité phénotypique

L'étude du rôle des épimutations dans la variabilité phénotypique, qui s'avère être complexe au vu de la difficulté de distinguer l'effet des épimutations de celui des variations génétiques, a été rendue possible par la création de populations en ségrégation au niveau épigénétique (c'est-à-dire des lignées génétiquement similaires mais présentant des épigénomes variés). Chez *A. thaliana*, deux populations épigénétiquement recombinantes (epiRIL) ont ainsi été créées via l'utilisation de deux mutants présentant une réduction globale de leur niveau de méthylation : *met1-3* et *ddm1-2*. Le mutant homozygote *met1-3*, qui présente une réduction du niveau de méthylation global, présente des retards de croissance et de floraison comparés à la plante présentant la version sauvage du gène *MET1* à l'état homozygote (Saze *et al.*, 2003) (**Fig. I.33.**). Le croisement du mutant *met1-3* avec l'écotype sauvage Col-0 a conduit à la production de 96 individus F2 (Reinders *et al.*, 2009) (**Fig. I.34.**). Puisque la viabilité des individus mutés pour *met1-3* est très basse, seuls les individus possédant l'allèle sauvage de *MET1* à l'état homozygote ont été autofécondés jusqu'à la 7^{ème} génération. Du fait d'une perte de fitness au cours des générations chez les epiRIL ainsi créées, seules 68 des 96 lignées ont pu être amenées à la 8^{ème} génération.

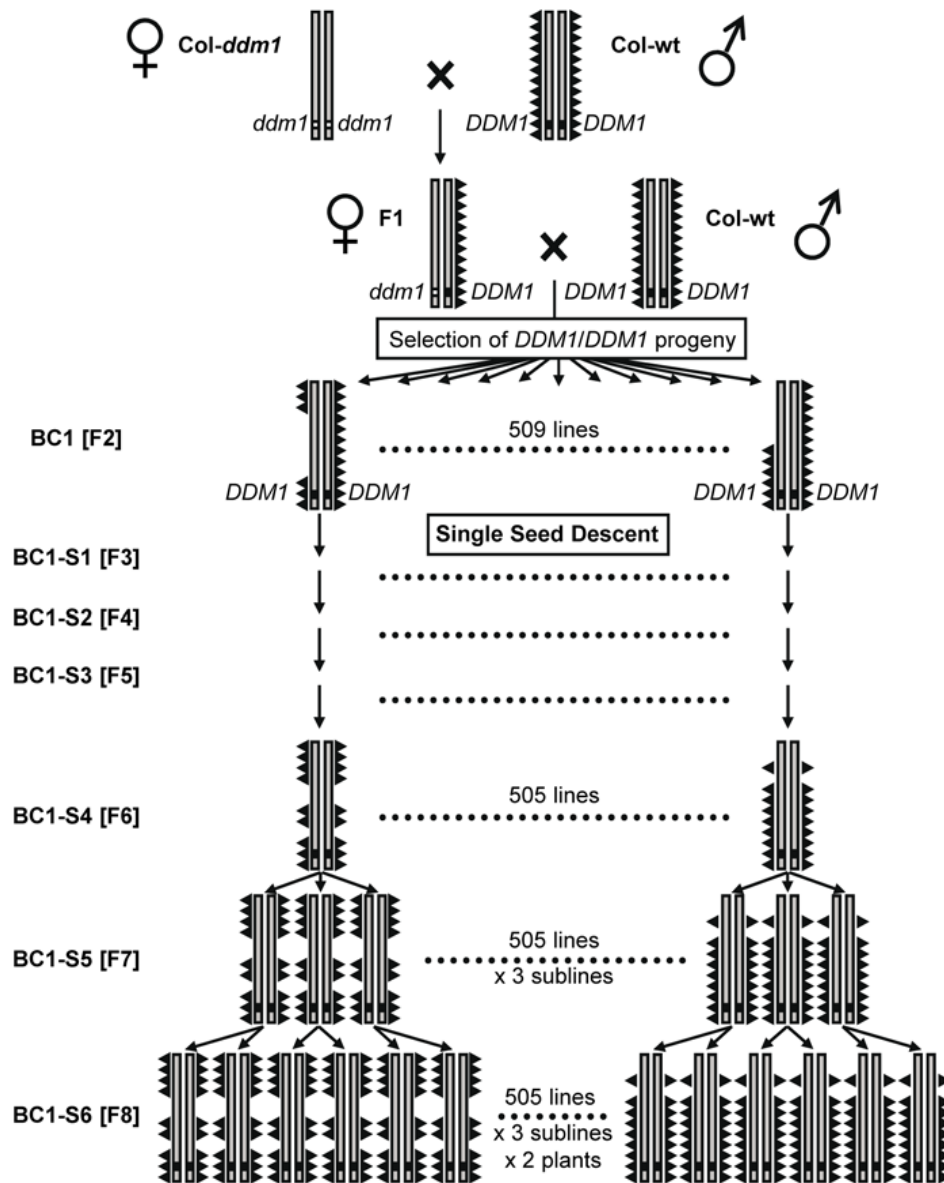


Figure I.35. : Construction de la population issue du croisement entre le mutant *ddm1-2* et l'écotype sauvage *Col-0*. Les barres grises représentent le génome d'*A. thaliana* et les triangles représentent la méthylation de l'ADN. Les deux parents sont quasi isogéniques, sauf au locus *DDM1* (carrés noirs et blancs) situé sur le chromosome 5. Ils diffèrent cependant par leurs niveaux de méthylation de l'ADN. Un individu F1 a été rétrocroisé avec la lignée parentale *Col-wt* et 509 individus *DDM1/DDM1* BC1 ont été autofécondés sur 8 générations, donnant une population de 505 lignées isogéniques mais présentant différents niveaux de méthylation. (Johannes *et al.*, 2009)

Si le temps de floraison ne présente pas une distribution continue dans cette population epiRIL, d'autres phénotypes tels que la résistance à *P. synrigae* ou la biomasse de plante fraîche présentent une distribution continue. Cependant, l'hypométhylation de certains loci entraîne une instabilité d'éléments génétiques et notamment la transposition d'éléments *CACTA* (Reinders *et al.*, 2009). Cette population dérivée du mutant *met1* n'a pas été utilisée par la suite à cause du nombre restreint de lignées disponibles (68 lignées).

Une seconde population d'epiRIL a été créée la même année à partir du mutant *ddm1-2* (Johannes *et al.*, 2009) (**Fig. I.35.**). Le mutant *ddm1-2*, décrit précédemment (**paragraphe 2.3.2.**), a été croisé avec l'accession sauvage Col-0. Les individus F1, hétérozygotes *DDM1/ddm1-2* ont été rétrocroisés avec l'individu sauvage *DDM1/DDM1* afin de restaurer l'allèle sauvage et d'assurer la viabilité des générations suivantes. Dans la génération BC1F2 issue de ce rétrocroisement, seuls les individus possédant l'allèle sauvage *DDM1* à l'état homozygote ont été conservés et autofécondés jusqu'à l'obtention de 505 lignées épigénétiquement recombinantes en F10. Les lignées produites possèdent une séquence génétique quasiment identique mais des épigénomes variés, issus de la combinaison de l'épigénome des deux parents. L'héritabilité des caractères temps de floraison et taille des plantes a été estimée dans cette population à 0.26 et 0.36 respectivement, qui s'est révélée plus forte que l'héritabilité observée sur des panels d'écotypes naturels ($H^2 < 0.007$ sur 144 lignées naturelles) (Johannes *et al.*, 2009). L'étude du méthylome d'un sous-ensemble de 123 des 505 lignées a été réalisée par MeDIP-chip (immunoprécipitation ciblant les cytosines méthylées) et a permis l'identification de régions différenciellement méthylées (DMR) stables (Colome-Tatche *et al.*, 2012) (**Fig. I.36. A et B.**). Sur un total de 2 611 DMR, 126 présentaient un niveau de méthylation stable à travers plusieurs générations. L'acquisition de ces DMR a été réalisée sur des feuilles de plantules de trois semaines mises en culture en jours longs (Cortijo *et al.*, 2014b). Le choix des 123 lignées est biaisé puisqu'il a été basé sur un phénotype contrasté au niveau du développement racinaire (Cortijo *et al.*, 2014a).

Cette population epiRIL a été utilisée dans plusieurs études d'analyse de liaison dans l'optique d'identifier des facteurs épigénétiques impliqués dans le contrôle de différents traits complexes. Le temps de floraison et la taille des plantes présentent une distribution continue dans cette population suggérant un contrôle poly-épigénétique de ces traits (**Fig. I. 37.A**) (Johannes *et al.*, 2009). Des QTL^{epi} contrôlant le temps de floraison et le développement des racines latérales ont été identifiés (**Fig. I. 37.B et C**) (Cortijo *et al.*, 2014) ainsi que des QTL^{epi} impliqués dans la réponse de la population à un stress salin (Kooke *et al.*, 2015) (**Fig. I. 37.D**).

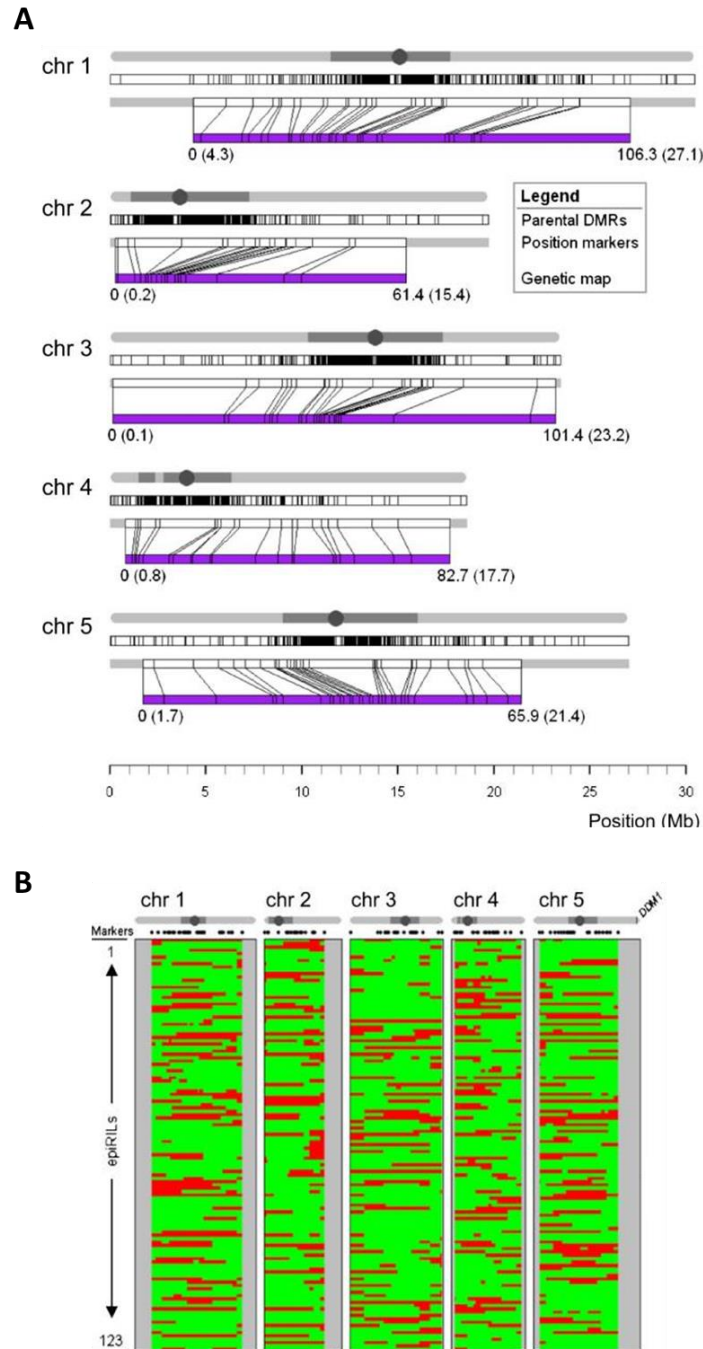


Figure I.36. : Distribution des épimarqueurs chez les 123 lignées de la population epiRIL et les génotypes parentaux. A) Distribution le long du génome des 2 611 régions différemment méthylées chez les parents (barre blanche et échelle en bas de la figure, représentation des distances physiques) et des 126 DMR (épimarqueurs) utilisés pour la construction de la carte épigénétique (barre violette, représentation des distances génétiques) pour les 5 chromosomes d'*A. thaliana*. B) Représentation de l'épihaplotype de chaque lignée (axe des Y) pour chaque épimarqueur (axe des X). En rouge : l'épiallèle *ddm1-2*. En vert : l'épiallèle *Col-WT*. Les extrémités des chromosomes, non couvertes sur la carte épigénétique par des marqueurs sont en gris. Figure adaptée de Colomé-Taché et al., 2012.

L'étude de Kooke *et al.* (2015) a par ailleurs montré que certains facteurs épigénétiques contrôlent la plasticité phénotypique des caractères morphologiques entre une condition de culture standard et un stress salin. Le contenu en glucosinolates (Aller *et al.*, 2018) (**Fig. I.37.E et F**), ainsi que la réponse d'*Arabidopsis* à l'infection par *Hyaloperonospora arabidopsidis* (Furci *et al.*, 2019) (**Fig. I.37.G**) et par *P. brassicae* (Liégard *et al.*, 2019a) sont également contrôlés par des épimutations. Une synthèse des QTL épigénétiques (QTL^{epi}) identifiés dans cette population est présentée dans le **tableau I.2**.

L'implication d'épimutations dans le contrôle de traits complexes a également été rapportée chez des espèces d'intérêt agronomique (Long *et al.*, 2011; Lu *et al.*, 2020). Sur une population de 202 lignées d'haploïdes doublés de *B. napus* (Qiu *et al.*, 2006), Long *et al.* (2011) ont identifié 627 DMR dont 86% étaient stables entre les parents à deux stades de développement. Quatre-vingt-dix-sept marqueurs ont été montrés comme stables après cinq méioses et ont été utilisés pour générer une carte épigénétique sur cette population. L'utilisation de cartes génétique et épigénétique a permis l'identification de 125 QTL épigénétiques (QTL^{epi}) et 148 QTL d'origine génétique, contrôlant des traits d'intérêt tels que le rendement, la croissance de la plante ou le temps de floraison (Long *et al.*, 2011). Chez le peuplier, une carte épigénétique a été réalisée sur une population d'analyse de liaison et a conduit à l'identification de 2818 DMR réparties sur 19 groupes de liaisons. Lu *et al.* (2020) ont ainsi détecté 163 QTL^{epi} impliquant 1043 DMR et expliquant de 1.7 à 44.5% de la variabilité de traits phénotypiques liés à la croissance et à la propriété du bois. Ces 2 études mettent en évidence le rôle d'épimutations dans le contrôle de traits complexes chez des espèces d'intérêt agronomique et économique.

2.4. Les microARN

Les microARN (miARN) sont des petits ARN non codants mesurant entre 20 et 22 nt. Les gènes *MIR*, organisés pour la plupart en clusters sur le génome, codent les miARN. Les premiers miARN identifiés sont les miARN *lin-4* et *let-7* chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, notamment impliqués dans le contrôle des divisions cellulaires et du devenir des cellules au cours du développement post-embryonnaire (Pasquinelli & Ruvkun, 2002; Bratch *et al.*, 2004). Actuellement, environ 2600 miRNA ont été identifiés chez l'humain (Plotnikova *et al.*, 2019), environ 200 chez les virus (Skalsky & Cullen, 2010) et d'une à plusieurs centaines chez les plantes en fonction des genres et des espèces (Wang *et al.*, 2019).

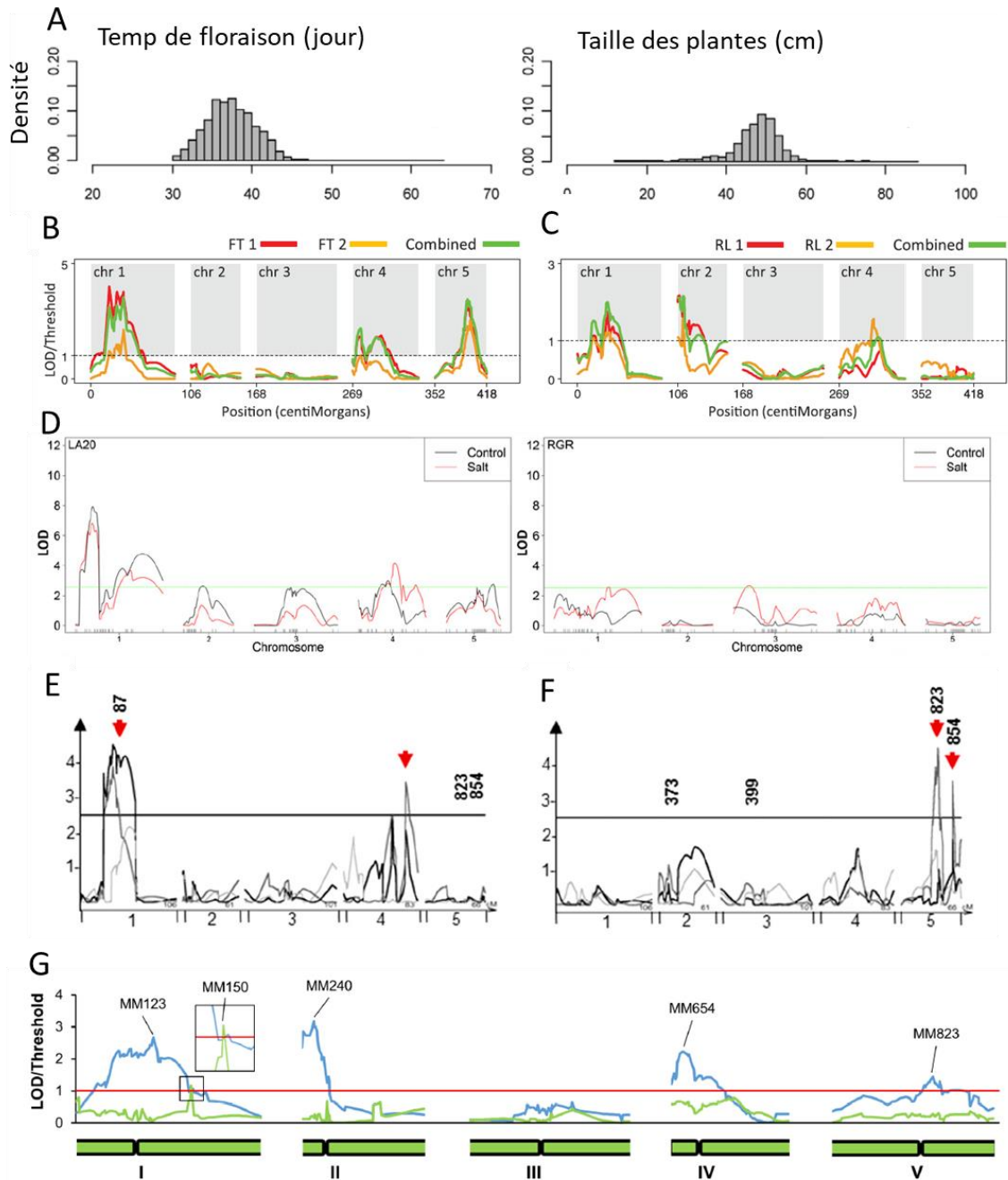


Figure I.37. : Caractérisation phénotypique de la population epiRIL et identification de QTL^{epi} impliqués dans le contrôle de traits complexes. A) Distribution continue des variables temps de floraison (jours) et taille des plantes (cm) mesurées sur la population epiRIL dérivée du croisement entre Col-0 et le mutant *ddm1-2*. La population epiRIL a été utilisée pour la cartographie épigénétique de plusieurs traits complexes tels que B) le temps de floraison (FT1, mesuré en serre et FT2, mesuré en champ, et leur moyenne), C) la longueur de la racine primaire (LR 1 et LR2 mesurés en chambre de culture, et leur moyenne), D) la surface des feuilles 20 jours après semis (LA20) et la croissance relative des plantes (RGR) en conditions contrôle (noir) et de stress salin (rouge), (E) l'accumulation de glucosinolates en (3MTP) et (F) (4MSB) sur deux expérimentations (gris clair et gris foncé) et leur moyenne (noire) et (G) l'indice de résistance (RI, bleu) d'*A. thaliana* à l'infection par *Hyaloperonospora arabidopsidis* et la surface des feuilles de plante de 3 semaines juste avant l'inoculation (vert). (Johannes *et al.*, 2009; Cortijo *et al.*, 2014a; Kooke *et al.*, 2015; Aller *et al.*, 2018; Furci *et al.*, 2019)

2.5. Etapes de productions des miARN

Transcription des miARN

Chez l'Homme, 61% des gènes *MIR* sont localisés dans les introns de séquences codantes, 18% sont localisés dans les introns de séquences non codantes et 20% dans les exons d'unités non transcrites (reviewed in Kim and Nam, 2006). La localisation de gènes *MIR* dans les exons de gènes codant des protéines, plutôt rare chez les plantes, serait probablement liée à une régulation fine de l'expression de leur cible (Li et al., 2011; reviewed in Budak and Akpinar, 2015). Que ce soit chez les plantes ou les mammifères, des éléments spécifiques de leur transcription par l'ARN polymérase II ont été identifiés dans les promoteurs des miARN, tels que le domaine TATA-box, les domaines de fixation de facteurs de transcription tels que *AtMYC2*, *ARF*, *SORLREP3* et *LFY* ou bien même des domaines d'initiation de la transcription (Transcription Start Site ; TSS) (Smale & Kadonaga, 2003; Megraw *et al.*, 2006). L'utilisation de l' α -Amanitin, inhibiteur de l'action de l'ARN Polymérase II, a permis de mettre en évidence le rôle de cette ARN polymérase dans la transcription des gènes *MIR* (Bratch *et al.*, 2004; Lee *et al.*, 2004). L'ARN polymérase II transcrit donc les gènes *MIR* en miARN primaires (pri-miARN) d'environ 100 nt qui prennent une structure particulière d'épingle à cheveux formant ainsi une structure d'ARN double brin (Bratch *et al.*, 2004) (**Fig. I.38.1.**). Les pri-miARN possèdent une coiffe en 5' et une queue poly-A en 3', comme les autres mARN transcrits par l'ARN polymérase II (Xie *et al.*, 2005).

Maturation des miARN

La majorité des pri-miARN transcrits par l'ARN polymérase II à partir des gènes *MIR* nécessitent deux étapes de maturation (**Fig. I.38.2.**). La première permet la maturation du pri-miARN en pre-miARN et la seconde du pre-miARN en miARN mature (Kurihara & Watanabe, 2004). La maturation des pri-miARN est réalisée par un complexe composé de trois protéines : la protéine HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL1) (Han *et al.*, 2004), qui participe notamment à la protection de l'ARN contre les exosomes du noyau (Gao *et al.*, 2020), la protéine à doigts de zinc SERRATE (SE) (Yang *et al.*, 2006) et la RNase III-like Dicer-Like 1 (DCL1) chez les plantes (Kurihara & Watanabe, 2004) (Drosha chez les animaux) (Lee *et al.*, 2003).

Tableau I. 2. : QTL^{epi} identifiés dans la population epiRIL *ddm1-2* x Col-0 de Johannes et al. (2009). Ce tableau synthétise les résultats obtenus par Cortijo et al., 2014; Kooke et al., 2015; Aller et al., 2018; Furci et al., 2019 et Liégard et al., 2019.

L'objectif de chaque étude est donné, ainsi que les potentielles contraintes appliquées sur la population epiRIL et les traits phénotypiques évalués.

Le chromosome où est localisé chaque QTL^{epi} est indiqué ainsi que les marqueurs épigénétiques les plus proches du pic de chaque QTL^{epi} (MM). Lorsque les données étaient disponibles, les conditions environnementales dans lesquelles ont été identifiés les QTL^{epi} ont été précisées.

Auteur	Objectif de l'étude	Contrainte	Traits	Chromosome	Marqueur Moléculaire (MM)	Condition Environnementales			
Cortijo et al., 2014	Implication des facteurs épigénétiques dans le contrôle du développement racinaire et du temps de floraison	NA	Temps de floraison en serre	1	MM114				
				4	MM686				
				5	MM825				
			Temps de floraison au champ	1	MM114				
				4	MM686				
				5	MM825				
			Longueur de la racine primaire 1	1	MM91				
				2	MM240				
				4	MM964				
			Longueur de la racine primaire 2	1	MM91				
				2	MM240				
				4	MM694				
Kooke et al., 2015	Implication des facteurs épigénétiques dans le développement de la plante sous stress salin	(C)= Sans sel ; S = 25mM NaCl	Surface des feuilles	1	MM2	C			
				1	MM11	C			
				1	MM91	C			
				1	MM160	C			
				2	MM330	C			
				4	MM686	C			
				5	MM707	C			
				5	MM859	C			
				1	MM10	S			
				1	MM158	S			
				2	MM382	S			
				4	MM693	S			
			4	MM701	S				
			Taille de la plante à l'apparition de la première silique	1	MM11	C			
				4	MM698	C			
				4	MM679	S			
				1	MM123	-			
				5	MM867	-			
				1	MM123	C			
			Branchement de la rosette	5	MM867	C			
				1	MM123	S			
				4	MM654	S			
				1	MM123	-			
				1	MM123	C			
				4	MM654	C			
			Longueur moyenne de l'internoeud	1	MM160	S			
				4	MM587	S			
				5	MM726	S			
				1	MM123	S			
			Temps de floraison	5	MM854	S			
				1	MM123	C			
				4	MM661	C			
				5	MM726	C			
				1	MM123	S			
			Branchement de la tige	3	MM537	S			
				4	MM679	S			
				5	MM726	S			
				3	MM396	C			
				1	MM158	S			
			Temps relatif de croissance	3	MM396	S			
				2	MM171	C			
			Aller et al., 2015	Implication des facteurs épigénétiques dans la production de glucosinolates	NA	3MTP	1	MM87	
5	MM823								
4MSB	5	MM854							
	2	MM373							
	3	MM399							
3MSP	5	MM823							
	5	MM854							
	5	MM867							
Liégard et al., 2019	Implication des facteurs épigénétiques dans la réponse à <i>P. brassicae</i>	Sans Inoculation (NI)				Longueur de la plus longue feuille	1	MM126	22°C
							3	MM515	22°C
			5	MM713	22°C				
			Biomasse racinaire plantes	1	MM126	22°C			
		4		MM691	22°C				
		Infection des plantes 10 jours après semis avec 10 ⁷ spores/mL	longueur de la longue feuille	1	MM52	22°C			
				3	MM427	22°C			
				5	MM728	22°C			
				1	MM91	22°C			
				3	MM515	22°C			
			1	MM128	25°C				
			biomasse racinaire	3	MM547	25°C			
				1	MM147	22°C			
				2	MM383	22°C			
				2	MM385	22°C			
		4		MM686	22°C				
		pourcentage d'ADN du pathogène	3	MM432	25°C				
			1	MM123	22°C				
			1	MM550	22°C				
			2	MM693	22°C				
4	MM679		25°C						
Furci et al., 2019	Implication des facteurs épigénétiques dans la réponse à <i>Hyaloperonospora arabidopsis</i>	Des plantules âgées de 3 semaines ont été inoculées	Résistance à <i>Hpa</i>	1	MM123				
				2	MM240				
				4	MM654				
			Surface de la feuille verte	5	MM823				
				1	MM150				
				1	MM123				

Contrairement au règne animal où la maturation du pri-miARN en pre-miARN se fait dans le noyau des cellules par Drosha (Lee *et al.*, 2003) et la maturation de pre-miARN en miARN mature se fait dans le cytoplasme par Dicer (Zhang *et al.*, 2004), la maturation des pri-miARN en miARN matures chez les plantes se fait dans le noyau des cellules à l'aide de la protéine DCL1 (Bologna & Voinnet, 2014; Yu *et al.*, 2017a; Wang *et al.*, 2019). Une étude récente a permis de mettre en lumière la structure en 3 dimensions de la maturation du pri-miARN en miARN mature (Wei *et al.*, 2021a). Dans un premier temps, DCL1 se lie avec le pri-miARN grâce au domaine PAZ qui interagit avec la structure en boucle du pri-miARN, le module hélicase fixe ensuite la structure double brin 3p-miRNA/5p-miRNA. Le domaine RNase II coupe ensuite l'extrémité 5' du pri-miARN qui devient alors le pre-miARN lui-même transféré vers le domaine PAZ qui reconnaît l'extrémité 3'. Une seconde coupure est réalisée par le domaine RNase II qui permet l'élimination de l'extrémité 3' et le relargage du complexe double brin 3p-miRNA/5p-miRNA (Wei *et al.*, 2021a).

Formation et rôle du complexe RISC

Le complexe miARN double brin 3p-miARN/5p-miARN relargué par DCL1 est ensuite méthylé au niveau des derniers nucléotides de chaque brin par la protéine méthyltransférase HEN1 pour le protéger contre l'activité 3'-end uridylation, qui entraîne la dégradation des ARN (Ren *et al.*, 2014) et donc le stabiliser (Yu *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005). Ce complexe stabilisé est exporté du noyau vers le cytoplasme par HASTY (HST) (Bollman *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2005) (**Fig. I.38.3**). La protéine ARGONAUTE (AGO) et un dimère de HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90) forment un premier complexe qui, après la fixation d'adénosine triphosphate (ATP) permet, à travers un changement structurel de HSP90, le chargement du complexe 3p-miARN/5p-miARN (Iki *et al.*, 2010). Plusieurs protéines AGO sont capables de charger des complexes 3p-miARN/5p-miARN en fonction de plusieurs critères dont la base nucléotidique présente à la fin de chaque brin ou les mésappariements entre les deux brins 3p-miARN et 5p-miARN. Ainsi, AGO5 montre une plus grande affinité avec des miARN qui possèdent sur l'extrémité 5' une cytosine et AGO2 et AGO4 ont une plus grande affinité avec des miARN ayant une adénosine à leur extrémité 5' (Mi *et al.*, 2008). Les 3p-miARN/5p-miARN présentant des mésappariements au centre du complexe sont davantage chargés sur AGO1 tandis que si le complexe 3p-miARN/5p-miARN ne présente pas de mésappariements centraux, il est chargé sur AGO2 (Yu *et al.*, 2017a).

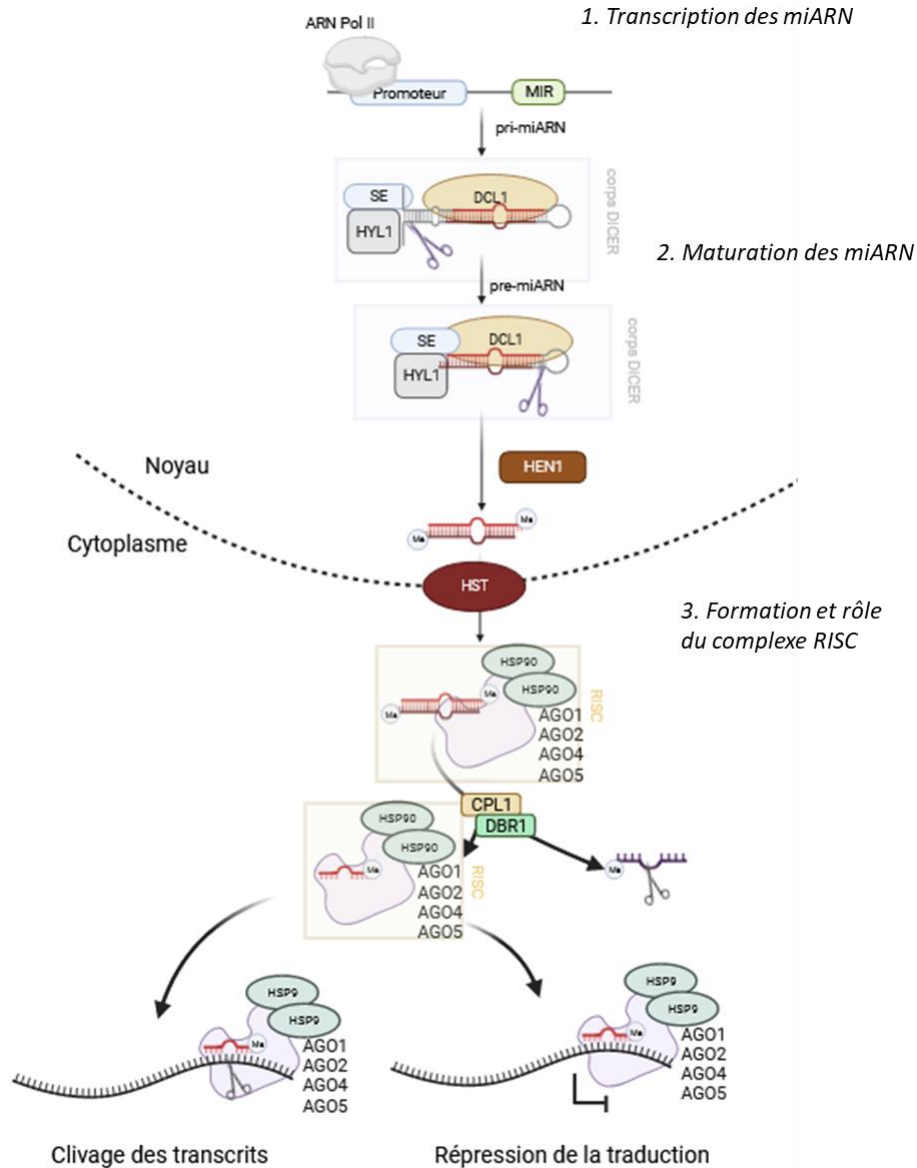


Figure I. 38. : Production des miARN chez les plantes. 1. L'ARN polymérase II transcrit les gènes *MIR* en pri-miARN en structure d'épingle à cheveux. 2. Les pri-miARN sont ensuite transformés par les protéines RNase III-like Dicer-Like 1 (DCL1), SERRATE (SE) et HYPOPLASTIC LEAVES 1 (HYL1) qui forment ainsi un corps appelé « dicing bodies » (corps dicer). Ce complexe permet la maturation des pri-miARN en pre-miARN puis conduit à la production de complexe double brin 3p-miRNA/5p-miRNA dont les extrémités sont méthylées par la protéine méthyltransférase HEN 1. 3. Le complexe double brin 3p-miRNA/5p-miRNA est exporté dans le cytoplasme par l'intermédiaire de la protéine HASTY (HTY) et est ensuite pris en charge par une protéine ARGONAUTE (AGO) et un dimère de HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90). Le complexe RISC (pour *RNA induced silencing complex*) relargue un brin du complexe 3p-miRNA/5p-miRNA, sélectionné par les protéines C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1) et DBR1 (DOUBLE STRANDED ARN BIND PROTEIN). L'ARN resté au sein du complexe RISC guide ce dernier vers sa cible et, selon son niveau de complémentarité, entraîne le clivage de l'ARN messager ou l'inhibition de sa traduction. Schéma redessiné à partir de Yang and Li, 2012; Gao et al., 2021.

Le complexe ainsi formé, appelé RISC (RNA induced silencing complex, RISC) relargue un brin du complexe 3p-miARN/5p-miARN, sélectionné pour sa forte thermostabilité par les protéines CPL1 (C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1) et DBR1 (DOUBLE STRANDED ARN BIND PROTEIN) (Eamens *et al.*, 2009; Manavella *et al.*, 2012), le brin d'ARN possédant une plus faible thermostabilité est ainsi conservé au sein du complexe RISC - majoritairement le 5p-miARN - et le guide vers l'ARN messager cible.

Les miARN régulent l'expression de leur(s) gène(s) cible(s) au niveau post-transcriptionnel via deux mécanismes dépendants de leur niveau de complémentarité avec l'ARNm de leur(s) gène(s) cible(s) (Hutvagner & Zamore, 2002) : un mécanisme de clivage des ARN messager (ARNm) lors d'une complémentarité nucléotidique parfaite entre les séquences du miARN et de sa cible ou la répression de la traduction de l'ARNm lors d'une complémentarité de séquence partielle entre le miARN et sa cible. Des études rapportent cependant quelques nuances et précisent que l'action de certains miARN sur leur cible est indépendante de la complémentarité de séquence puisque l'action répressive de certains miARN sur leurs cibles a été rapportée comme étant à la fois un clivage des ARNm et une répression de leur traduction. Ainsi les miARN156/157 clivent l'ARNm du gène *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE 3 (SPL3)* ou bloquent sa traduction en protéine (Gandikota *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2016). Quel que soit le mode d'action précis du complexe RISC et le niveau de complémentarité entre les miARN et leur(s) cible(s), les miARN, au niveau post-transcriptionnel, en régulant de manière négative l'expression des gènes cibles, sont impliqués dans le contrôle de nombreux processus biologiques.

2.6. Contrôle de la production de miARN et turnover des miARN

En tant que régulateurs clefs de plusieurs mécanismes physiologiques, les miARN sont finement régulés à chaque étape de leur biosynthèse jusqu'à leur mode d'action (revue dans Li and Yu, 2021). Il est possible de citer notamment les facteurs appartenant au complexe « Elongator », *ELP2* et *ELP5* qui favorisent la transcription des pri-miARN (Fang *et al.*, 2015) ou l'action de certains facteurs remodelant la chromatine comme *CH2* qui interagit avec SE et entraîne une modification de la structure des pri-miARN, ce qui régule leur transformation par les DCL et empêche l'accumulation de leurs formes matures au sein des cellules (Wang *et al.*, 2018a). La présence de la protéine *HYL1* participe à la stabilité des miARN et son absence peut conduire à une dégradation précoce de ces miARN par les exosomes (Gao *et al.*, 2020).

Le complexe *DCL1/SE/HYL1* peut également être régulé aux niveaux transcriptionnels, post-transcriptionnel ou post-traductionnel. Ainsi, la déphosphorylation de HYL1 par la *C-TERMINAL DOMAIN PHOSPHATASE-LIKE 1 (CPL1)* est indispensable à la maturation des miARN (Manavella *et al.*, 2012). Enfin, la structure même des gènes *MIR* peut impacter leur expression. La présence de sites d'épissage alternatifs dans *MIR162* peut ainsi conduire à l'inhibition de la production de *MIR162* (Hirsch *et al.*, 2006).

Les ARN longs non codants (lncARN) interviennent également dans la régulation des miARN dans leur forme mature. Certains lncARN possèdent ainsi un site de reconnaissance des miARN qui leur permet de séquestrer les miARN matures et ainsi empêcher leur activité. Ces lncARN inhibant l'action des miARN, appelés miARN target mimicry, ont été identifiés dans diverses espèces végétales (Franco-Zorrilla *et al.*, 2007). Pour être efficace en tant que leurre, le lncARN doit se lier à sa cible miARN mais aussi éviter son propre clivage par le miARN. Cela est possible grâce à une complémentarité de séquence incomplète au niveau du site de reconnaissance du miARN (nucléotides 10-11) avec des mésappariements de quelques nucléotides (Ariel *et al.*, 2015 ; Yu *et al.*, 2019).

2.7. Familles multigéniques et conservation des miARN à travers les espèces

Chez *A. thaliana*, environ 173 miARN ont été identifiés appartenant à environ 98 familles distinctes. Les gènes *MIR* sont généralement organisés en familles multigéniques : les séquences nucléotidiques des précurseurs de miARN sont différentes mais aboutissent à un miARN mature similaire, avec les mêmes gènes cibles (Palatnik *et al.*, 2007). De plus, certains miARN sont très conservés entre les différentes espèces végétales. 97 miARN, répartis en 25 familles, identifiés chez *Arabidopsis* sont ainsi présents chez les autres *Brassicaceae* mais également dans des plantes plus éloignées comme les monocotylédones et les plantes non vasculaires (Jones-Rhoades, 2012). La famille miR164 a ainsi été identifiée chez *A. thaliana*, *P. trichocarpa*, *V. viniferis*, *O. sativa* et *Zea mays*. La famille miR165/166, identifiée chez les espèces précitées, a également été décrite chez le lycopode *Selaginella moellendorffii* (Jones-Rhoades, 2012).

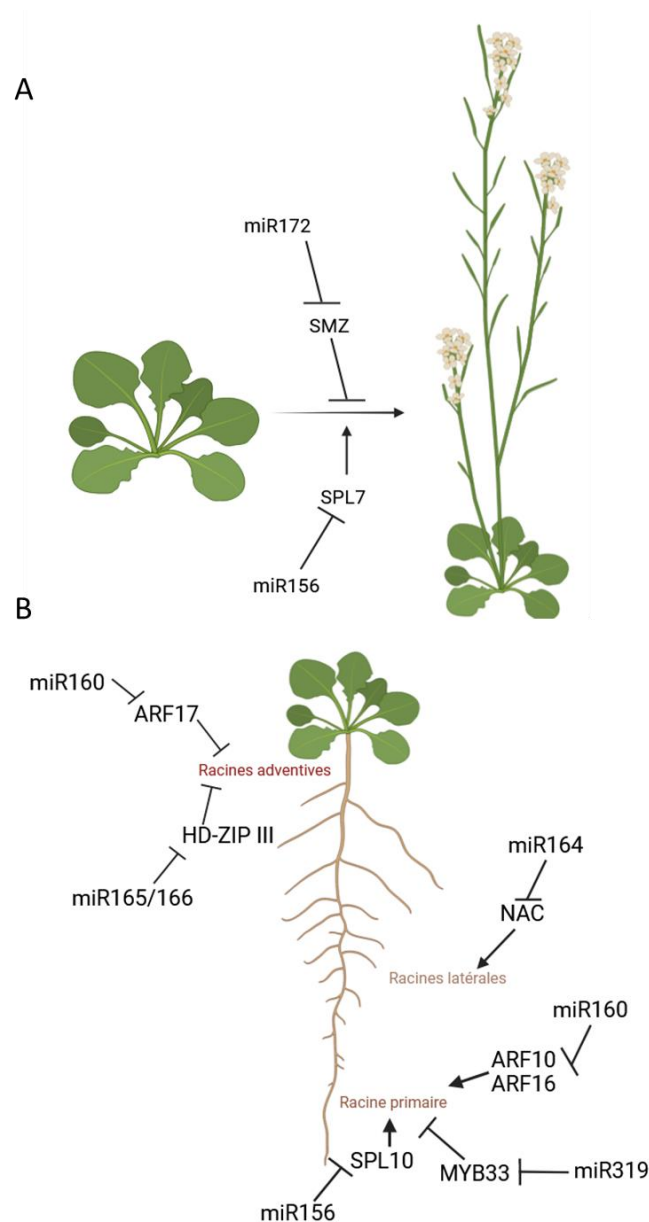


Figure I. 39. : Exemple de miARN impliqués dans la transition florale (A) et dans la formation des racines (B). A) La répression du facteur de transcription *SCHLAFMÜTZE* (*SMZ* = répresseur de la transition florale) ; miR172 conduit à l'induction de la transition florale tandis que la répression de *SPL7* (*SPL7* = activateur de la transition florale) par miR156 la régule négativement. B) L'elongation de la racine primaire est contrôlée par de nombreux miARN et leurs cibles dont, par exemple, miR160 qui réprime l'elongation par la répression d'*ARF10* et *ARF16* ; miR156 régule négativement l'expression de *SPL10* ou miR319 qui régule négativement l'expression du facteur de transcription MYB33. Au niveau des racines latérales, plusieurs miARN sont également impliqués dans leur développement, notamment miR164 à travers le contrôle de sa cible, *NAC* ; MiR160 et miR165/166, à travers le contrôle de leur cibles, *ARF17* et *HD-ZIP III*, respectivement, contrôlent le positionnement et la formation des racines adventives. Adapté de Yan et al. (2022).

Les séquences nucléotidiques des sites de fixation de certains miARN, dont miR166, sur les gènes class-III-Zip sont conservées au nucléotide près entre des gymnospermes (*Pseudotsuga menziesii* et *Taxus globosa*), une fougère (*Ceratopteris richardii*), un embryophyte (livewort, *Marchantia polymorpha*), une mousse (*Physcomitrella patens*) et un anthocérotophyte (*Phaeoceros carolinianus*) (Floyd & Bowman, 2004).

2.8. Rôle des miARN

Rôle des miARN dans le développement

Les cibles majoritaires des miARN chez les plantes sont des gènes codant des facteurs de transcription ou des protéines F-box impliquées dans différents processus physiologiques, confirmant le rôle clef des miARN dans les réseaux de régulation (Rubio-Somoza & Weigel, 2011). Les miARN sont ainsi impliqués dans la régulation du développement foliaire, du développement racinaire, de l'organisation florale et du temps de floraison, du développement des graines ou des processus de nodulation chez les légumineuses (Dong *et al.*, 2022).

Ainsi, la transition florale chez *A. thaliana* et d'autres plantes telles que *Petunia inflata* et *Petunia axillaris* (Wu *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2012; Zhou *et al.*, 2021) est contrôlée par plusieurs miARN (**Fig I. 39.A**). Chez *A. thaliana*, *MIR156* réprime l'activité du facteur de transcription *SQUAMOSA Promoter-Binding Protein-Like 7 (SPL7)* ce qui conduit à l'inactivation du locus *FLOWERING LOCUS T (FT)* et donc de la floraison. En effet, le mutant surexprimant *SPL7*, insensible à l'inactivation par miR156, fleurit plus précocement que la lignée sauvage (Kim *et al.*, 2012). MiR172 est impliqué dans l'induction de la transition florale via la répression du facteur *SCHLAFMÜTZE (SMZ)* (Mathieu *et al.*, 2009).

Au niveau racinaire, de nombreux miARN sont impliqués dans différents processus tels que le développement de la racine primaire ou des racines latérales et adventives (**Fig I.39.B**). Ainsi, le module *MIR156/SPL10* contrôle négativement l'élongation de la racine primaire chez *A. thaliana* (Barrera-Rojas *et al.*, 2020) via la régulation du niveau des cytokinines. *MIR160* est également impliqué dans l'élongation racinaire chez *Arabidopsis* et contrôle, via la répression de facteurs répondant à l'auxine *ARF10* et *ARF16*, la perception de la gravité par la plante (Wang *et al.*, 2005).

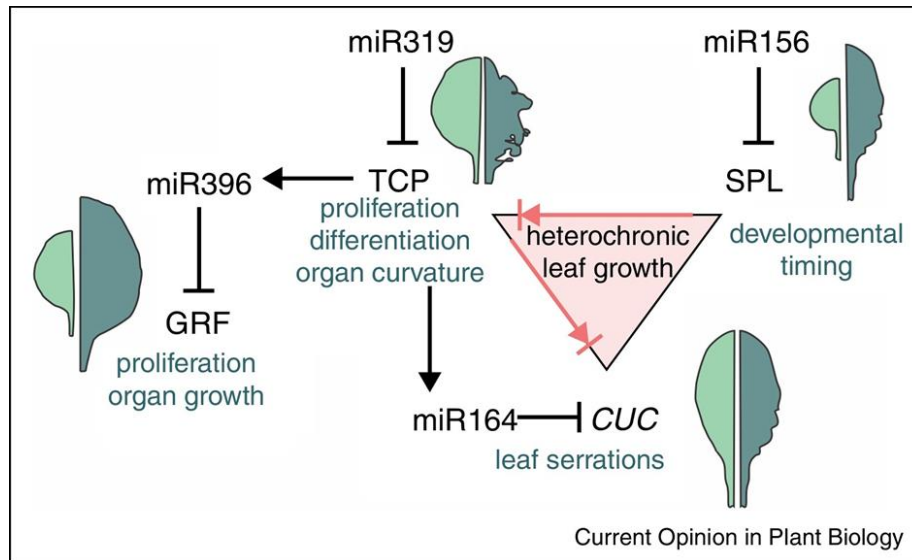


Figure I. 40. : Représentation schématique du contrôle de la prolifération cellulaire dans les feuilles et de l'interaction entre miR319, miR396, miR156 et miR164. Mir156 régule l'expression de ses cibles *SPL* et module notamment le développement des feuilles. MiR164, par la régulation de *CUC* régule la serration des feuilles. MiR396 cible les facteurs de transcription *GRF*, qui favorisent la prolifération cellulaire et la croissance des organes. Une augmentation de l'activité de *GRF* entraîne ainsi des feuilles plus grandes. MiR319 inhibe les facteurs de transcription *TCP* de classe II qui répriment la prolifération cellulaire et favorisent la différenciation. Il existe également une interconnexion entre les gènes *SPL*, *TCP* et *CUC* dans la régulation du développement foliaire. Au niveau de chaque feuille est présenté : à gauche le phénotype de la plante sauvage, à droite le phénotype d'une plante altérée dans l'expression du miARN concerné. *GRF*, *GROWTH REGULATING FACTORS*; *CUC*, *CUP-SHAPED COTYLEDON2*; *TCP*, *TEOSINTE BRANCHED1*, *CYCLOIDEA* et *PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN BINDING FACTOR*; *SPL*, *SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE*. (Rodriguez *et al.*, 2016).

MiR165/166, mir319 et miR396, à travers la répression des facteurs de transcription de type *MYB33* et *GRF*, respectivement, régulent l'élongation de la racine primaire (Rodriguez *et al.*, 2010; Carlsbecker *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016b). MiR160 contrôle la formation des racines adventives en contrôlant l'expression d'*ARF17* chez *A. thaliana* (Gutierrez *et al.*, 2009) mais également chez *Malus domestica* (Li *et al.*, 2019c). Chez *A. thaliana*, miR164 régule négativement le développement des racines latérales en réprimant des facteurs de transcription de la famille des *NAC* (*NAM* : *NO APICAL MERISTEM* et *CUC* : *CUP-SHAPED COTYLEDON*) (Guo *et al.*, 2005).

Les miARN sont également impliqués dans le développement foliaire (**Fig. I.40.**). Xu *et al.* (2016) ont ainsi montré que la régulation par miR156 de ses cibles *SPL3*, *SPL4*, *SPL5*, *SPL2*, *SPL9*, *SPL10*, *SPL11*, *SPL13* et *SPL15*, entraînait la transition du développement de la feuille du stade juvénile d'*Arabidopsis* au stade adulte. Plusieurs miARN contrôlent la formation de dentelure (ou serration) sur la feuille et notamment miR160, à travers la répression de *ARF10* et *ARF17*, chez *Solanum lycopersicum* (Ben-Gera *et al.*, 2016) et miR164 chez *A. thaliana*, au travers le contrôle de l'expression de *CUC1*, *CUC2*, *CUC3* (Laufs *et al.*, 2004; Nikovics *et al.*, 2006; Koyama *et al.*, 2010). MIR396 contrôle négativement la prolifération cellulaire dans les parties distales de la feuille en restreignant l'expression des *GROWTH REGULATING FACTOR* (*GRF*) au niveau proximal de la feuille (Liu *et al.*, 2009; Rodriguez *et al.*, 2010, p. 396; Wang *et al.*, 2011). L'expression de miR396 est négativement régulée par les facteurs de transcription *TEOSINTE BRANCHED1*, *CYCLOIDEA*, and *PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN BINDING FACTOR* (*TCP*) eux-mêmes ciblés par miR319 (Schommer *et al.*, 2014). Les *TCP* régulent également l'expression de miR164 au niveau des feuilles (Koyama *et al.*, 2010), suggérant ainsi une régulation complexe de la prolifération cellulaire au niveau foliaire.

Implication des miARN dans la réponse des plantes aux stress biotiques

Les miARN ont également été décrits comme impliqués dans la réponse des plantes aux stress biotiques chez plusieurs espèces. En 2006, Navarro *et al.* (2006) mettaient en évidence chez *A. thaliana* l'induction par la flagelline 22 (flg22) de miR393 qui, à travers la répression des récepteurs d'auxine *TIR1*, *AFB2*, *AFB3* confère une plus grande résistance d'*A. thaliana* à *P. syringae*.

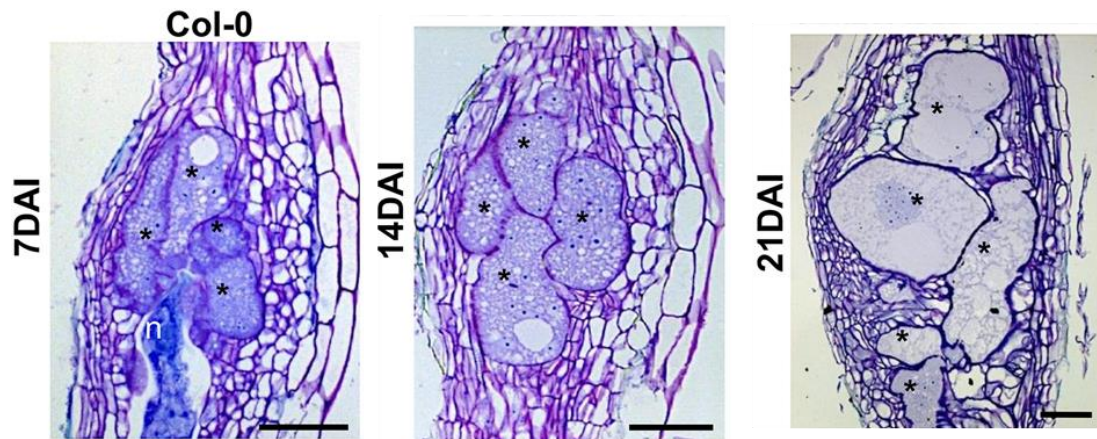


Figure I.41. : Développement des galls induit par l'infection par *Meloidogyne incognita*, caractérisé par une hyperplasie et une hypertrophie cellulaire. Coupes longitudinales de racines d'*A. thaliana* infectées par *M. incognita* à plusieurs temps cinétiques. Après l'injection par le nématode de différents effecteurs, cinq à sept cellules du parenchyme se différencient en cellules géantes nourricières. Jusqu'à 10 jours après l'inoculation, ces cellules se divisent sans cytokinèse. De 10 jours à 21 jours après infection, les cellules géantes subissent une endoreduplication. Au cours de l'infection par *M. incognita*, ces cellules subissent une croissance isotropique. n= nématode, * = cellules géantes. Figure adaptée de Coelho et al., 2017.

Plus tard, Zhang *et al.* (2011) ont observé l'induction de différents miARN lors de l'inoculation d'*A. thaliana* par trois souches de *P. syringae* dont une souche non pathogénique (DC3000 hrcC), une souche virulente (Pst DC3000 EV) et une souche avirulente (Pst DC3000 avrRpt2). L'infection par la souche virulente réprime notamment miR390 ce qui entraîne l'induction des *AUXIN RESPONSIVES FACTOR* (ARF). La répression de miR159 par l'infection des souches virulentes et non virulentes entraîne une régulation de la réponse à *P. syringae* via la régulation positive de ses cibles *MYB33* et *MYB65* et via la signalisation des gibbérellines (GA) (Zhang *et al.*, 2011a). De plus, la répression de miR398 conduit à l'augmentation de la production de *SUPEROXIDE DISMUTASES* (CSD) facilitant la détoxification des espèces réactives de l'oxygène (ROS).

L'étude conjointe de l'impact du *Turnip Mosaic Virus* (TuMV) chez *A. thaliana*, *B. rapa* et *B. napus* a permis de mettre en évidence le rôle d'un miARN spécifique des *Brassicaceae* dans la réponse des plantes aux virus. Bra-miR1885, induit par l'infection, réprimerait l'expression de ses cibles, des gènes de résistance *TIR-NBS-LRR*, conduisant à une réponse de sensibilité des *Brassicaceae* au TuMV (He *et al.*, 2008).

L'interaction de l'aubergine (*Solanum melongena*) avec *Verticillium dahliae* conduit à la répression significative de 6 miARN, dont miR393, miR3627, miR2111, miR1088, miR395 et miR399. La répression de miR393 par l'infection conduit à une accumulation d'auxine et une infection plus importante de la plante (Yang *et al.*, 2013). L'infection du blé tendre (*Triticum aestivum*) par le mildiou (*Erysiphe graminis*) entraîne également la dérégulation de plusieurs miARN, dont miR396, miR156 et miR159 qui sont réprimés et miR172 et miR393 qui sont induits (Xin *et al.*, 2010). L'infection de l'ail (*Allium sativum*) par *Fusarium oxysporum* (FOC) a entraîné l'expression différentielle de 45 miARN. Des lignées surexprimant certains miARN, tels que miR164a, miR168a et miR393 sont plus résistants à la maladie (Chand *et al.*, 2017).

Au cours de cette thèse nous nous sommes tout particulièrement intéressés à la réponse d'*A. thaliana* à l'infection par l'agent pathogène *Plasmodiophora brassicae*. L'implication des miARN dans la réponse des plantes à *P. brassicae* sera discuté dans le paragraphe décrivant l'agent pathogène (**Chapitre I.3.3.4.**). Cependant, l'implication des miARN dans la réponse des plantes à un autre agent pathogène induisant la production de galles au niveau racinaire a déjà été montré (Zhao *et al.*, 2015; Cabrera *et al.*, 2016a; Medina *et al.*, 2017; Díaz-Manzano *et al.*, 2018; Cai *et al.*, 2021; Nouredine *et al.*, 2022).

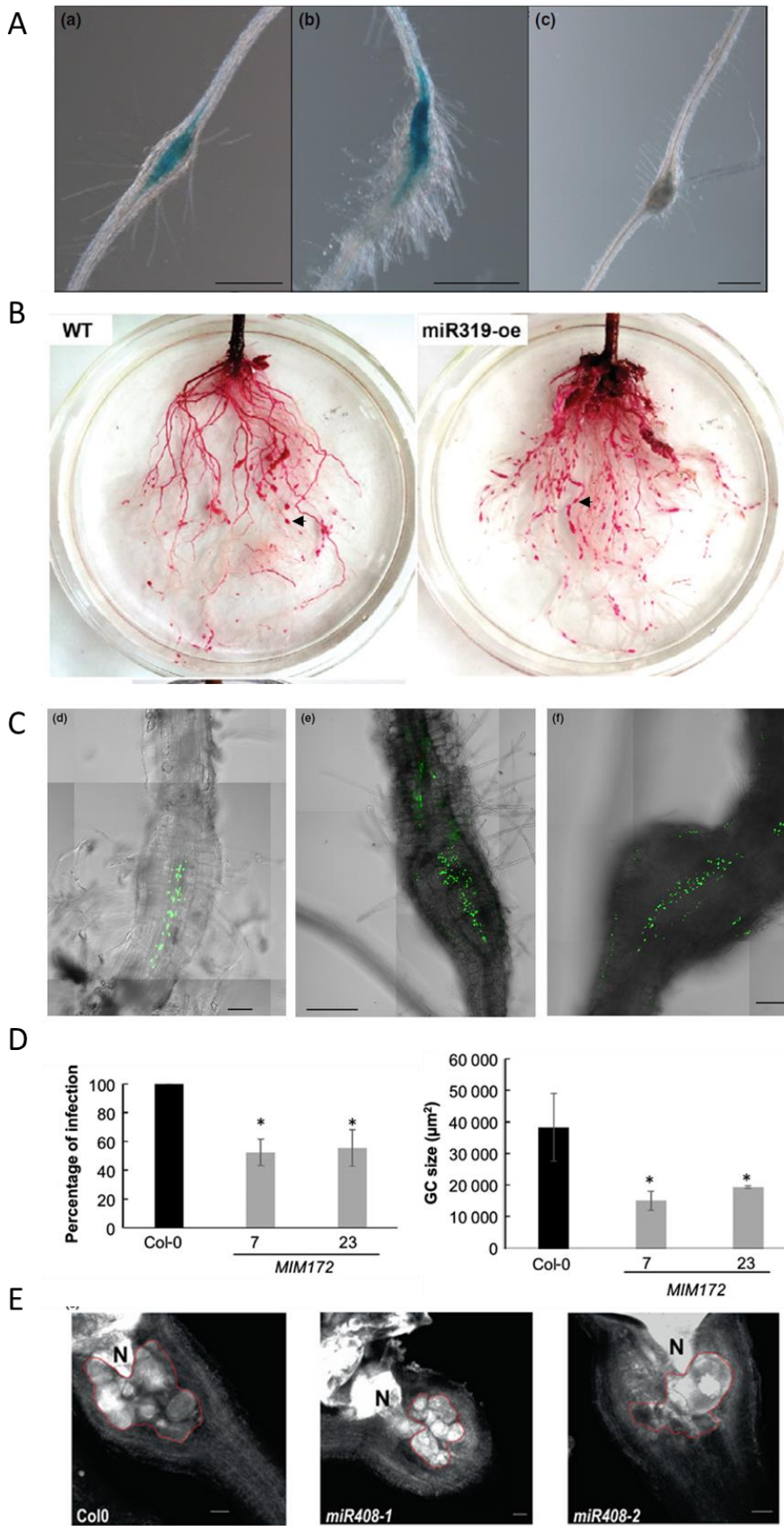


Figure I.42. : Les miARN jouent un rôle majeur dans l'infection d'*A. thaliana* et *S. lycopersicum* par *M. javanica* (A) et *M. incognita* (B à C). A) Pattern d'activité du transgène pmiR390a: GUS, rapportant l'expression de miR390 dans les galles induites par l'infection de *M. javanica* chez *A. thaliana* : 4 jours (a), 7 jours (b) et 15 jours (c) après l'infection. B) Evaluation du nombre de masses d'œufs issues de l'infection de la tomate par *M. incognita* dans la lignée sauvage (WT) et la lignée de sur-expression de miR319. C) Expression de pMIR164c::VENUS:N7 dans les galles d'*A. thaliana* induites par l'infection par *M. incognita* (d) 7 jours après infection, (e) 14 jours après infection et (f) 21 jours après infection. D) Pourcentage d'infection (gauche) et surface des cellules géantes (μm^2) chez l'écotype *Col-0* et deux lignées target mimicy MIM172 présentant une réduction de l'accumulation de miR172 et E) Développement des cellules géantes induites par la présence du nématode (N) chez *Col-0* et les mutants *miR408-1* et *miR408-2* altérés dans la production de miR408. (Zhao *et al.*, 2015; Cabrera *et al.*, 2016b; Medina *et al.*, 2017; Díaz-Manzano *et al.*, 2018; Noureddine *et al.*, 2022).

Meloidogyne incognita est un nématode à galles parasite obligatoire des plantes qui, tout comme *P. brassicae*, induit des phénomènes d'hyperplasie (division cellulaire) et d'hypertrophie (élargissement des cellules) au niveau du système racinaire des plantes infectées (de Almeida Engler & Gheysen, 2013; Coelho *et al.*, 2017) (**Fig. I.41**). Plusieurs miARN ont été identifiés impliqués dans la réponse d'*A. thaliana*, *S. lycopersicum* ou *Gossypium hirsutum* à l'infection par *M. incognita* (**Fig. I.42**). chez la tomate, l'implication du module miR319/TCP4 entraîne notamment la régulation de la production d'acide jasmonique (JA) qui induit la réponse de défense à l'infection par *M. incognita* (Zhao *et al.*, 2015). Chez *A. thaliana*, l'induction de miR390 entraîne la dégradation de lncARN en petit ARN interférant (siARN) ce qui conduit au clivage d'*ARF2*, *ARF3* et *ARF4* et l'altération du module miR390/TAS3/*ARF2-3-4* entraîne une réduction du nombre de galles (Cabrera *et al.*, 2016a). L'étude transcriptomique de Medina *et al.* (2017) chez *Arabidopsis* a mis en évidence l'implication notamment des miR167a, miR167d, miR164c, miR394b et miR408. L'étude détaillée de miR159 et de l'expression négativement corrélée de l'une de ses cibles, *MYB33*, a démontré un rôle de ce miARN dans l'interaction *A. thaliana*/*M. incognita* au stade avancé de l'infection (Medina *et al.*, 2017). MiR172 est impliqué dans la formation des galles chez *A. thaliana* durant l'infection par *M. javanica* (Díaz-Manzano *et al.*, 2018). La modulation de l'expression de 193 miARN connus et 73 nouveaux miARN pour lesquels 87 cibles ont été identifiées a été observée chez le coton infecté par *M. incognita* (Cai *et al.*, 2021). Parmi ces miARN, on retrouve notamment 7 miARN de la famille *MIR319*, 13 de la famille *MIR166* ou 14 de la famille *MIR482*. Plus récemment, l'étude fonctionnelle de miR408 et miR398, induits chez *A. thaliana* et *S. lycopersicum* lors de l'infection, a permis de mettre en évidence que le module *SPL7/MIR408/MIR398* était nécessaire à la mise en place de l'infection et à la formation des galles (Noureddine *et al.*, 2022).



Figure I.43. : Distribution mondiale de *Plasmodiophora brassicae*, agent pathogène causant la hernie des crucifères. Carte adaptée de Javed et al. (2023).

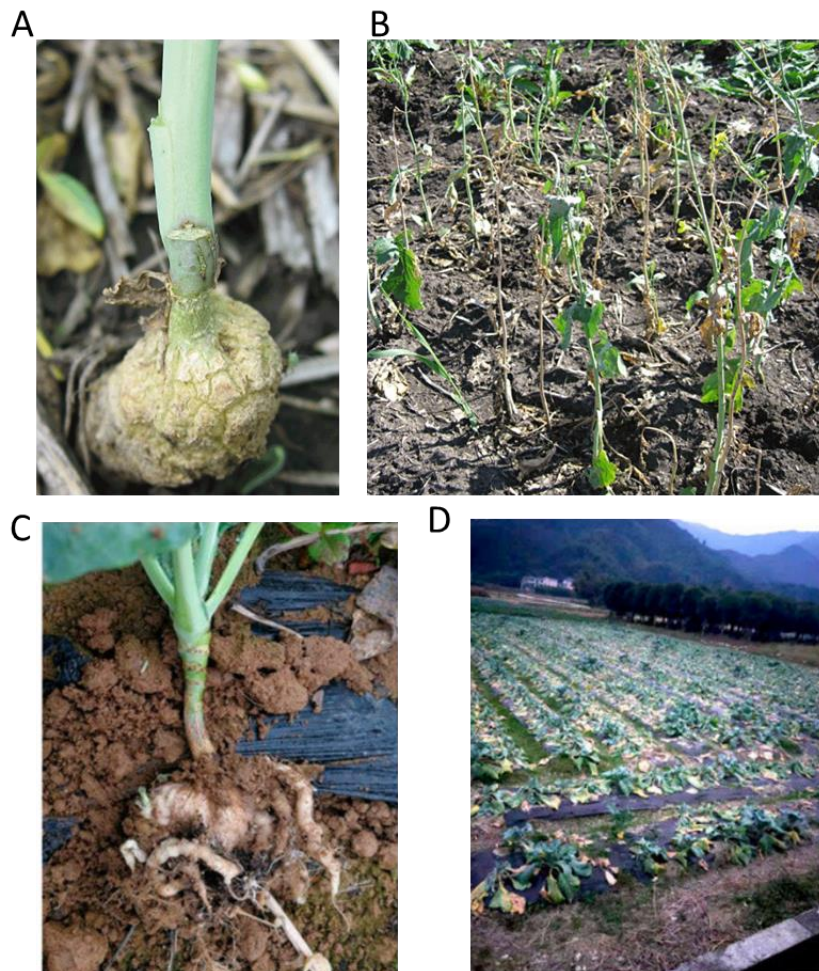


Figure I.44. : Symptômes racinaires et aériens de la hernie des crucifères sur des *Brassica*. Symptômes racinaires de la hernie sur *Brassica napus* (A) et *B oleracea* (C) et impact de ces symptômes sur les parties aériennes (B et D). Photographies tirées de Hwang et al., 2012; Shaw et al., 2022.

3. Le modèle d'interaction : Brassicaceae – *Plasmodiophora brassicae*

3.1. *Plasmodiophora brassicae*, agent causal de la hernie des crucifères

3.1.1. Enjeux économiques

La hernie des crucifères, causée par l'agent pathogène *Plasmodiophora brassicae* appartenant au genre des Rhizaria, est une maladie majeure des *Brassicaceae*, la plus large famille d'angiospermes qui contient un grand nombre de cultures d'intérêt agronomique comme le colza (*Brassica napus*), le chou (*B. oleracea*) ou le navet (*B. rapa*) (Raza *et al.*, 2020). La hernie des crucifères, découverte en 1873 par le scientifique russe M. S. Woronin, est présente en Europe depuis le 13^{ème} siècle, voire avant, et est désormais répandue sur tout le globe (**Fig. I. 43.**) Selon Dixon (2009), parmi les 6 millions d'hectares de *Brassica* cultivées chaque année, environ 11% sont infestés par la hernie. La maladie induit la formation de galles au niveau du système racinaire et le flétrissement voire la mort des cultures (**Fig. I. 44.**) Les spores de repos pouvant rester près de 17 ans dans le sol (Wallenhammar, 1996), la hernie entraîne une perte de valeur importante des surfaces cultivables (Raza *et al.*, 2020).

3.1.2. Biologie et cycle de développement de *P. brassicae*

3.1.2.1. Hôtes de *P. brassicae*

Si la majorité des études rapportent que l'infection par *P. brassicae* se fait seulement chez les membres de la famille des *Brassicaceae* (Dixon, 2009a; Gahatraj *et al.*, 2019), certaines études mettent en évidence que la germination des spores de repos peut être stimulée par des plantes qualifiées de non hôte telles que le poireau *Allium porrum*, le Ray-grass *Lolium perenne* ou le trèfle des prés, *Trifolium pratense* (Friberg *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2015), sans que ces plantes ne soient toutefois infectées. Plus récemment, Zamani-Noor *et al.* (2022) ont testé 22 espèces de plantes de couverture – utilisées dans le contrôle de l'érosion du sol ou pour optimiser sa fertilisation – et 56 mauvaises herbes. Les auteurs observent une infection supérieure à 50% chez d'autres espèces de *Brassicaceae* comme le lin bâtard *Camelina sativa*, la Capselle bourse-à-pasteur *Capsella bursa-pastoris*, le tabouret des champs, *Thlaspi arvense* ainsi que chez la moutarde des champs, *Sinapis arvensis* (Zamani-Noor *et al.*, 2022a), suggérant ainsi une très grande diversité d'hôtes de *P. brassicae* au sein de la famille des *Brassicaceae*.

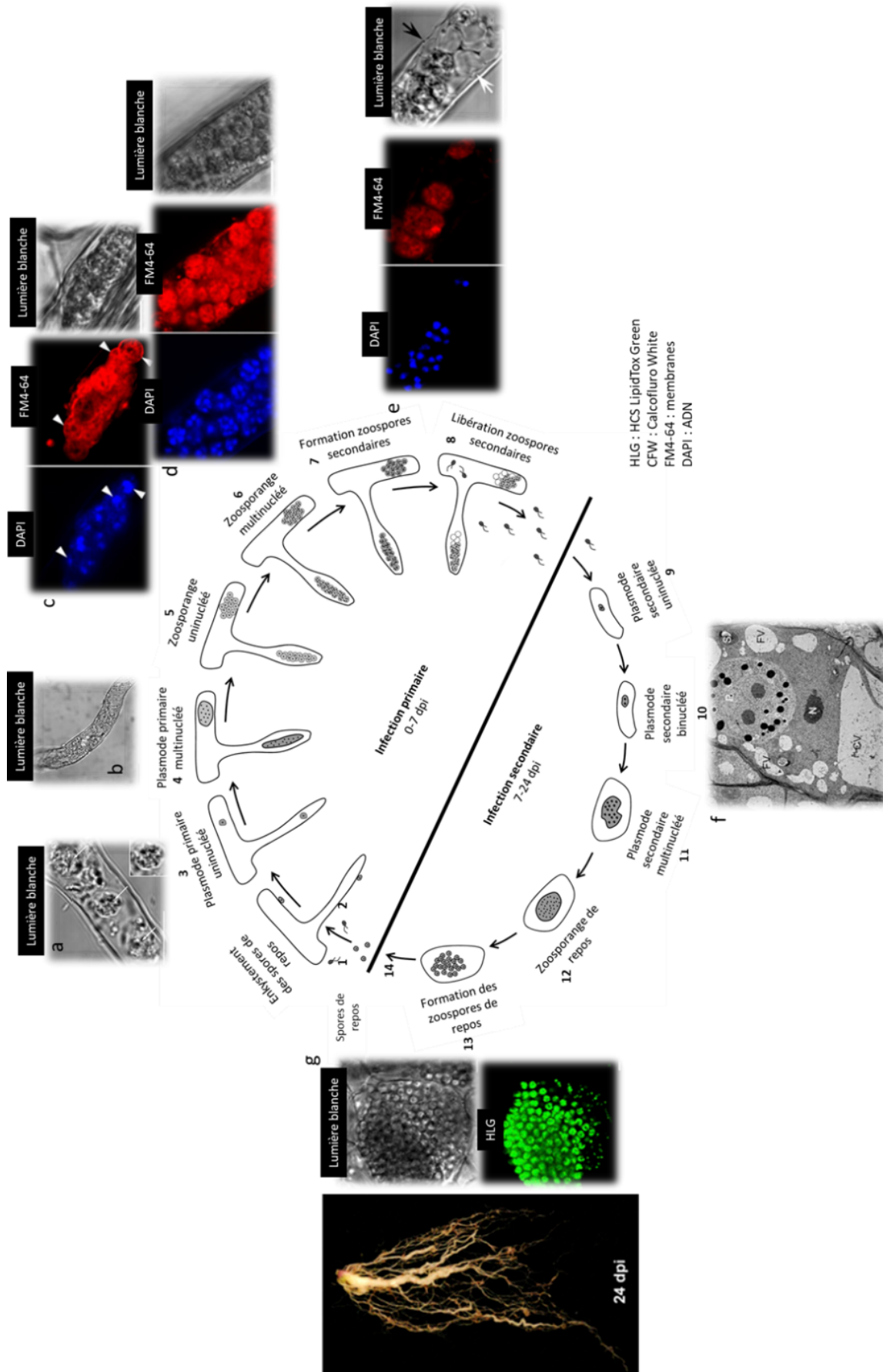


Figure I.45. : Description page suivante.

L'Arabette des dames, ou Arabette de Thalius, appartient à la famille des Brassicacées. Cette plante est considérée depuis 1998 comme une plante modèle (Fink, 1998) pour sa manipulation aisée, sa croissance rapide et la disponibilité de nombreuses données génétiques, épigénétiques ou fonctionnelles. De plus, *A. thaliana* est également une plante hôte de nombreux agents pathogènes, dont *P. brassicae* (Provart *et al.*, 2016; Woodward & Bartel, 2018).

3.1.2.2. *Cycle biologique*

P. brassicae réalise son cycle d'infection en trois phases (Dixon, 2009b; Kageyama & Asano, 2009) (**Fig. I.45.**). La première est une phase de survie et de conservation dans le sol. Les spores de repos sont capables de rester plus de 17 ans dans le sol (Wallenhammar, 1996) en conservant leur pouvoir pathogène. Ces spores de repos, dont la paroi contient 25% de chitine (Moxham & Buczacki, 1983), germent pour donner des zoospores primaires biflagellées de 2.8 à 5.9 μm de diamètre (Kageyama & Asano, 2009) qui se déplacent dans le sol dans un film d'eau fin, s'attachent sur les poils racinaires des plantes hôtes et s'y enkystent. Lors de l'infection primaire, les zoospores primaires pénètrent dans les poils racinaires grâce à une structure projectile, le Stachel, contenue dans une cavité tubulaire appelée Rohr. L'extrémité du Rohr grossit pour créer une structure appelée adhesorium qui va permettre l'adhésion au poil absorbant. Le Stachel et le contenu de la zoospore sont injectés au travers des parois et des membranes végétales jusqu'au cytoplasme de la cellule hôte et le protoplasme de la zoospore devient ensuite un plasmodium primaire multinucléé par endomitoses cruciformes successives (Braselton, 1995). Ce plasmodium primaire se divise en 4 à 16 zoospores secondaires qui sont relâchées dans le sol avant d'infecter les cellules du cortex. Lors de l'infection secondaire, les zoospores secondaires pénètrent dans les cellules corticales et cambiales de la racine et forment des plasmodia secondaires qui conduisent à une hyperplasie (division cellulaire amplifiée) et une hypertrophie (augmentation de la taille des cellules) cellulaires (Aist & Williams, 1971). L'interaction compatible d'une plante hôte et des spores de *P. brassicae* entraîne la formation de galles qui perturbent la circulation de l'eau et des nutriments. La galle devient alors un puits métabolique assimilant les ressources carbonées de la plante pour le développement du pathogène et pouvant conduire à la mort des plantes infectées (Siemens *et al.*, 2011). Une étude récente suggère que les stades de développement des zoospores secondaires jusqu'à la formation des spores de repos pourraient représenter les stades sexuels du cycle de vie de *P. brassicae* (Liu *et al.*, 2020b).

Figure I.45. Cycle d'infection de *P. brassicae*. Le cycle de vie de *P. brassicae* implique une infection primaire des poils absorbants et des cellules épidermiques de l'hôte et une infection secondaire des tissus corticaux. A) L'infection primaire commence par la germination des spores de repos (1) qui donnent des zoospores primaires qui s'enkystent sur la paroi cellulaire de l'hôte (2). Un plasmode primaire uninucléé (3,a) est produit dans les poils absorbants et conduit ensuite à la formation d'un plasmode multinucléé (4,b) à travers une succession de divisions mitotiques. Ce plasmode multinucléé conduit ensuite à la formation de zoosporanges uninucléés (5,c) puis à des zoosporanges multinucléés (6,d). Des zoospores secondaires uninucléés (7) sont produits dans chaque zoosporange multinucléé après clivage du cytoplasme et sont ensuite relargués (8,e) dans les cellules infectées ou dans le sol. B) Lors de la phase secondaire de l'infection, les cellules du cortex sont infectées par des spores secondaires et forment un plasmode secondaire uninucléé (9). Ce plasmode secondaire uninucléé subit une division mitotique et produit un plasmode secondaire binucléé (10,f) qui par une succession de divisions mitotiques conduit à la formation d'un plasmode secondaire multinucléé (11). Ce plasmode secondaire multinucléé subit une méiose et conduit à la formation d'un zoosporange de repos (12) puis à la formation (13, g) et au relargage (14) de spores de repos. Observation microscopique du cycle de l'infection de *P. brassicae* chez *A. thaliana* dans un poil racinaire. a) Plasmode primaire observé sous lumière blanche un jour après l'infection (JAI), b) Plasmode primaire multinucléé observé sous lumière blanche trois JAI. Observation en lumière blanche, au DAPI (marquage de l'ADN) et au FM4-64 (marquage des membranes) des zoosporanges uninucléés (c), multinucléés (d) à 3/4 JAI et de la libération des zoospores secondaires (e) à 6 JAI. Les flèches blanches indiquent des zoosporanges en (c). En (e), les flèches blanches indiquent des zoosporanges vides et les flèches noires indiquent des zoospores. f) Observation au microscope électronique à transmission de plasmodes secondaires binucléés au niveau des cellules du cortex, à dix JAI (FV : vacuole fragmentée, S : amidon, N : noyau de la cellule corticale, CV : vacuole centrale, P : pathogène, * = noyaux du plasmode secondaire). g) Spores de repos dans les cellules corticales observées à la lumière blanche et grâce au marqueur lipidique HLG. Symptômes observés chez *A. thaliana* à 24 JAI. Barre échelle = 10 µm. Schéma et images adaptés de Liu et al. (2020).

Si *P. brassicae* est capable d'infecter une grande diversité d'hôtes, la temporalité de son cycle de vie au sein de chaque hôte est variable. Chez *A. thaliana*, l'infection primaire débute dès l'inoculation et dure sept jours. La phase secondaire débute ensuite dès le septième jour et le cycle est accompli au bout de quinze jours avec le développement d'une galle à la place du système racinaire ; toutefois le cycle est asynchrone avec plusieurs phases pouvant coexister durant l'infection (Liu *et al.*, 2020b). Le cycle biologique de *P. brassicae* chez *B. rapa*, *B. oleracea* et *B. napus* est similaire à celui chez *A. thaliana* au niveau de l'infection primaire (0 à 7 jours) mais présente une phase d'infection secondaire plus longue (7 à 24 jours) (Liu *et al.*, 2020a; Laila *et al.*, 2020). Les galles deviennent visibles entre 14 et 35 jours après inoculation en fonction des génotypes pour *B. napus* et *B. rapa* (Laila *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2020). Certains facteurs environnementaux (Cf 3.1.3.) peuvent moduler la temporalité de ces phases d'infection. Les temps cinétiques choisis dans les différentes études aussi bien chez *A. thaliana* que les *Brassica* peuvent ainsi varier et rendre difficile la comparaison des résultats.

3.1.2.3. Diversité de *P. brassicae*

P. brassicae présente une très grande diversité moléculaire et biologique. La caractérisation du pouvoir pathogène des populations de *P. brassicae* est réalisée en utilisant des gammes d'hôtes différentiels (Tableau I.3.). Les trois gammes les plus utilisées sont : la gamme de Williams (1966) constituée de deux génotypes de *B. napus* et deux de *B. rapa* permettant d'identifier 48 pathotypes différents ; la gamme European Clubroot Differential (ECD) de Buczacki *et al.* (1975) formée de 15 génotypes de *B. napus*, *B. rapa* et *B. oleracea* permettant l'identification de 16 pathotypes ; la gamme de Some *et al.* (1996) constituée de 3 génotypes de *B. napus* permet d'identifier 8 pathotypes, dont le pathotype P1. Ces gammes ne permettent cependant pas de différencier finement les isolats au Canada ou en Chine, notamment des isolats contournant des sources de résistance, ce qui a amené à créer récemment d'autres gammes comme la « Série différentielle canadienne de la hernie » (CCD) pour laquelle Strelkov *et al.* (2018) ont ajouté aux gammes de Williams et de Somé trois génotypes de *B. napus* : « Mendel », « Westar » et « 45H29 » permettant ainsi la différenciation de 17 pathotypes canadiens. La création d'une gamme d'hôtes différentiels plus récente (Sinitic Clubroot Differential Set : SCD) utilisant huit lignées de choux chinois, permet la différenciation de 16 pathotypes (Pang *et al.*, 2020). Le faible nombre de génotypes communs aux différentes gammes rend difficile les comparaisons entre les études qui n'utilisent pas les mêmes références.

Tableau I.3. : Gammes d’hôtes différentiels créées et utilisées pour la caractérisation biologique de *P. brassicae*.

Gamme d'hôtes	Nom	Espèce	Sous-espèce	Cultivar
Williams (1966)		<i>Brassica oleracea</i>	<i>capitata</i>	Jersey Queen
				Badger Shipper
		<i>Brassica napus</i>	<i>napobrassica</i>	Laurent
				Wilhelmsburger
European Clubroot Differential (ECD, Buczacki et al., 1975)	ECD1	<i>Brassica rapa</i>	<i>rapifera</i>	
	ECD2		<i>rapifera</i>	
	ECD3		<i>rapifera</i>	
	ECD4		<i>rapifera</i>	
	ECD5		<i>pekinensis</i>	cv. Grannat
	ECD6	<i>Brassica napus</i>	<i>oleifera</i>	cv. Nevin
	ECD7		<i>napus</i>	
	ECD8		<i>napus</i>	
	ECD9		<i>napus</i>	
	ECD10		<i>napobrassica</i>	cv. Wilhelmsburger
	ECD11	<i>Brassica oleracea</i>	<i>capitata</i>	cv. Badger Shipper
	ECD12		<i>capitata</i>	cv. Bindaschsener
	ECD13		<i>capitata</i>	cv. Jersey Queen
	ECD14		<i>capitata</i>	cv. Septa
	ECD15		<i>acephala</i>	cv. Verheul
Somé et al., 1996	ECD6	<i>Brassica napus</i>	<i>oleifera</i>	cv. Nevin
	ECD10		<i>napobrassica</i>	cv. Wilhelmsburger
	Brutor		<i>oleifera</i>	
Canadian Clubroot Differential (CCD), Strelkov et al. (2018)	Brutor	<i>Brassica napus</i>		
	Mendel			
	Westar			
	45H29			
Sinitic Clubroot Differential Set (SCD) Pang et al., 2020	CR-096	<i>Brassica rapa</i>		<i>ssp. pekinensis</i>
	CR-20			
	CR-26			
	CR-77			
	222			
	CR-75			
	85-74			
	CR-73			
BJN3-1				

L'utilisation de ces différentes gammes d'hôtes permet ainsi la caractérisation des isolats de *P. brassicae* selon leur capacité à infecter certains génotypes et met en évidence une forte hétérogénéité des isolats ainsi qu'une capacité évolutive importante de ces populations. L'hétérogénéité des populations de *P. brassicae* peut s'observer à plusieurs échelles : au sein d'une galle, d'un champ ou d'une région géographique (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2001), ou à l'échelle d'un pays comme la France (Orgeur *et al.*, 2016), l'Allemagne (Zamani-Noor, 2017), le Japon (Tanaka & Ito, 2013), la Suède (Zamani-Noor *et al.*, 2022b), le Canada (Xue *et al.*, 2008; Fredua-Agyeman *et al.*, 2021) ou la Chine (Pang *et al.*, 2020).

3.1.2.4. *Génome de P. brassicae*

Le génome de l'isolat e3, originaire d'Allemagne et appartenant au pathotype 3 a été séquencé en 2015 (Schwelm *et al.*, 2015). La taille du génome est de 24 mégabases (Mb) répartis sur 16 chromosomes, nombre variant selon les isolats (Graf *et al.*, 2004). Il contient un peu moins de 10 000 gènes dont 2 000 communs aux autres Rhizaria et plus de 5 000 spécifiques à *P. brassicae* (Schwelm *et al.*, 2015). D'autres isolats ont par la suite été séquencés dont : ZJ-1 et eH du pathotype P1 (Bi *et al.*, 2016; Daval *et al.*, 2019), et SACAN-ss1 (Pb3) du pathotype P3 et AbotJE-ss1 (Pb6) du pathotype P6 (Rolfe *et al.*, 2016) (**Tableau I. 4.**). Plus récemment, Sedaghatkish *et al.* (2019) ont séquencé 43 isolats supplémentaires dont trente-cinq isolats d'origine canadienne, 2 isolats originaires des Etats-Unis et 5 de la Chine. L'étude de la structure de ces populations a conduit à la répartition de ces 43 isolats en 5 clades différents (**Fig. I. 46.**). De par la longue période de séparation géographique, les auteurs s'attendaient à une séparation des cinq souches chinoises dans un clade distinct mais 2 souches se sont retrouvées dans le clade 5 avec des souches canadiennes, et 3 souches dans le clade 3, suggérant ainsi que la pression de sélection exercée par la plante hôte influencerait ces souches de manière similaire (Sedaghatkish *et al.*, 2019).

Le génome de *P. brassicae* présente de nombreuses spécificités telles que l'absence de gènes impliqués dans la synthèse de certains acides aminés, comme le tryptophane ou la thréonine, dans la synthèse des acides gras, ainsi que dans l'assimilation du soufre et de l'azote. Ces caractéristiques sont typiques d'un parasite biotrophe obligatoire qui dépend entièrement du développement de son hôte (Schwelm *et al.*, 2015; Rolfe *et al.*, 2016; Stjelja *et al.*, 2019).

Tableau I.4. : Listes des premiers isolats de *P. brassicae* séquencés.

Isolat	Pathotype	Origine géographique	Références
ZJ-1	P1	Zhijiang city, Hubei Province, P R Chine	Bi et al., 2016
SACAN-ss1 (Pb3)	P3	Alberta, Canada	Rolf et al., 2016
AbotJE-ss1 (Pb6)	P6	British Columbia et Ontario	Rolf et al., 2016
e3	P3	Allemagne	Schwelm et al., 2015
eH	P1	France	Daval et al., 2019

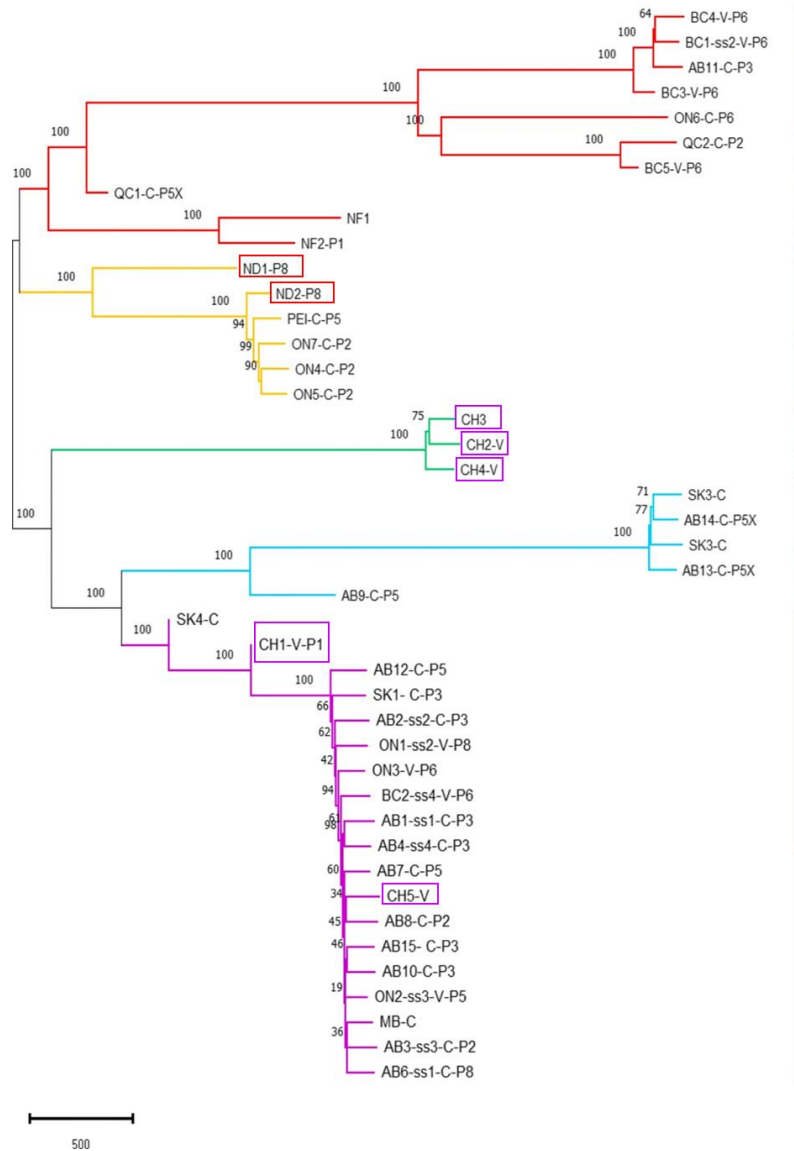


Figure I.46. : Arbre phylogénétique de 43 souches de *P. brassicae* dont 35 originaires du Canada, 5 de Chine et 2 des Etats-Unis. L'arbre phylogénétique a été réalisé en utilisant 10k SNP alignés sur le génome d'e3. L'échelle représente les distances évolutives. Le pourcentage de 1 000 essais bootstrap (1 000 répétitions) est indiqué au-dessus des branches. Les détails des souches sont résumés dans leurs noms : emplacement par province (par exemple, AB = Alberta), pathotype de Williams (par exemple, P3) lorsque disponible, et SS = isolat monospore, V = légumes : navet, chou et C = colza. Les souches encadrées en rouge sont originaires des Etats-Unis et les souches encadrées en rose originaires de Chine, les autres sont originaires du Canada (Sedaghatkish *et al.*, 2019).

Le séquençage du génome a également permis l'étude des effecteurs de *P. brassicae*. Les effecteurs sont de petits peptides sécrétés à l'intérieur des cellules végétales par l'agent pathogène qui modulent la réponse des plantes à l'infection (Rovenich *et al.*, 2014). Chen *et al.* (2019) ont ainsi identifié 33 protéines sécrétées durant la phase primaire d'infection de *P. brassicae* et ont validé deux d'entre elles, PBCN_002550 et PBCN_005499 comme induisant une accumulation d' H_2O_2 et une réponse hypersensible (HR = mort des cellules) lors de leur expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana* (**Fig. I.47. A.**). De manière similaire, Zhan *et al.* (2022) ont identifié 518 protéines sécrétées par *P. brassicae* dont 63 induisaient une HR lorsqu'elles étaient exprimées de manière transitoire dans le tabac. Douze effecteurs potentiels ont été identifiés durant l'infection d'*Arabidopsis* par *P. brassicae* dont certains sont localisés au niveau du réticulum endoplasmique des cellules végétales et d'autres au niveau de la membrane plasmique et des plasmodesmata, suggérant un rôle de ces molécules dans la régulation du trafic vésiculaire et de la communication cellule à cellule chez la plante (**Fig. I.47. B1, 2 et 3**) (Hossain *et al.*, 2021). Trente et une protéines sécrétées par *P. brassicae* dont, SSPbP22, possèdent une activité kinase et sont localisées au niveau du cytosol et du noyau des cellules de tabac lors de leur expression transitoire (**Fig. I.47. C.**) (Pérez-López *et al.* 2020).

3.1.3. Facteurs influençant le développement de la maladie

Les conditions environnementales telles que la température, le pH ou l'humidité du sol impactent la germination des spores de repos, l'infection et le développement de la hernie des crucifères (Dixon, 2009b). La phase primaire d'infection qui dure de 0 à 10 jours à 25 °C est plus lente à une température de 20°C ou de 30°C (de 0 à 14 jours) ou d'une température inférieure à 15°C (de 0 à 28 jours) (Sharma *et al.*, 2011a). La phase secondaire d'infection est également impactée par la température et dure de 10 à 22 jours à 25°C, de 14 à 30 jours à 20°C et 30°C et de 28 à 42 jours à 15°C (Sharma *et al.*, 2011b). Ces résultats suggèrent ainsi une température optimale pour le déroulement de l'infection par *P. brassicae* de 25°C.

Le pH optimal du sol pour le développement de l'infection par *P. brassicae* est compris entre 5.0 et 6.5 (Gossen *et al.*, 2013). Un pH basique a un impact négatif sur le développement de la maladie (Niwa *et al.*, 2007) mais aussi sur la viabilité des spores de repos (Takahashi, 1994).

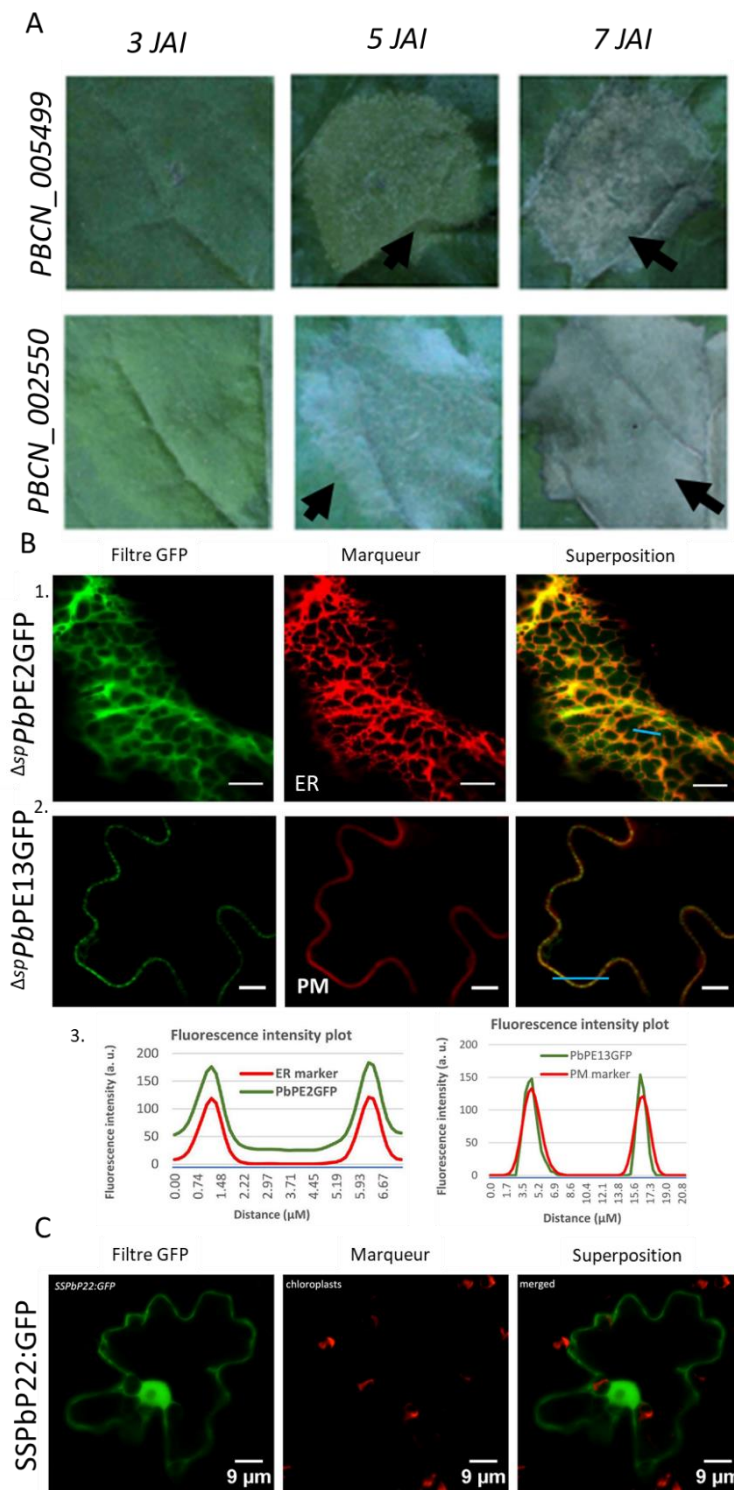


Figure I.47. : Validation du rôle d'effecteurs de *P. brassicae* par leur expression transitoire dans *Nicotiana benthamiana*. A) Expression transitoire de PBCN_005499 et PBCN_002550 dans les feuilles de tabac et observation à 3,5 et 7 jours après inoculation. Les flèches noires indiquent la présence d'une réponse hypersensible (HR). B) Expression transitoire des effecteurs *PbPE2* et *PbPE14* fusionné à la GFP et dont le signal peptide (permettant l'export de la protéine hors de la cellule du pathogène) a été enlevé (Δsp). Sur ces photographies prises au microscope confocal, est visible en B.1, l'expression de *PbPE2* au niveau du réticulum endoplasmique (ER) grâce à : un filtre GFP qui montre la localisation de l'effecteur, au marqueur mCherry-HDEL qui marque le réticulum endoplasmique et à la superposition des deux images et en B.2, la localisation de *PbPE13* au niveau de la membrane plasmique végétale (PM) grâce à : un filtre GFP qui montre la localisation, au marqueur REMORIN1.3mRFP de la membrane plasmique et à la superposition des deux images. Les traits bleus présents sur B.1 et B.2 correspondent aux régions dont l'intensité de fluorescence à été évaluée et est présentée en B.3. Barre d'échelle = 10 μm . C) Image confocale de la localisation de *SSPbP22:GFP* dans les cellules foliaires de tabac et permettant de localiser cet effecteur au niveau du noyau et du cytoplasme grâce à : un filtre GFP, l'auto-fluorescence des chloroplastes et la superposition des deux filtres. Barre d'échelle = 9 μm . Figure adaptée de (Chen *et al.*, 2019c; Pérez-López *et al.*, 2020; Hossain *et al.*, 2021)

L'interaction entre le pH du sol et la température peut affecter également l'infection, avec une infection optimale de 100% pour des pH compris entre 5 et 6.5 et des températures comprises entre 20 et 25°C (Gossen *et al.*, 2013). L'infection est réduite à des pH supérieurs à 7.0, mais un développement sévère des symptômes peut être observé pour un pH de 8 lorsque les températures (20-25°C) et l'humidité du sol sont optimales. L'humidité du sol est un facteur important dans le processus d'infection de *P. brassicae* puisqu'elle impacte notamment la viabilité des spores de repos. (Takahashi, 1994) démontre que la viabilité des spores de repos dans le sol est supérieure à 80% lorsque le sol présente une forte humidité (plus de 55% d'humidité) et inférieure à 60 % lors d'une humidité relative du sol égale à 35%. Une étude plus ancienne a également rapporté qu'il fallait au moins une humidité du sol égale à 75% pour assurer un indice de maladie égale à 60% (Hamilton & Crête, 1978).

D'autres caractéristiques physico-chimiques du sol impactent le développement de la hernie. Webster & Dixon (1991) démontraient que l'application d'une quantité de bore de 10 ppm (partie par millions) entraîne une diminution de la maladie tandis que Botero-Ramirez *et al.* (2021) n'ont pas mis en évidence de corrélation entre le nombre de spores et la quantité de bore sur des échantillons prélevés en champ. L'ajout de matière minérale, comme la chaux qui impacte le pH, permet une baisse de l'infection (Myers, 1985) mais l'incidence de la maladie augmentait avec la taille des particules de chaux et une moins bonne homogénéité du mélange de substrat (Dobson, 1983). L'apport de matières organiques telles que du compost ou du fumier entraîne également une réduction de l'infection (Niwa *et al.*, 2007).

3.1.4. Détection de la maladie et moyens de lutte

3.1.4.1. *Détection de P. brassicae dans le sol*

La hernie des crucifères est une maladie complexe à contrôler de par la capacité des spores de repos de *P. brassicae* à survivre dans le sol pendant plus de dix-sept ans (Wallenhammar, 1996). La détection de spores de repos dans le sol peut se faire à travers l'utilisation de plantes leurres (bait crop) et notamment de *B. rapa* permettant l'évaluation de l'infection des sols (Samuel & Garrett, 1945; Macfarlane, 1952) mais ces méthodes biologiques ne sont efficaces que lorsque la concentration de spores dans le sol est importante (environ 1000spores/g de sol) (Faggian & Strelkov, 2009).

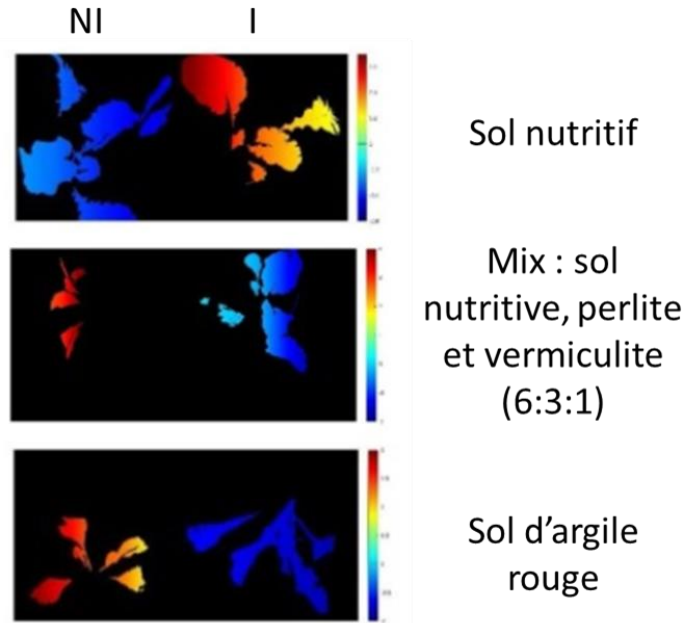


Figure I.48 : Utilisation de l'imagerie hyperspectrale pour évaluer l'infection des plantes par *P. brassicae* cinq semaines après l'inoculation. Les plantes de gauches sont un individu *B. rapa* « ECD5 » non infecté (NI) et les plantes à droite, d'un individu *B. rapa* « ECD5 » infecté (I) par la hernie sous différent sol : un sol riche en nutriments, un mix de substrat et un sol d'argile. Les différentes couleurs présentent les différents scores obtenus lors du traitement de la prise d'images de chaque plante : en bleu des scores négatifs et en rouge/orange des scores positifs. Ce qui est intéressant de noter c'est une différence des scores obtenus chez les plantes non infectées (NI ; gauche) avec les plantes infectées (I, droite), quel que soit le sol utilisé. (Feng *et al.*, 2022)

Des méthodes, basées sur des approches moléculaires de PCR permettent l'identification de la présence de spores *via* notamment l'amplification de gènes codant la petite sous-unité (SSU) et la grande sous-unité (LSU) de l'ARN ribosomique nucléaire des espaceurs transcrits internes (ITS1 et ITS2) et une sous-unité 5,8S, permettant également la discrimination de plusieurs isolats de différentes origines géographiques (Zhou *et al.*, 2018; Gossen *et al.*, 2019; Padrón-Rodríguez *et al.*, 2022; Tso *et al.*, 2022). Dernièrement, l'utilisation d'images hyperspectrales sur les parties aériennes du géotype *ECD5* a permis de mettre en évidence une différence entre les plantes infectées par *P. brassicae* et les plantes non infectées sans destruction des échantillons (Feng *et al.*, 2022) (**Fig. I.48.**). Cependant, ces études sont expérimentales et des travaux complémentaires portés sur d'autres pathosystèmes pourraient conduire à d'autres résultats. De plus, il n'existe actuellement pas de corrélation établie entre les couleurs présentées (**Fig. I.48.**) et les processus physiologiques impactés par l'infection par *P. brassicae*.

3.1.4.2. *Pratiques culturales et nutrition minérale*

La rotation des cultures n'est pas la méthode la plus efficace pour pallier à l'infection des champs par *P. brassicae* (Peng *et al.*, 2014), cependant, la capacité de certaines plantes à induire la germination des spores sans permettre le cycle complet de la maladie peut conduire à la réduction de l'inoculum d'un sol comme c'est notamment le cas pour le poireau, le seigle d'hiver ou le ray-grass anglais (Friberg *et al.*, 2005; Hwang *et al.*, 2015). Le chaulage permet une alcalinisation des sols et une réduction de l'incidence de la maladie. Cette méthode reste limitée du fait de l'effet d'autres paramètres tels que la préparation du sol, l'humidité du sol et sa texture ou la temporalité de l'application et du semis (Donald & Porter, 2009). Des labours adaptés peuvent également participer à l'élimination des spores dans le sol puisque leur survie est significativement réduite au contact des rayons UV et de la lumière (Zahr *et al.*, 2021).

Une fertilisation minérale adaptée des plantes pourrait également conduire à un contrôle de la maladie et une augmentation de la résistance. L'application de calcium conduit ainsi à une réduction du nombre de spores de repos dans le sol (Myers, 1985). Une augmentation de la quantité en bore dans le sol diminue également le développement de la maladie aux stades primaire et secondaire de l'infection (Webster & Dixon, 1991). Un apport en azote réduit peut également conduire à la résistance de certains géotypes (Laperche *et al.*, 2017; Aigu *et al.*, 2022).

3.1.4.1. *Lutte chimique*

L'utilisation de molécules de synthèse destinées à la stérilisation des sols (formaldéhyde ou le bromure de méthyle) est aujourd'hui strictement encadrée à cause de leur toxicité et de leur impact négatif sur l'environnement (Seiber *et al.*, 1997). Certains fongicides permettent également le contrôle de *P. brassicae*. Le plus efficace, le chlorure de mercure (CalomelTM) a cependant été retiré du marché mondial du fait de sa forte toxicité sur les mammifères et sa rétention dans l'environnement. Le fongicide fluazinam (ShirlanTM ou OmegaTM), agit sur la production d'énergie chez les champignons et permet une réduction de la survie des spores de repos (Guo *et al.*, 1991; Donald & Porter, 2009). Actuellement, et depuis plus de dix ans, aucun produit pesticide n'est autorisé en Europe dans la lutte contre *P. brassicae*.

3.1.4.2. *Lutte biologique*

L'infection des plantes par *P. brassicae* entraîne une modification de la communauté microbienne avec notamment une baisse de la présence de *Flavioslibacter*, *Streptomyces* et *Bacillus* (Lebreton *et al.*, 2019). L'utilisation de certains microorganismes du sol, antagonistes de *P. brassicae* comme *Bacillus subtilis* et *Gliocladium catenulatum* conduit, par exemple, à une réduction de plus 54% des symptômes d'un génotype sensible de *B. napus* (Peng *et al.*, 2011) ou *Trichoderma harzianum* qui réduit de presque 50% la germination des spores de repos (Yu *et al.*, 2015) en modulant notamment la communauté microbienne du sol (Li *et al.*, 2020). D'autres microorganismes comme par exemple *Bacillus velezensis* et *B. amyloliquefaciens* répriment l'infection primaire (Zhu *et al.*, 2020) en produisant des antibiotiques et des peptides antimicrobiens. Il a été aussi démontré que le microbiote racinaire a un impact sur le développement de l'infection et peut modifier la réponse transcriptomique aussi bien de la plante hôte que celle de *P. brassicae* (Daval *et al.*, 2020).

3.1.4.3. *Lutte génétique*

L'un des meilleurs moyens de lutter contre la hernie des crucifères reste à ce jour la lutte génétique par la création de variétés résistantes. Chez *B. oleracea* les premières variétés résistantes commercialisés étaient Clapton, Clarify, Tekila, Kilaton et Kilaxy et Mendel et Tosca chez *B. napus*.

Croisement / Population	Nom QTL	Chromosome / Groupe de liaison	Isolat (Pathotype)	R ² (%)	Conditions particulières	Ref
'Darmor-bzh' × 'Yudal'	A03b	A03	K92-16 (P4)	92.52	DI under N1	Laperche et al., 2017
	A03bxC02	epistatic	K92-16 (P4)	0.91	DI under N1	
	A05a	A05	eH (P1)	2.42	DI under N1	
	A07	A07	eH (P1)	1.48	DI under N1	
	A09	A09	K92-16 (P4)	1.45	DI under N1	
	C02	C02	eH (P1)	12.98	DI under N1	
	C02	C02	K92-16 (P4)	1.72	DI under N1	
	C03	C03	eH (P1)	7.75	DI under N1	
	C09	C09	eH (P1)	66.51	DI under N1	
	A03b	A03	K92-16 (P4)	92.82	DI under N8	
	A05c	A05	eH (P1)	1.04	DI under N8	
	A07	A07	eH (P1)	0.58	DI under N8	
	A09	A09	K92-16 (P4)	1.7	DI under N8	
	C02	C02	eH (P1)	1.84	DI under N8	
	C02	C02	K92-16 (P4)	0.91	DI under N8	
	C03	C03	eH (P1)	1.93	DI under N8	
	C09	C09	eH (P1)	86.83	DI under N8	
C02	C02	eH (P1)	10.08	ΔDI		
C09	C09	eH (P1)	48.7	ΔDI		
472 accessions de <i>B.napus</i>	<i>MCR-A4</i>	A04	(P4)	4.96	Li et al., 2016	
	<i>MCR-C3</i>	C03	(P4)	4.81		
	<i>MCR-C3</i>	C03	(P4)	4.88		
	<i>MCR-C9</i>	C09	(P4)	4.21		
	<i>SCR-A10a</i>	A10	(P4)	4.96		
	<i>SCR-A10b</i>	A10	(P4)	5.19		
	<i>SCR-C3</i>	C03	(P4)	4.34		
	<i>SCR-C4a</i>	C04	(P4)	6.51		
	<i>SCR-C4b</i>	C04	(P4)	4.79		
<i>SCR-C6</i>	C06	(P4)	5.9			
'Darmor-bzh' × 'Yudal'	NA	LG DY 2	PB137-522 (P7)	15	Manzanares-Dauleux et al., 2000	
	<i>Pb-Bn1</i>	LG DY4	K92-16 (P4)	19.4		
	NA	LG DY15	K92-16 (P4)	13.4		
	<i>Pb-Bn1</i>	LG DY4	PB137-522 (P7)	98.1		
population HD DH914	<i>PbBn-01.07-1</i>	N03	1.07	44.5	Werner et al., 2007	
	<i>PbBn-01.07-2</i>	N08	1.07	22.2		
	<i>PbBn-01.07-3</i>	N13	1.07	28.6		
	<i>PbBn-01:60-1</i>	N03	01:60	15.8		
	<i>PbBn-01:60-2</i>	N13	01:60	11.7		
	<i>PbBn-01:60-3</i>	N19	01:60	10.3		
	<i>PbBn-01:60-4</i>	N19	01:60	18.4		
	<i>PbBn-1-1</i>	N03	1	51.3		
	<i>PbBn-1-2</i>	N08	1	18.7		
	<i>PbBn-a-1</i>	N08	a	31.9		
	<i>PbBn-e4x04-1</i>	N19	e4x04	42.3		
	<i>PbBn-k-1</i>	N02	k	17.6		
	<i>PbBn-k-2</i>	N03	k	67.5		
	<i>PbBn-k-3</i>	N15	k	14.7		
	<i>PbBn-Korp-1</i>	N09	Korporal	12.4		
	<i>PbBn-Korp-2</i>	N09	Korporal	12.7		
	<i>PbBn-Korp-3</i>	N09	Korporal	18.3		
<i>PbBn-Korp-4</i>	N16	Korporal	18.8			
<i>PbBn-Korp-5</i>	N16	Korporal	11.7			
84 HD	<i>Rcr10(ECD01)</i>	A03	(P3A)	16.2	Yu et al., 2022	
	<i>Rcr10(ECD01)</i>	A03	(P3D)	27.3		
	<i>Rcr10(ECD01)</i>	A03	(P3H)	17.9		
	<i>Rcr9(ECD01)</i>	A08	(P3A)	43.3		
	<i>Rcr9(ECD01)</i>	A08	(P3D)	21.5		
	<i>Rcr9(ECD01)</i>	A08	(P3H)	43.1		
	<i>Rcr9(ECD01)</i>	A08	(P5X)	42.8		

Tableau I.5. : QTL et gènes majeurs identifiés dans la réponse de *B. napus* à *P. brassicae*. Dans le tableau sont présentés successivement : La population utilisée, le nom des QTL, leur localisation chromosome/groupe de liaison), l'isolat et le pathotype, la variance phénotypique expliquée et les conditions particulières de détection. Les gènes et QTL majeurs sont indiqués en gras, les QTL présentant un effet modifié par les conditions abiotiques en orange et les QTL présentant un effet différent en fonction de l'isolat en vert.

Aujourd'hui plusieurs variétés résistantes existent mais pour la plupart portant des résistances sous contrôle monogénique (et probablement le même gène de résistance) qui ont une efficacité limitée face à la diversité des isolats de *P. brassicae*. Le contournement de ces résistances est observé couramment.

3.2. Les facteurs de résistance génétique identifiés chez les *Brassicaceae*

L'identification des gènes de résistance à la hernie chez les *Brassica* et *Arabidopsis* ont permis de mettre en évidence que certaines résistances identifiées dépendaient des isolats ou des conditions abiotiques appliquées. Les résistances génétiques identifiées chez *B. napus*, *B. oleracea*, *B. rapa*, *B. nigra* et *A. thaliana* sont présentées dans les sections suivantes.

3.2.1. Résistances identifiées chez *B. napus*

De nombreuses études ont conduit à la caractérisation de l'architecture génétique de la réponse de *B. napus* à *P. brassicae* (**Tableau I.5.**). En utilisant une population d'haploïdes doublés (HD) issue du croisement *B. napus* Darmor-*bzh* x Yudal, Manzanares-Dauleux *et al.* (2000) ont identifié un gène majeur *Pb-Bn1* expliquant plus de 98% de la résistance observée et trois QTL expliquant entre 13.4 et 19.4 % de la variabilité phénotypique en fonction de l'isolat. Dix-neuf QTL expliquant entre 10.3 et 67.5% de variabilité phénotypique ont également été détectés vis-à-vis de 7 isolats de *P. brassicae* par Werner *et al.* (2008) sur la population d'HD issue d'un croisement entre un colza synthétique résistant et le cultivar sensible « Express ». Dix QTL à effet mineur, expliquant moins de 5.19% de la variabilité phénotypique, ont été identifiés sur une population de 472 accessions de *B. napus* (Li *et al.*, 2016b). Parmi ces locus, *MCR-C9* et *SCR-C6* contiennent entre 18 et 10 gènes organisés en clusters codant des TIR-NBS-LRR (Li *et al.*, 2016b). L'utilisation d'une lignée issue du croisement interspécifique entre la lignée résistante *B. rapa* ECD01 et la lignée sensible *B. napus* DH16516 a permis la production de 84 haploïdes doublées et l'identification de deux QTL, *Rcr10*^{ECD01} et *Rcr9*^{ECD01} (Yu *et al.*, 2022). Ces deux locus sont localisés sur les chromosomes A03 et A08, respectivement, et confèrent une résistance à plusieurs pathotypes de *P. brassicae* dont les pathotypes 3A, 3D et 3H pour le *Rcr10*^{ECD01} et les pathotypes 3A, 3D, 3H et 5X pour *Rcr9*^{ECD01} (Yu *et al.*, 2022). Les travaux de Laperche *et al.* (2017) et Aigu *et al.* (2022) rapportent l'identification de plusieurs QTL à effets majeur et modéré pour deux isolats et dont l'effet de certains dépend de l'apport en azote.

Tableau I.6. : QTL et gènes majeurs identifiés dans la réponse de *B. oleracea* à *P. brassicae*. Dans le tableau sont présentés successivement : La population utilisée, le nom des QTL, leur localisation (chromosome/groupe de liaison), l'isolat et le pathotype, la variance phénotypique expliquée et les conditions particulières de détection. Les gènes et QTL majeurs sont indiqués en **gras** et les QTL présentant un effet différent en fonction de l'isolat en **vert**.

Croisement / Population	Nom QTL	Chromosome / Groupe de liaison	Isolat (Pathotype)	R ² (%)	Ref
107 HD	<i>pb-3</i>	LG 3	ECD16/3/30	54	Voorrips et al., 1997
	<i>pb-4</i>	LG 1	ECD16/3/30	6	
<i>population F3 issue du croisement entre Anju (R) et GC (S)</i>	<i>PbBo(Anju)1</i>	O2	(P4)	47	Nagaoka et al., 2010
	<i>PbBo(Anju)2</i>	O2	(P4)	4	
	<i>PbBo(Anju)3</i>	O3	(P4)	9	
	<i>PbBo(Anju)4</i>	O7	(P4)	3	
	<i>PbBo(GC)1</i>	O5	(P4)	9	
HDEM x C10	<i>Pb-Bo1</i>	Bo1	Ms6 (P1)	34	Rocherieux et al., 2004
	<i>Pb-Bo1</i>	Bo1	K92 (P2)	77.4	
	<i>Pb-Bo1</i>	Bo1	Pb137-522 (P7)	80.7	
	<i>Pb-Bo1</i>	Bo1	K92-16 (P4)	68	
	<i>Pb-Bo1</i>	Bo1	eH (P1)	20.7	
	<i>Pb-Bo2</i>	Bo5b	Ms6 (P1)	6.8	
	<i>Pb-Bo2</i>	Bo2	K92 (P2)	2.5	
	<i>Pb-Bo2</i>	Bo2	eH (P1)	21	
	<i>Pb-Bo3</i>	Bo3	Pb137-522 (P7)	4.7	
	<i>Pb-Bo4</i>	Bo4	K92-16 (P4)	2.8	
	<i>Pb-Bo5a</i>	BO5a	Ms6 (P1)	4.3	
	<i>Pb-Bo5a</i>	Bo5a	K92-16 (P4)	3.3	
	<i>Pb-Bo5a</i>	Bo5a	eH (P1)	4.2	
	<i>Pb-Bo5b</i>	Bo5b	Ms6 (P1)	3	
	<i>Pb-Bo5b</i>	Bo5b	eH (P1)	6.1	
	<i>Pb-Bo8</i>	Bo8	K92 (P2)	2.1	
	<i>Pb-Bo9a</i>	Bo9a	eH (P1)	5.5	
	<i>Pb-Bo9b</i>	Bo9b	Ms6 (P1)	3.4	
<i>F2 issues du croisement entre le chou « GZ87 » résistant à la hernie (R) (contre la race 4) et le chou sensible (S) « 263 ».</i>	<i>qCRc4-1</i>	C04	(P4)		Ce et al., 2021
	<i>qCRc7-1</i>	C07	(P4)		
	<i>qCRc7-2</i>	C07	(P4)		
	<i>qCRc7-3</i>	C07	(P4)		
	<i>qCRc7-4</i>	C07	(P4)		

En effet, l'effet du QTL identifié sur le chromosome C09 et conférant une résistance aux isolats K92-16 et eH dépend de l'apport azoté.

3.2.2. Résistances identifiées chez *B. oleracea*

Chez *B. oleracea*, plusieurs QTL de résistance, qu'ils soient à effet majeur ou modéré ont également été identifiés (**Tableau I.6.**). Rocherieux *et al.* (2004) ont rapporté 9 QTL, expliquant entre 2.8 et 80.7% de la variabilité phénotypique, impliqués dans la résistance dans une population issue du croisement entre l'accession de chou fourrager C10, résistante et le brocoli sensible, HDEM. Parmi ces QTL, le QTL *Pb-Bol*, identifié vis-à-vis de tous les isolats évalués, a montré un effet fort face aux isolats Pb137-522, K92 et K92-16 (R^2 supérieurs à 68%) et un effet plus faible (R^2 inférieur à 35%) face aux isolats Ms6 et eH (Rocherieux *et al.*, 2004). Cinq QTL, expliquant entre 3 et 47 % de la variabilité phénotypique, ont été identifiés sur une population issue du croisement entre deux lignées HD : Anju, résistante et GC, sensible (Nagaoka *et al.*, 2010). Plus récemment, Ce *et al.* (2021) ont identifié quatre nouveaux QTL sur une population issue du croisement entre le cultivar résistant GZ87 et le chou sensible '263'. Sous le QTL *qCRc7*, deux gènes induits chez le génotype résistant et réprimés chez le génotype sensible ont été identifiés et codent un « FCS-like zing finger » pour *Bol037115* et un récepteur de type LRR pour *Bol042270* (Ce *et al.*, 2021).

3.2.3. Résistances identifiées chez *B. rapa*

La résistance à la hernie chez *B. rapa* a été identifiée comme sous contrôle polygénique ou contrôlée par des gènes majeurs en fonction des génotypes résistants étudiés (**Tableau I.7.**). Le locus *Cra* a été identifié dans une population issue du croisement entre des haploïdes doublés de choux chinois *B. rapa* ssp. *pekinensis* (Matsumoto *et al.*, 1998) dont la cartographie fine a permis l'identification de gènes de la classe des TIR-NBS-LRR au sein de cette région (Ueno *et al.*, 2012). Les loci *Crr1* et *Crr2* (Suwabe *et al.*, 2003) ont été identifiés sur une population issue du croisement entre *B. rapa* L. 'G004', résistant, et 'Hakusai Chukanbihon Nou 7', sensible. Le locus *Crr1* a été plus tardivement identifié comme étant composé de deux loci : *Crr1a* et *Crr1b* (Hatakeyama *et al.*, 2013). L'utilisation de la population issue du croisement Shinkin x 94SK a permis l'identification du locus *Crb* (Piao *et al.*, 2004). Chez *B. rapa* ssp. *campestris*, le locus *Crr3* (Hirai *et al.*, 2004) a été identifié à partir d'une population issue du croisement entre le génotype résistant N-WMR-3 et la lignée haploïde doublée sensible, A9709.

Tableau I.7. : QTL et gènes majeurs identifiés dans la réponse de *B. rapa* à *P. brassicae*.
 Dans le tableau sont présentés successivement : La population utilisée, le nom des QTL, leur localisation (chromosome/groupe de liaison), l'isolat et le pathotype, la variance phénotypique expliquée et les conditions particulières de détection. Les gènes et QTL majeurs sont indiqués en **gras**.

Croisement / Population	Nom QTL	Chromosome / Groupe de liaison	Isolat (Pathotype)	R ² (%)	Ref
<i>F2</i> "877" x "255"	<i>Bcr1</i>	A03	Pbh	33.3	Zhan et al., 2022
	<i>Bcr2</i>	A08	Pbh	13.3	
<i>F2 ECD02 x CR2599; F2 ECD02 x CR1505</i>	<i>BraA3P5G.CRa/b</i> ^{Kato} 1.1	A03	(P5G)	23.3	Fredua-Agyeman et al., 20
	<i>BraA3P5G.CRa/b</i> ^{Kato} 1.2	A03	(P5G)	21.8	
	<i>BraA3P5G.CRa/b</i> ^{Kato} 1.2	A03	(P5G/P5X)	32.5	
	<i>BraA3P5X.CRa/b</i> ^{Kato} 1.1	A03	(P5X)	4.5	
	<i>BraA3P5X.CRa/b</i> ^{Kato} 1.2	A03	(P5X)	51	
	<i>BraA3P5X.CRa/b</i> ^{Kato} 1.2	A03	(P5G/P5X)	35.6	
<i>F2</i> T136-8 x Q5	<i>Cra</i>	LG3	(P2)	majeur	Matsumoto et al., 1998
<i>F2</i> CR Shinki x 94SK	<i>Crb</i>		(P4)	majeur	Piao et al., 2004
<i>F2</i> de "Cr Kanko" x "Q5"	<i>CRc</i>	LG R2	?	majeur	Sakamoto et al., 2008
<i>F2</i> de "Cr Kanko" x "Q5"	<i>CRk</i>	LG R3	M85 (P2), K04	majeur	
<i>F2</i> A9709 x G004	<i>Crr1a</i>	A08	Ano-01 (P3)		Suwabe et al., 2003, Hatakeyama et al., 2012
<i>F2</i> A9709 x G004	<i>Crr1b</i>	A08	Ano-01 (P3)		
<i>F2</i> A9709 x G004	<i>Crr2</i>	A01	Ano-01 (P3)		Suwabe et al., 2003
<i>F3</i> A9709 x N-WMR-3.	<i>Crr3</i>		Ano-01 (P3)	majeur	Hirai et al., 2003
<i>F2</i> IT033820 x BP097	<i>Pb-Br3</i>	LG R3	SSI79-2-1 (P4)	14.9	Cho et al., 2012
<i>F2</i> IT033820 x BP097	<i>Pb-Br8</i>	LG R8	SSI79-2-1 (P4)	19.1	
<i>F2</i> A9709 x G004	<i>Rcr1</i>	A03			Chu et al., 2014
<i>T19 x ACDC</i>	<i>Rcr4</i>	A03	(P2)	85	Yu et al., 2017
	<i>Rcr4</i>	A03	(P3)	92	
	<i>Rcr4</i>	A03	(P5)	94	
	<i>Rcr4</i>	A03	(P6)	93	
	<i>Rcr4</i>	A03	(P8)	93	
	<i>Rcr8</i>	A02	(P5X)	36	
	<i>Rcr9</i>	A08	(P5X)	39	

Deux autres loci à effet majeur, *CRk* et *CRc* ont été identifiés chez des lignées haploïdes doublées résistants à divers isolats de *P. brassicae* (Sakamoto *et al.*, 2008). Cho *et al.* (2012) ont identifié deux QTL, *Pb-Br3* et *Pb-Br8* expliquant 14.9 et 19.1% de la variabilité phénotypique, respectivement. Ces deux QTL ont été identifiés sur une population de 149 individus issus du croisement entre un navet résistant (IT033820) et un chou sensible (BP079). Les gènes de résistance *Rcr4*, *Rcr7*, *Rcr8* et *Rcr9* ont été identifiés sur une population issue du croisement entre la lignée résistante *B. rapa* T19 et la lignée sensible ACDC (Yu *et al.*, 2017b). Ces gènes de résistance ont des effets modérés à majeurs avec une variabilité phénotypique expliquée entre 36 et 92%. Fredua-Agyeman *et al.* (2020) ont détecté 4 QTL d'effet faible à modéré (entre 4.5 et 35% de variance phénotypique expliquée) sur deux populations, issues du croisement du génotype résistant ECD02 avec deux génotypes sensibles. Deux locus, *Bcr1* et *Bcr2* ont été identifiés sur une population F2 issue du croisement entre un navet résistant et un sensible expliquant 33.3 et 13.3% de la variabilité phénotypique et sous lesquels se trouvent trois et deux gènes codant des TIR-NBS-LRR, respectivement (Zhang *et al.*, 2022b). Chez *B. nigra*, un QTL a été identifié sur le chromosome B03 qui présente des homologies de séquence avec le chromosome A08 de *B. rapa* (Chang *et al.*, 2019).

3.2.4. Résistances identifiées chez *A. thaliana*

Fuchs (1996), a identifié une région d'intérêt appelée *RPBI*, localisée sur le chromosome 1 et conférant une résistance à l'isolat *e*. L'intervalle de confiance de *RPBI* a été affiné (Arbeiter *et al.*, 2002) et les gènes causaux *RPBI* et *RPBI-like-4* ont récemment été validés à travers une approche de production de mutant CRISPR KO dans plusieurs fonds génétiques (Ochoa *et al.*, 2023). Jubault *et al.* (2008) ont détecté 4 QTL additifs contrôlant la résistance partielle portée par Bur-0, en utilisant une population RIL issue du croisement entre l'accession Bur-0, et l'accession sensible, Col-0 (Alix *et al.*, 2007). Les QTL *Pb-At1*, *Pb-At4*, *Pb-At5.1* et *Pb-At5.2*, respectivement localisés sur les chromosomes 1, 4 et 5 d'*A. thaliana* confèrent une résistance partielle à *Arabidopsis* lorsqu'ils portent l'allèle de Bur-0. Quatre QTL à effet épistatique ont également été identifiés sur les chromosomes 1, 2 et 4. (**Fig. I.49.**) Le QTL *Pb-At5.2* expliquant 22.6% de la variance phénotypique a été finement cartographié au sein du laboratoire. La création de mutants CRISPR cas-9 a également permis de valider l'implication de deux gènes sous-jacents au QTL dans la résistance partielle à la hernie : *AT5G47260* et *AT5G47280* codant des récepteurs de type NLR (Liégard *et al.*, 2019a).

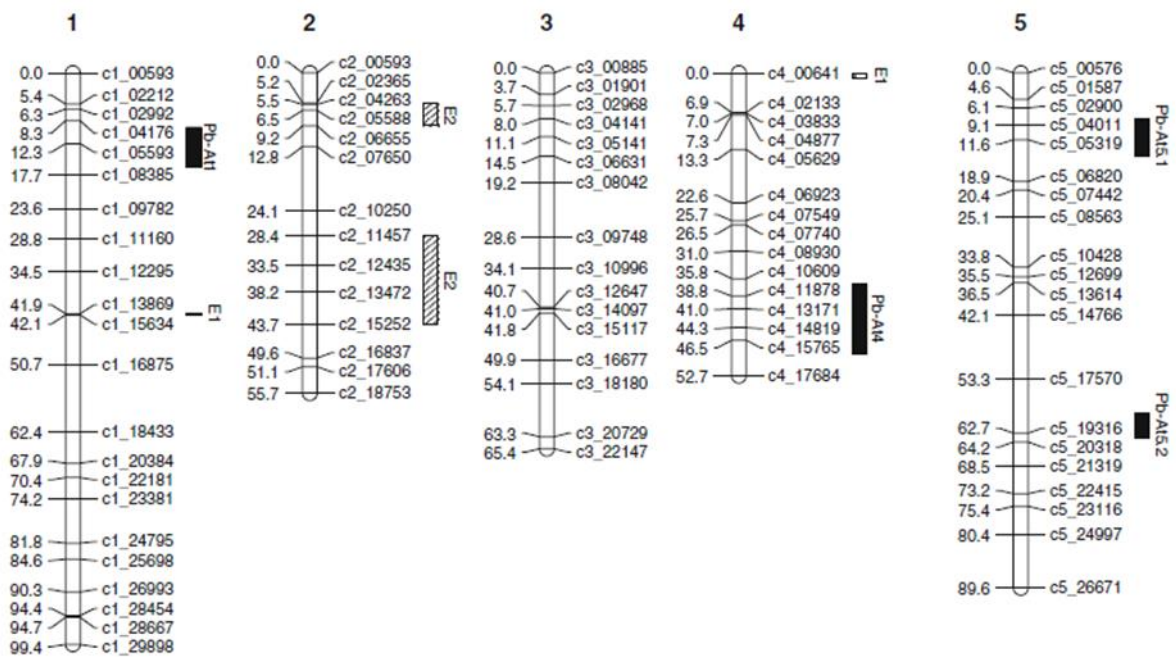


Figure I.49. : QTL additifs et épistatiques contrôlant la résistance partielle à *P. brassicae* identifiés dans la population recombinante issues du croisement Bur-0 × Col-0. Chaque nom de marqueur est constitué du numéro du chromosome et de sa position physique en kb. Les QTL additifs détectés dans la population RIL sont indiqués par des barres de couleur noire. La longueur de la barre est égale à l'intervalle de confiance déterminé avec une probabilité d'un LOD. Les interactions épistatiques significatives détectées par une recherche complète par paires sont indiquées par des paires de barres hachurées (Jubault *et al.*, 2008b).

3.3. Impact de l'infection par *P. brassicae* sur la plante hôte

L'infection de la plante hôte par *P. brassicae* conduit à de nombreuses modifications, à la fois morphologiques, hormonales et physiologiques qui s'accompagnent d'une reprogrammation importante de l'expression des gènes et des processus épigénétiques. Dans cette partie seront présentées ces modifications lors de la réponse de sensibilité et de résistance de la plante hôte à l'infection par *P. brassicae*.

3.3.1. Modifications morphologiques

L'infection des poils racinaires des plantes par *P. brassicae* n'entraîne pas de symptôme morphologique visible lors de la phase primaire d'infection. Des symptômes au niveau racinaire apparaissent au cours de l'infection des cellules du cortex lors de la phase secondaire d'infection (Kageyama & Asano, 2009). La prolifération des zoospores secondaires entraîne une division cellulaire accrue (hyperplasie) et un élargissement (hypertrophie) des cellules du cortex ce qui conduit, à la fin du cycle de développement de l'agent pathogène, au remplacement du système racinaire de l'hôte par des galles (Kobelt *et al.*, 2000; Dixon, 2009b). Cette modification majeure de la structure racinaire des plantes hôtes perturbe l'absorption de nutriments et la circulation de l'eau dans la plante. Aux stades avancés de la maladie, les parties aériennes des plantes flétrissent, présentent une accumulation d'anthocyanes, se nécrosent voire tombent. Les galles pourrissent et la maladie se termine par la mort de la plante (Dixon, 2009a).

3.3.2. Bouleversement du contenu hormonal de la plante hôte

Dès les premières heures de l'infection et au cours de l'infection des plantes par *P. brassicae*, un bouleversement hormonal est observé chez la plante hôte.

Cytokinines (CK)

L'accumulation des CK observée dans les racines des plantes infectées pourrait être d'origine pathogénique et serait impliquée dans l'induction de la multiplication cellulaire (Müller & Hilgenberg, 1986; Devos *et al.*, 2006). Les spores de *P. brassicae* sont capables de synthétiser de faibles quantités de cytokinines (Müller & Hilgenberg, 1986), insuffisantes toutefois pour impacter le développement de l'hôte (Malinowski *et al.*, 2016).

Au niveau transcriptomique, de nombreuses études rapportent de la modulation de gènes impliqués dans la biosynthèse ou la dégradation des CK mais la temporalité de cette expression varie beaucoup entre espèces hôtes. Chez *A. thaliana*, les voies de dégradation et biosynthèse des CK sont réprimées durant l'infection primaire par *P. brassicae* (Siemens *et al.*, 2006; Malinowski *et al.*, 2016) et l'accumulation de cytokinines se déroulerait au début de l'infection secondaire, lors de l'étape d'initiation de la division cellulaire (Devos *et al.*, 2006). Chez *B. napus*, une augmentation de la teneur en cytokinines est rapportée dès deux jours après l'infection (Prerostova *et al.*, 2018). Chez *B. rapa*, l'induction de gènes impliqués dans la biosynthèse des CK a été observée lors des phases primaire et secondaire (Laila *et al.*, 2020) et une accumulation de la teneur des CK 25 jours après l'infection (JAI) (Dekhuijzen, 1980).

Auxine

L'implication de l'auxine dans l'infection des plantes par *P. brassicae* a été démontrée de nombreuses fois. Cependant, l'accumulation d'auxine dans les racines est très variable entre les espèces hôtes au cours du cycle de l'infection. Une augmentation de la quantité d'auxine a été enregistrée chez *B. rapa* (Ludwig-Müller *et al.*, 1993; Devos *et al.*, 2005) à 10/12 et 6 JAI. Cependant, chez *B. rapa*, une baisse de la quantité d'auxine a été observée à 14 et 21 jours (Ludwig-Müller *et al.*, 1993; Devos *et al.*, 2006). Chez *B. napus*, Prerostova *et al.* (2018) observent une accumulation d'auxine tout au long du cycle de l'infection. Chez *B. rapa*, une accumulation d'auxine est rapportée durant les trois premières jours de l'infection avant de diminuer jusqu'à 20 jours après l'infection (Wei *et al.*, 2023). Ces résultats contradictoires peuvent être dus à la difficulté d'extraire l'auxine ou à la diversité des points cinétiques et des espèces considérées (Ludwig-Müller, 2009).

Chez *A. thaliana* l'infection conduit à l'expression de plusieurs nitrilases – impliquées dans la biosynthèse de l'auxine – lors de la formation des galles (Grsic-Rausch *et al.*, 2000). D'autres gènes, codant des récepteurs de l'auxine, *TIR1*, *AFB1* et *ABP1* et des cibles (*GH3*) de facteurs de transcription répondant à l'auxine (*AUXINE RESPONSIVE FACTOR* : *ARF*) sont significativement induits lors de l'infection (Jahn *et al.*, 2013; Irani *et al.*, 2018). Chez *B. rapa*, deux gènes *BrPIN1* – impliqués dans le transport de l'auxine – et *BrDCK1* – codant un récepteur de l'auxine – sont induits durant l'infection des cellules du cortex (Robin *et al.*, 2020).

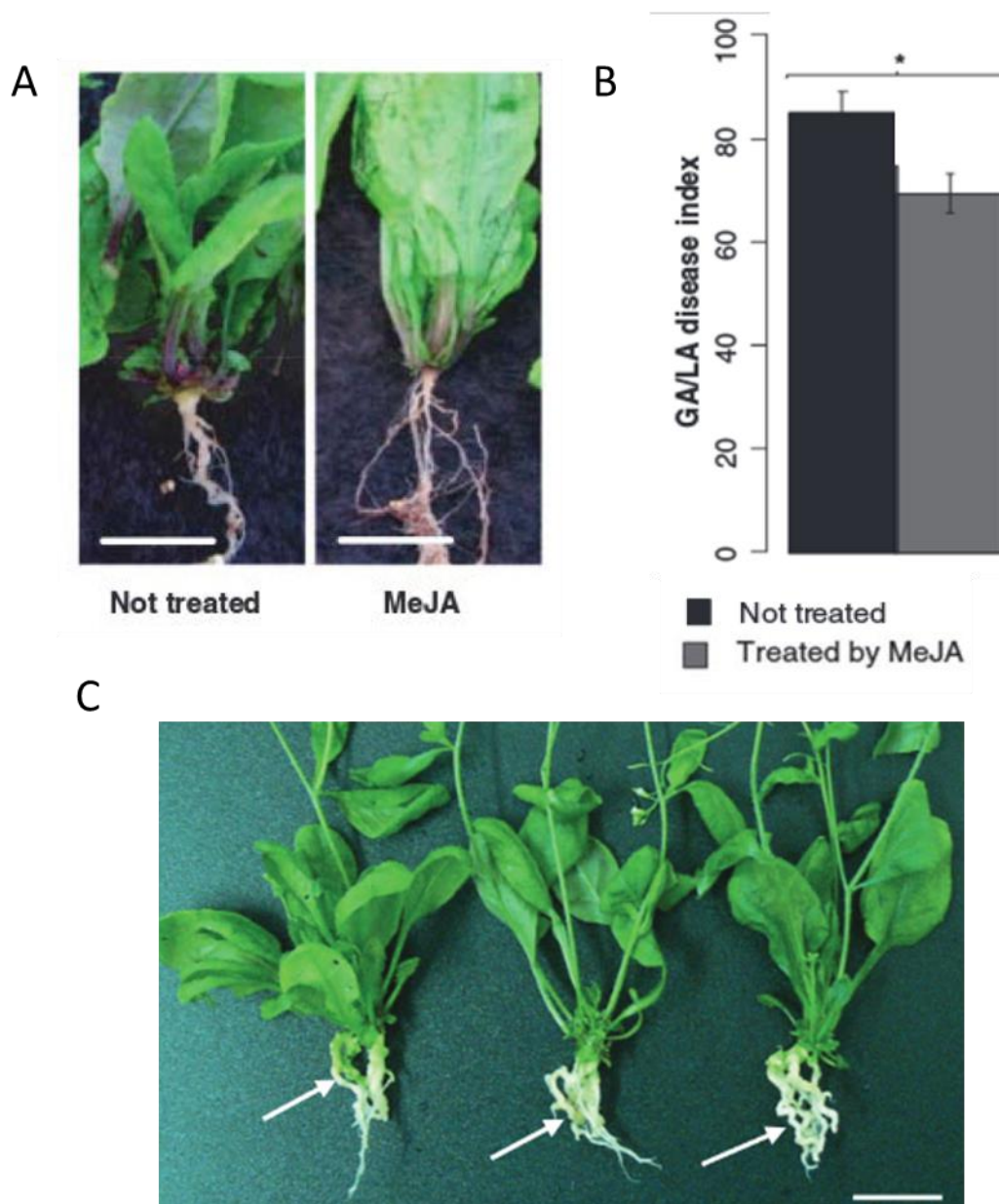


Figure I.50. : Evaluation du rôle de l'acide jasmonique (JA) dans la réponse d'*A. thaliana* à la hernie. A) Impact de l'application de 50 μ M de méthyljasmonate (MeJA) tous les deux jours durant l'infection jusqu'à 21 jours sur la réponse de l'écotype sensible Col-0 à la hernie, barre d'échelle = 1.6 cm, B) Evaluation quantitative des symptômes à 21 dpi en utilisant l'indice de la maladie GA/LA, exprimant la surface des galles par rapport à la taille des feuilles de la rosette, chez des plantes traitées (ou non) avec 1mL de JA à 50 μ M tous les deux jours dix jours après l'infection jusqu'à 21 jours après l'infection. Les barres d'erreur représentent l'écart type SE (12 plantes par bloc, 4 blocs randomisés). Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives selon les tests de Wald appliqués sur un modèle linéaire mixte, * p -value <0,05. C) Symptôme chez l'écotype sensible Col-0 (gauche) et deux mutants altérés dans la voie des JA dont *jar1* (centre) et *coi1* (droite) 31 jours après l'infection. Barre d'échelle = 1cm. (Agarwal *et al.*, 2011; Lemarié *et al.*, 2015a)

Chez les Brassicacées, la synthèse des glucosinolates est liée à celle de l'auxine, il est donc possible que l'augmentation des teneurs en glucosinolates dans les tissus infectés soit impliquée dans la synthèse d'auxine. Chez le chou chinois, Ludwig-Müller *et al.* (1997) démontrent que la teneur en glucosinolates augmente chez deux variétés sensibles à la hernie et reste stables chez les génotypes résistants. Des mutants chez *A. thaliana* altérés dans la voie de biosynthèse des glucosinolates, montrent une résistance plus importante à la hernie. En effet, par l'action des myrosinases, les glucosinolates peuvent être transformés en 3-indole-acétonitrile (IAN) qui peut ensuite être transformé en auxine (acide 3-indole-acétique (IAA)). L'expression de la myrosinase a d'ailleurs été démontrée dans les tissus infectés de choux chinois 28 jours après l'inoculation (Grsic *et al.*, 1999).

Acide abscissique (ABA)

La formation des galls au niveau des racines des plantes infectées conduit à une altération du circuit de l'eau dans la plante. La diminution de la conductance stomatique observée par Evans & Scholes (1995), l'augmentation de la teneur en ABA au niveau des tissus infectés chez *B. rapa* (Devos *et al.*, 2005) et *B. napus* (Jayasinghege *et al.*, 2023) et l'induction de gènes répondant à la sécheresse chez *A. thaliana* – par exemple *RAB18* (*responsive to ABA*), *RD20* et *RD22* (*responsive to dehydration*) – suppose, lors de l'infection par *P. brassicae*, une réponse de la plante en partie similaire à la réponse de la plante à un stress hydrique.

Acide jasmonique (JA)

Une surexpression des gènes impliqués dans la biosynthèse (*LOX2*) et dans la réponse au jasmonate (*THI2.1*, *ARGAH2* et *NATA1*) a été observé durant l'infection (Siemens *et al.*, 2006; Agarwal *et al.*, 2011; Gravot *et al.*, 2012; Jubault *et al.*, 2013). Une accumulation de JA a été observée chez certains génotypes, dont l'écotype sensible Col-0, qui représenterait ainsi une réponse de défense basale de la plante, mais insuffisante pour limiter les symptômes de la hernie (Lemarié *et al.*, 2015a). Bien que l'application de JA sous sa forme méthylée (meJA) conduise à une réduction des symptômes (Lemarié *et al.*, 2015a) (**Fig. I.50. A et B**), des mutants altérés dans la voie de signalisation des JA présentent un indice pathologique égal à celui de l'écotype sauvage Col-0 (Agarwal *et al.*, 2011) (**Fig. I.50.C**).

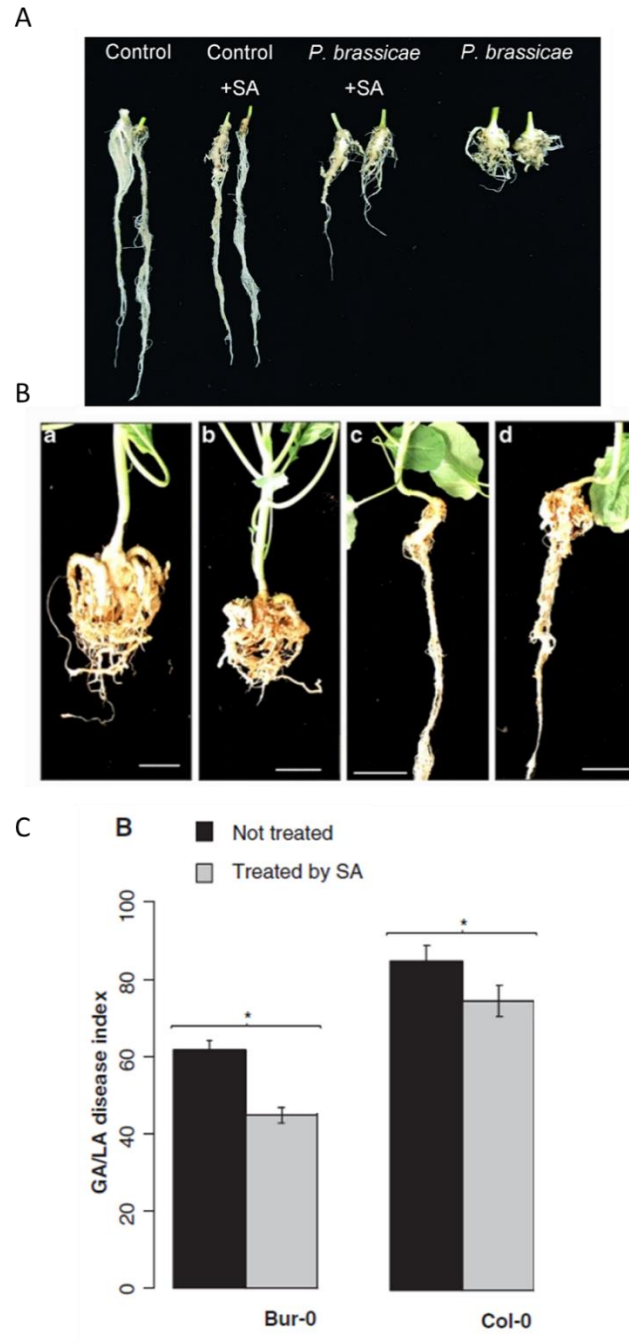


Figure I.51. : Evaluation du rôle de l'acide salicylique (SA) dans la réponse des *Brassica* à la hernie. A) *B. campestris* (*B. rapa*) de 40 jours traité avec 0.6 mM de SA dix jours après la germination et tous les jours pendant quatre jours, non inoculée (Control) ou inoculée avec *P. brassicae*. B) Effet d'un traitement au SA de a. 0 mM, b. 0.5 mM, c. 1mM et d. 2.5mM appliqué 24h avant l'inoculation par *P. brassicae*. Barre d'échelle = 2 cm. Et C) Evaluation quantitative des symptômes à 21 dpi en utilisant l'indice de la maladie GA/LA, exprimant la surface des galls par rapport à la taille des feuilles de la rosette, chez des plantes traitées (ou non) avec 1mL de SA à 500 μ M tous les deux jours, dix jours après l'infection et jusqu'à 21 jours après l'infection. Les barres d'erreur représentent l'écart type SE (12 plantes par bloc, 4 blocs randomisés). Les astérisques indiquent des différences statistiquement significatives selon les tests de Wald appliqués sur un modèle linéaire mixte, * p -value <0,05. (Lovelock *et al.*, 2013; Lemarié *et al.*, 2015a; Xi *et al.*, 2021).

Acide salicylique (SA)

L'accumulation d'acide salicylique (SA) est associée à la résistance partielle de l'écotype Bur-0 (Jubault *et al.*, 2013; Lemarié *et al.*, 2015a), et l'application exogène de SA lors de l'infection de *B. rapa*, *B. oleracea* et *A. thaliana* conduit à une réduction des symptômes (Lovelock *et al.*, 2013; Lemarié *et al.*, 2015a; Xi *et al.*, 2021) (**Fig.I.51. A, B et C**). Toutefois, dans une étude transcriptomique récente réalisée chez des lignées résistantes de *B. rapa*, l'expression de gènes impliqués dans l'accumulation de l'acide salicylique est réduite comparée au génotype sensible (Wei *et al.*, 2021b).

Ethylène (ET)

L'éthylène était considéré comme un régulateur mineur de la résistance des plantes à la hernie (Knaust & Ludwig-Müller, 2013) mais récemment, l'éthylène a été montrée comme impliquée dans la résistance de la plante lors de l'infection primaire tout en favorisant le développement de l'agent pathogène lors de l'infection secondaire (Wang *et al.*, 2022).

3.3.3. Détournement du métabolisme

Métabolisme carboné

De par sa nature biotrophe, *P. brassicae* est dépendant des ressources énergétiques de son hôte pour se développer et l'hypothèse que les ressources carbonées de la plante hôte soit détournées au profit de l'agent pathogène a été émise par Evans & Scholes (1995). Cette hypothèse concorde avec les observations réalisées sur le métabolisme carboné chez les plantes infectées. Le contenu en sucres est augmenté dans les tissus infectés (Brodmann *et al.*, 2002). Chez *B. rapa*, la quantité de glucose et de fructose est réduite dans les feuilles et augmentée dans les racines après l'infection, suggérant une translocation des sucres des parties aériennes aux racines après l'infection (Li *et al.*, 2018b). Par ailleurs, quatorze transporteurs de sucres sont induits durant l'infection de *B. rapa* par le pathogène, parmi eux, le transporteur *SWEET11a* a été fonctionnellement validé chez *A. thaliana* puisque le mutant-KO *sweet11a* présente une infection retardée comparé à un écotype sauvage, suggérant leur rôle essentiel dans le développement de la maladie (Li *et al.*, 2018b). Plusieurs invertases, hydrolysant le sucrose en monomères d'hexose, dont l'invertase pariétale *AtcwINVI* et l'invertase vacuolaire *ATBfruct4*, sont induites dans les galles (Siemens *et al.*, 2011).

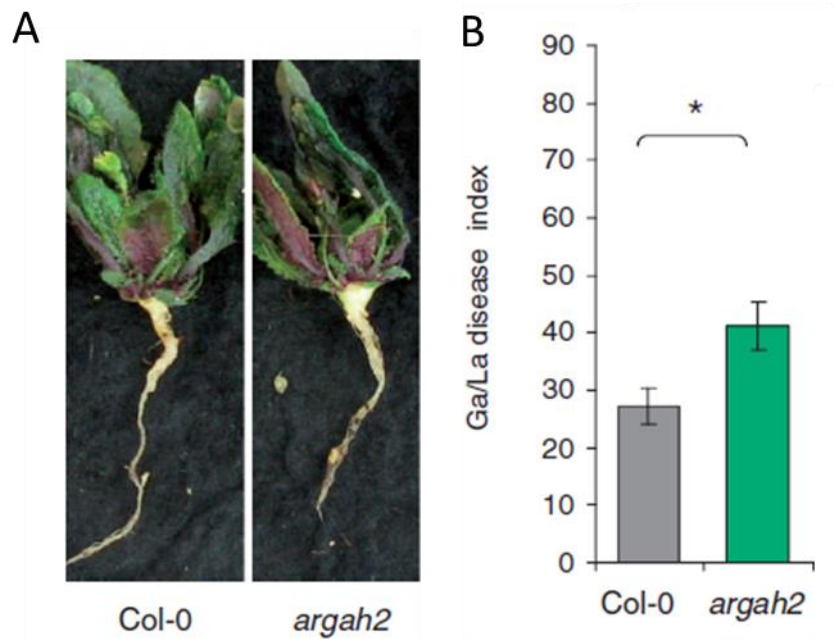


Figure I.52. : L'inhibition de l'arginase *ARGAH2* conduit à une augmentation des symptômes. A) Illustration des symptômes de la hernie chez un individu Columbia sauvage (Col-0) et chez le mutant *argah2* à 21 jours après inoculation (21 JAI). B) Evaluation quantitative des symptômes à 21 dpi en utilisant l'indice de la maladie GA/LA, exprimant la surface des galles par rapport à la surface des feuilles de la rosette. Les barres d'erreur représentent l'écart type SE (n=8, et chaque répétition est composée d'au moins sept plantes). Les astérisques représentent des différences statistiquement significatives avec le t-test ($p\text{-value} < 0,05$). Figure adaptée de Gravot et al. (2012).

Les spores de *P. brassicae* sont également capables de produire du sucre, et notamment du tréhalose qui s'accumule dans les tissus infectés (Brodmann *et al.*, 2002).

Métabolisme spécialisé

Certains métabolites spécialisés induits lors de conditions particulières par la plante (environnements défavorables et/ou attaques d'agents pathogènes) sont également accumulés dans les tissus infectés par *P. brassicae*. Chez *A. thaliana* on observe une augmentation de la teneur en naringénine (flavonoïdes) dans les galles à la fin de l'infection secondaire (Päsold *et al.*, 2010), ainsi qu'une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans la biosynthèse des flavonoïdes dans les tissus infectés, dès les premières 48h suivant l'infection (Siemens *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2017a). Cependant, le mutant *tt4*, qui n'accumule pas de flavonoïdes, présente moins de symptômes et pourrait suggérer un rôle de ces composés dans les réponses de résistance de la plante (Päsold *et al.*, 2010).

Nutrition azotée et aminée

Le génotype « Yudal » de *B. napus* présente une résistance à la hernie en condition de limitation en azote associée à la régulation de certains gènes impliqués dans l'absorption du nitrate, *NRT2* et *NR* ce qui pourrait suggérer une réponse croisée entre la nutrition de la plante et la résistance partielle à la hernie (Aigu *et al.*, 2022). L'altération de l'expression de l'arginase *ARGAH2*, enzyme impliquée dans la remobilisation de l'azote, la défense des plantes aux insectes phytophages et dans la limitation de la prolifération cellulaire, entraîne de plus grands symptômes chez *A. thaliana* et fait partie de la défense basale de Col-0 (Gravot *et al.*, 2012) (**Fig.I.52.**).

3.3.4. Modifications épigénétiques chez la plante hôte suite à l'infection par *P. brassicae*

Seules quelques études se sont focalisées sur l'implication des mécanismes épigénétiques dans la réponse à l'infection par *P. brassicae* et ne concernent que les ARN non codants (miARN et lncARN).

Implication des miRNA dans la réponse des *Brassica* à la hernie des crucifères

Les résultats de six études concernant l'impact de l'infection par la hernie sur le niveau d'expression des miRNA chez *B. napus*, *B. rapa* et *B. juncea* sont présentés dans le **Tableau I.8.**

Tableau I.8. : Liste des miARN impliqués dans l'interaction *Brassica-P. brassicae*. Dans les colonnes sont indiqués, de gauche à droite : les familles des miARN identifiées, le nom des miARN, l'espèce et la sensibilité/résistance du génotype évalué ainsi que le pathotype de *P. brassicae* utilisé. Les temps cinétiques de prélèvement variant entre chaque étude, nous avons regroupé les temps par phase d'infection : primaire (72h/3 JAI) et secondaire (9 à 20 JAI). L'induction des miARN lors de l'infection est représentée par un rectangle vert et une répression par un rectangle rouge.

Famille miARN	miARN	Espèce	Suceptible / Resistant	Pathotype	Infection primaire		Infection secondaire			References
					72 h	3 JAI	9 JAI	10 JAI	15 JAI	
MIR156	ahy-miR156b-3p	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	ath-miR156h	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	bdi-miR156	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	ath-miR157a	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	ahy-miR156c	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	miR156_2	<i>B. juncea</i>	Suceptible	?						Cai et al., 2023
MIR159	miR156e-3p	<i>B. juncea</i>	Suceptible	?						Cai et al., 2023
	bra-miR319-3p	<i>B. rapa</i>	Suceptible	P4						Wei et al., 2023
	miR319a-3p	<i>B. juncea</i>	Suceptible	?						Cai et al., 2023
	ath-miR159a	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	zma-miR159e	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	aqc-miR159	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
MIR160	osa-miR160e	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	ppt-miR160C	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	aqc-miR160a	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	miR160a-5p	<i>B. juncea</i>	Suceptible	?						Cai et al., 2023
MIR162	osa-miR162b	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	miR162-39	<i>B. juncea</i>	Suceptible	?						Cai et al., 2023
MIR164	bra-miR164b-5p	<i>B. rapa</i>	Suceptible	P4						Wei et al., 2023
	bra-miR164e-5p	<i>B. rapa</i>	Suceptible	P4						Wei et al., 2023
	miR164a	<i>B. rapa pekinensis</i>	Resistant	P4						Wei et al., 2016
	bra-miR164a	<i>B. rapa pekinensis</i>	Resistant	P4						Wei et al., 2016
	osa-miR164c	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	miR164-c	<i>B. juncea</i>	Suceptible	?						Cai et al., 2023
MIR166	zma-miR166n	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	osa-miR166e	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	zma-miR166c	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
MIR167	bra-miR167a	<i>B. rapa</i>	Suceptible	P4						Wei et al., 2023
	ahy-miR167-3p	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	miR167a	<i>B. juncea</i>	Suceptible	?						Cai et al., 2023
MIR168	bna-miR168b	<i>B. napus</i>	Resistant	P4						Li et al., 2021
MIR169	mtr-miR169f	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	ath-miR169a	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	ath-miR169d	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	ath-miR169h	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	bna-miR169c	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	bna-miR169m	<i>B. napus</i>	Resistant	P4						Li et al., 2021
	miR169m	<i>B. juncea</i>	Suceptible	?						Cai et al., 2023
	bna-miR169n	<i>B. napus</i>	Resistant	P4						Li et al., 2021
	mtr-miR169d	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	mtr-miR169e	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
MIR172	bdi-miR169b	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	ath-miR172b	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	ath-miR172c	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	bra-miR172b	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	ptc-miR172i	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
	vvi-miR172a	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3						Verma et al., 2014
MIR2111	bra-miR2111b-3p	<i>B. rapa pekinensis</i>	Resistant	P4						Wei et al., 2016
MIR395	bna-miR395d	<i>B. napus</i>	Resistant	P4						Li et al., 2021
	miR395a	<i>B. juncea</i>	Suceptible	?						Cai et al., 2023
	miR395b	<i>B. juncea</i>	Suceptible	?						Cai et al., 2023
MIR396	ath-miR396a	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3					Verma et al., 2014	
MIR529	ppt-miR529g	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3					Verma et al., 2014	
MIR854	ath-miR854a	<i>B. napus</i>	Suceptible	P3					Verma et al., 2014	
MIR1885	miR1885a	<i>B. rapa</i>	Resistant	P4						Paul et al., 2021
	miR1885a	<i>B. rapa</i>	Resistant	P4						Paul et al., 2021

Chez des génotypes sensibles à la hernie, les membres de la famille *MIR160*, *MIR166* et *MIR169* sont induits lors de la phase secondaire d'infection (Verma *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2021b) et les membres de la famille *MIR159*, dont miR319 (Wei *et al.*, 2023) et miR159 ainsi que *MIR172*, *MIR396*, *MIR529* (Verma *et al.*, 2014) sont réprimés durant les phases primaires et secondaires de l'infection. L'expression dans les tissus infectés des membres de la famille *MIR164* est plus contrastée. En effet, bra-miR164b-5p est induit chez un génotype sensible de *B. rapa* au début de l'infection primaire mais réprimé au début de la phase secondaire (Wei *et al.*, 2023). Au niveau de la famille *MIR167*, le miARN bra-miR167a est induit lors de la phase primaire d'infection mais réprimé lors de la phase secondaire (Wei *et al.*, 2023). Si quatre des miARN de la famille *MIR156* sont induits dans les tissus infectés d'un génotype sensible, le miARN ahy-miR156b-3p est induit durant la phase de transition entre les phases primaire et secondaire de l'infection mais réprimé lors de la phase secondaire d'infection (Verma *et al.*, 2014). Le miARN ath-miR854a est réprimé lors de la phase de transition de l'infection et induit lors de l'infection secondaire (Verma *et al.*, 2014). L'étude de Cai *et al.* (2023) sur un génotype sensible de moutarde (*B. juncea*) a également mis en avant le rôle des miARN dès les premières heures de l'infection primaire. *MIR156*, *MIR162*, *MIR164*, *MIR167* et *MIR395* sont réprimés tandis que *MIR169*, *MIR160* et *MIR319* sont induits durant les premiers stades de l'infection (72 heures après l'infection). Dans leurs travaux, Wei *et al.* (2023) ont identifié Bra-miR164e-5p, bra-miR164c-5p, et bra-miR164b-5p comme régulant négativement trois gènes, *Bra001480* (*NAC1*), *Bra028685* (*NAC4*) et *Bra030820* (*NAC1*), codant des protéines impliquées dans la régulation de la teneur en auxine et éthylène et dans le développement latéral des racines. D'autres paires de miARN/mARN, tel que le couple bra-miR319a-5p et *Bra018280* (*TCP10*) sont impliqués dans la modulation des signaux et l'inhibition de la synthèse d'auxine (Wei *et al.*, 2023).

Une étude plus récente a permis de valider fonctionnellement le rôle de miR167 dans la réponse des *Brassica* à la hernie (Liao *et al.*, 2023). Le clonage et la transformation médiée par *Agrobacterium* d'*A. thaliana* a permis de créer deux lignées surexprimant ou réprimant bra-miR167 (STTM164a). La lignée surexprimant bra-miR167a chez *A. thaliana* présentant des symptômes plus importants que la lignée STTM164a, réprimant l'expression de *miR167a*, suggère un rôle de ce miARN dans le développement des galles. Les auteurs ont également montré que le rôle de miR167a dans la réponse de sensibilité à la hernie semble avoir lieu à travers la répression de ses cibles *TIR1*, *AFB2* et *AFB3*, gènes impliqués dans la modulation de l'accumulation d'auxine et à travers la répression de gènes de défense tels que *PR1*, *PR5* et *MPK3*.

Chez des génotypes résistants, les familles *MIR168* et *MIR169* (Li *et al.*, 2021b) sont induites lors de l'infection secondaire de *B. napus* et le miR164a est réprimé chez un génotype résistant de *B. rapa* (Wei *et al.*, 2016). Ces travaux ont étudié le rôle des miRNA de manière globale. Le travail de Paul *et al.* (2021), sur *B. rapa*, rapporte le rôle d'un miRNA précis, miR1885. Il existe deux formes de *miR1885* ; miR1885a et miR1885b. MiR1885a et b sont significativement induits dans les premières étapes de l'infection primaire dans le génotype résistant à la hernie, CR Shinki et sont exprimés seulement 15 jours après infection chez le génotype sensible 94SK. Parmi les 16 cibles identifiées pour miR1885a et b, une stricte complémentarité a été trouvée entre miR1885b et les gènes *Bra019412* et *Bra019410*, localisés au niveau du locus *Crb* identifié chez *B. rapa*, codant très probablement une protéine avec un domaine TIR.

Implication des lncARN dans la réponse des *Brassica* à la hernie des crucifères

L'implication des longs ARN non codants (lncARN) n'a été évaluée que dans l'interaction *B. napus*-*P. brassicae*. Cinq cent trente lncARN répartis de manière homogène sur le génome, ont été détectés comme différentiellement exprimés entre un génotype sensible et un génotype résistant au cours de l'infection (Summanwar *et al.*, 2019). Sur ces 530 lncARN, 345 étaient induits et 185 réprimés chez le sensible et 170 induits et 337 réprimés chez le résistant au cours de l'infection. Huit lncARN ont été détectés spécifiquement chez le sensible et 15 chez le résistant. Tous les lncARN différentiellement exprimés entre le génotype résistant et le sensible seraient potentiellement impliqués dans la régulation d'ARN messagers et de miARN. Par exemple les lncARN *LNC_001065*, *LNC_001165* et *LNC_001146* ciblent des gènes impliqués dans la défense des plantes. Le *LNC_001167* a été prédit par Summanwar *et al.* (2019) comme impliqué dans la régulation de trois gènes de résistance codant des récepteurs « toll interleukin 1 receptor nucleotide-binding site LRR ». Ces auteurs ont également prédit que certains lncARN identifiés dans leurs travaux étaient impliqués dans le contrôle des miARN. Ainsi *LNC_001191* serait potentiellement impliqué dans la régulation de *bnamiR6028*. Certains lncARN possèdent une structure en épingle à cheveux et ont d'ailleurs été prédits comme des précurseurs de miRNA, comme par exemple *LNC_001710* qui a été prédit comme un précurseur de miRNA-160a (Summanwar *et al.*, 2019).

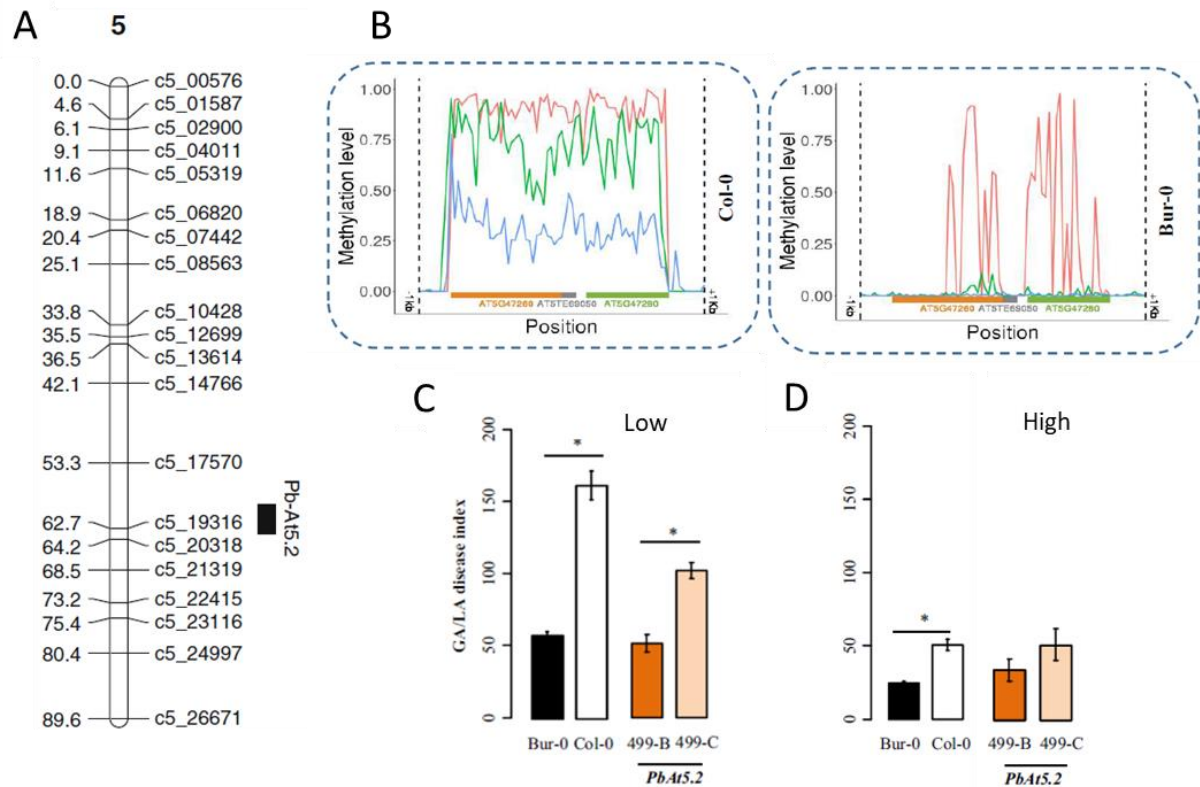


Figure I.53. : Identification de l'épimutation naturelle associée au QTL *Pb-At 5.2*. A) Le QTL *Pb-At 5.2* identifié par Jubault et al. (2008) *via* l'utilisation de la population RIL Col-0 x Bur-0 est localisé à la fin du chromosome 5 d'*A. thaliana*. La longueur de la barre noire représente l'intervalle de confiance du QTL. (B) Profils de méthylation au niveau des gènes *AT5G47260* et *AT5G47280*, dans les accessions Col-0 (gauche) et Bur-0 (droite), déduits des données de séquençage après traitement au bisulfite précédemment rapportées dans Kawakatsu et al. (2016). Le niveau moyen de méthylation a été calculé dans des fenêtres de 100 pb non chevauchantes commençant 1 kb avant le site d'initiation de la transcription (TSS) d'*AT5G47260* et s'arrêtant 1 kb après le site de terminaison de la transcription (TSE) d'*At5g47280*. En rouge : méthylation dans le contexte CG. En vert : méthylation dans le contexte CHG. En bleu : méthylation dans le contexte CHH. (C et D) Impact des conditions hydriques sur l'effet du QTL *Pb-At 5.2* : lors d'une faible irrigation (C) et d'une forte irrigation (D). Les contraintes hydriques ont été appliquées 7 jours après l'inoculation des plantes par l'isolat *eH* de *P. brassicae* et pendant une durée de 14 jours, c'est-à-dire jusqu'au phénotypage des plantes. Les conditions de faible irrigation (C) correspondent à une réduction de l'apport en eau avec seulement 1L de solution nutritive apportée deux fois par semaine pour des plateaux de 54 pots. Les conditions de forte irrigation (D) correspondent à un apport de 4 L de solution nutritive deux fois par semaine pour des plateaux de 54 pots (seul le système racinaire des plantes était en condition d'hypoxie). Pour information, les conditions standards d'irrigation correspondent, dans cette étude à un arrosage avec 2L de solution nutritive deux fois par semaine pour des plateaux de 54 pots. Figure adaptée de (Jubault *et al.*, 2008b; Gravot *et al.*, 2016a; Liégard *et al.*, 2019a).

Facteurs épigénétiques de résistance à la hernie identifiés chez *Arabidopsis*

Dans le laboratoire d'accueil, des épimutations hérissables naturelles ou induites ont été mises en évidence dans le contrôle de la résistance d'*A. thaliana* à la hernie. Le QTL de résistance *Pb-At5.2* (Jubault *et al.*, 2008b) (**Fig. I. 53. A.**) est contrôlé par une épimutation. Le faible niveau de méthylation de l'allèle de Bur-0 est associé à une expression des 2 gènes causaux du QTL *AT5G47260* et *AT5G47280* et l'allèle apporté par Col-0 est hyperméthylé et associé à une répression de ces 2 gènes causaux (**Fig. I.53. B.**). L'hypométhylation du QTL *Pb-At5.2* participe à la résistance partielle du génotype Bur-0 à la hernie (Liégard *et al.*, 2019b). Par ailleurs, les travaux de Grivot *et al.* (2016) suggèrent un effet de l'humidité du sol sur l'effet de ce QTL contrôlé par une épimutation (**Fig. I.53. C et D.**).

L'utilisation de la population epiRIL, précédemment décrite (**Chap. I. 2.3.5.2.**) (Johannes *et al.*, 2009), a également permis d'identifier des QTL épigénétiques (QTL^{epi}) contrôlant la réponse à la hernie (Liégard *et al.*, 2019a) (**Fig. I.54.**). 20 QTL^{epi} contrôlant 5 traits ont été identifiés sur les 5 chromosomes d'*Arabidopsis* : 5 QTL^{epi} impliqués dans le développement des racines et 7 QTL^{epi} dans le développement des feuilles chez des plantes non inoculées, 3 QTL^{epi} détectés pour la variable deltaLf, qui représente l'impact du stress biotique sur la croissance des feuilles et 5 QTL^{epi} détectés pour le pourcentage d'ADN de *P. brassicae* dans les racines infectées. La détection de cinq de ces QTL^{epi} a été montrée comme dépendante des conditions expérimentales et plus particulièrement des variations de température observées dans la chambre de culture. Ces deux études ont montré pour la première fois l'implication des facteurs épigénétiques dans la réponse de résistance d'*A. thaliana* à *P. brassicae* et suggère que la détection de certains facteurs peut être dépendante des conditions expérimentales.

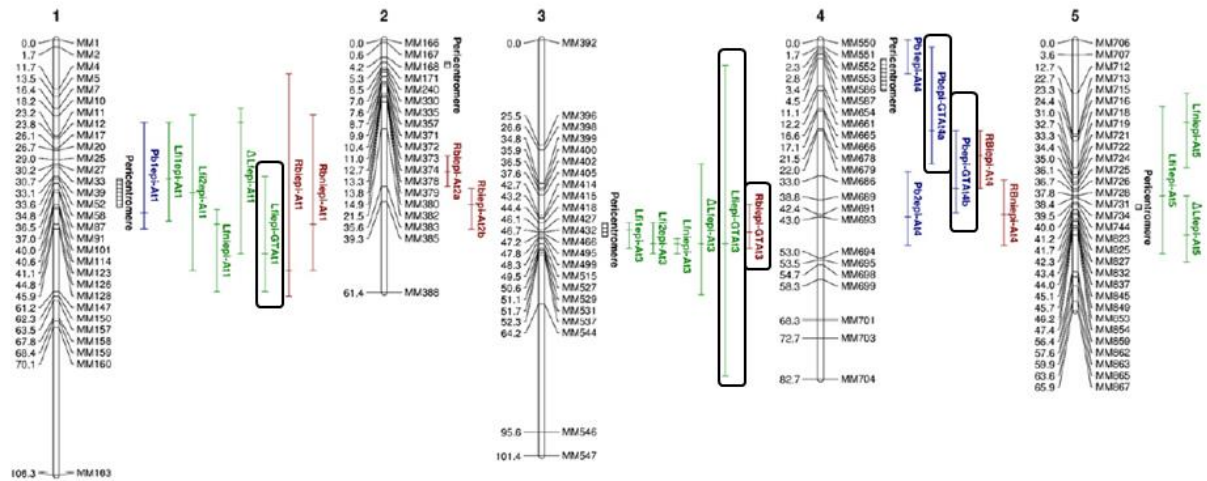


Figure I.54. : QTL épigénétiques (QTL^{epi}) contrôlant la réponse d'*A. thaliana* à l'isolat eH de *P. brassicae* identifiés par Liégard et al. (2019). QTL^{epi} identifiés dans la population epiRIL en réponse à l'infection par *P. brassicae*. Les nombres au-dessus des chromosomes indiquent les chromosomes d'*Arabidopsis*. MM indique les marqueurs épigénétiques. Pour chaque marqueur, la position est indiquée en cM. La longueur de la barre verticale est égale à l'intervalle de confiance défini avec une décroissance d'un LOD au sommet du QTL^{epi}. Le tiret dans la barre indique la position du pic de chaque QTL^{epi}. Dans le nom de chaque QTL^{epi} est indiqué le trait associé et la localisation chromosomique. Les QTL^{epi} encadrés correspondent aux QTL^{epi} dont la détection dépend des conditions expérimentales et notamment de la température. En vert, sont représentés les QTL^{epi} détectés pour Lfi, Lfni et ΔLf, en bleu les QTL^{epi} détectés pour Pb et en **bordeaux** les QTL^{epi} détectés pour Rbi.

4. Objectifs de la thèse et stratégies

Au cours de cette thèse, nous nous sommes tout particulièrement intéressés à la méthylation de l'ADN et au rôle des miARN. La méthylation de l'ADN, c'est-à-dire l'apposition d'un groupe méthyl sur les cytosines, est l'un des principaux mécanismes épigénétiques impliqués dans la stabilité du génome et dans la modulation de l'expression des gènes (revue dans (Zhang *et al.*, 2018b)). Il a été démontré que la méthylation de l'ADN est stable et transmissible sur plusieurs générations (Johannes *et al.*, 2009). Chez l'espèce modèle *A. thaliana*, des épimutations trans-générationnelles, et en particulier des variations de méthylation de l'ADN, sont impliquées dans le contrôle de traits complexes tels que les processus de développement (Johannes *et al.*, 2009; Cortijo *et al.*, 2014a), le métabolisme (Aller *et al.*, 2018) et la réponse aux stress abiotiques (Kooke *et al.*, 2015) et biotiques (Furci *et al.*, 2019; Liégard *et al.*, 2019a). Les miARN ont également un rôle dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes via le clivage de leurs cibles (Guo *et al.*, 2005). L'implication des miARN dans la réponse des plantes aux différents stress a déjà été démontrée dans de nombreuses interactions plante-microorganismes pathogènes (Yang *et al.*, 2021a). L'étude approfondie de ces deux mécanismes dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques pourrait permettre une meilleure compréhension des mécanismes de défense et l'identification de potentielles régions d'intérêt impliquées dans la réponse de résistance et/ou tolérance aux contraintes abiotiques.

L'agent causal de la hernie des crucifères, *P. brassicae*, est un protiste parasite obligatoire des plantes, capable d'infecter une grande majorité des membres de la famille des *Brassicaceae*, notamment des cultures d'intérêt agronomique telles que le colza, le chou ou la navette, ainsi que la plante modèle *A. thaliana*. L'architecture génétique de la réponse de la plante à la hernie des crucifères a été décrite chez plusieurs espèces de Brassicacées, ainsi que la modulation de l'effet de certains facteurs génétiques de résistance par des contraintes abiotiques telles que l'apport en azote, la disponibilité en eau ou le pH du sol. Des épimutations naturelles et induites (QTL^{epi}) ont été identifiées dans la réponse d'*Arabidopsis* à *P. brassicae*, la détection de certaines d'entre elles étant dépendante des conditions expérimentales.

Dans ce contexte, les objectifs de la thèse et les questions de recherche associées étaient :

- D'évaluer l'impact de contraintes abiotiques modérées sur l'architecture épigénétique de la réponse à la hernie chez *Arabidopsis*, notamment une hausse de température (5°C nuit et jour), une sécheresse modérée (<20% de teneur en eau du sol) et un engorgement (>50% de teneur en eau du sol).
 - Quel est l'impact des conditions abiotiques sur l'architecture épigénétique de la réponse d'*A. thaliana* à la hernie ?
 - Existe-t-il des facteurs épigénétiques dont la détection et/ou l'effet sont spécifiques des conditions évaluées ?
- D'identifier et caractériser les miARN impliqués dans l'interaction *A. thaliana* / *P. brassicae*.
 - Quels miARN sont impliqués dans la réponse de sensibilité et de résistance partielle d'*A. thaliana* à la hernie ? Existe-t-il des miRNA communs entre la réponse d'*A. thaliana* et celle d'autres *Brassicaceae* à la hernie ?
 - Quelles sont les cibles potentielles des miARN différentiellement exprimés avec l'infection ? Sont-elles différentiellement régulées et de façon cohérente lors de l'infection ?
 - Quels sont les processus physiologiques ou les voies de défense dans lesquels sont impliqués les couples miARN /gènes ?

Le manuscrit de thèse est structuré en 5 chapitres. Dans le chapitre I, j'ai réalisé une synthèse bibliographique concernant i) la réponse des plantes aux stress abiotiques et biotiques, appliqués seuls ou combinés, ii) l'implication des mécanismes épigénétiques dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques et iii) la description du modèle d'interaction plante pathogène utilisé : *Brassicaceae/P. brassicae*. Dans le chapitre II sont décrits les matériels et méthodes utilisés. Le chapitre III est dédié à l'analyse d'épigénétique quantitative et de la méthylation de l'ADN ; les résultats sont présentés sous forme d'article soumis à *Frontiers in Plants Science* et intitulé « *Environmental conditions modulate the effect of epigenetic factors controlling the response of Arabidopsis thaliana to Plasmodiophora brassicae* » ainsi que des résultats complémentaires. Le chapitre IV est focalisé sur l'implication des miARN dans la réponse d'*A. thaliana* à la hernie et présenté sous la forme d'un article en cours de préparation. Le chapitre V présente la discussion générale sur le travail que j'ai effectué lors de ces trois années de thèse ainsi que des perspectives.

Chapitre II :

Matériels et Méthodes

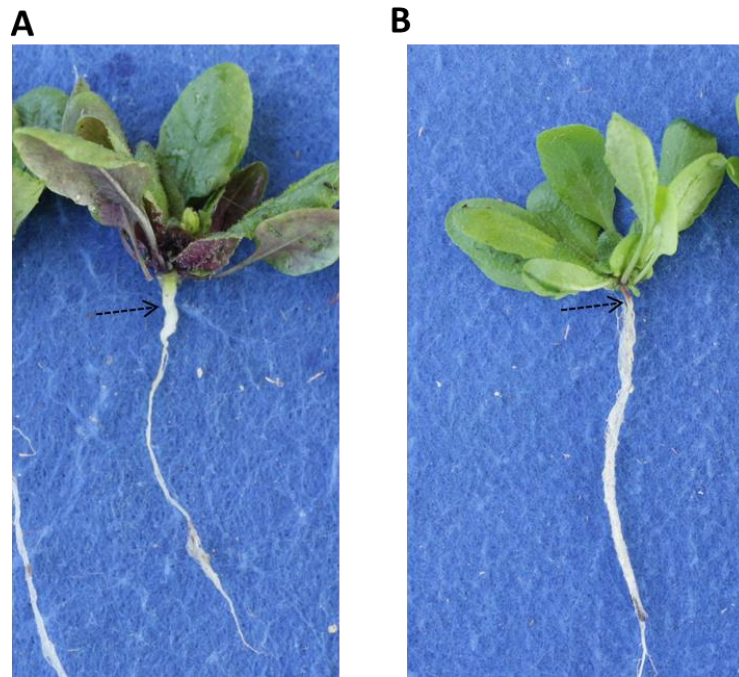


Figure II.1: Réponse des écotypes (A) Col-0 et (B) Bur-0 à l'isolat eH de *P. brassicae*. L'écotype Col-0 est sensible à l'isolat eH de *P. brassicae* et l'écotype Bur-0 est partiellement résistant à ce même isolat. Les symptômes sont indiqués par une flèche noire.

CHAPITRE II : Matériels et Méthodes

1. Matériels végétal et parasitaire

1.1. *Arabidopsis thaliana*

1.1.1. Ecotypes

Trois écotypes d'*A. thaliana* ont été utilisés au cours de cette thèse : Colombia (Col-0), Burren (Bur-0) et Landsberg-Warthe (Ler-0). L'accession 186AV de Col-0, l'accession 172AV de Bur-0 et l'accession NW20 de Ler-0 ont été obtenues auprès du Centre de Ressources Biologiques d'*Arabidopsis* de Nottingham (NASC ; <https://arabidopsis.info/>). Les accessions Col-0 et Ler-0 sont sensibles à l'isolat eH de *P. brassicae* alors que l'accession Bur-0 est partiellement résistante (**Fig. II.1.**; Alix et al., 2007).

1.1.2. La population epiRIL

La population epiRIL est issue du croisement entre le mutant Col-*ddm1-2* (décrit dans le Chapitre **I.2.**) et l'écotype Col-0 (Johannes *et al.*, 2009). Les hybrides F1 ont tout d'abord été rétrocroisés avec l'écotype Col-0 pour obtenir la génération backcross 1 (BC1). Afin de s'affranchir des effets délétères de la mutation *ddm1-2*, seuls les individus issus de ce backcross et portant l'allèle sauvage *DDMI* à l'état homozygote ont été conservés et autofécondés sur plus de dix générations. Les lignées de la population epiRIL présentent ainsi un fond génétique quasiment similaire mais une mosaïque des marques épigénétiques des deux parents (Johannes *et al.*, 2009). Parmi les 505 lignées disponibles, nous avons utilisé 123 lignées pour lesquelles nous disposons de données d'épigénotypage (Colome-Tatche *et al.*, 2012) et des données de séquençage du génome entier (Gilly et al., 2014). Des substitutions de bases uniques (SNP), des insertions et des délétions (indel) ont été identifiées chez 122 epiRIL via l'outil GATK Haplotype-Caller. En effet, l'individu Col-0 utilisé lors du rétrocroisement aboutissant à la BC1 diffère pour 74 SNP ou insertions/délétions du parent sauvage initial. L'analyse des événements de transposition a été réalisée avec TE-Tracker (Gilly et al., 2014) sur 102 epiRIL ayant une couverture génomique suffisante. Les 123 lignées ont été obtenues auprès du Centre de Ressources Biologiques de Versailles (VASC, <https://publiclines.versailles.inrae.fr/>).

Tableau II.1: Liste des mutants Knock-out (KO) de microARN et des lignées rapportrices chez *Arabidopsis thaliana* utilisés durant cette thèse.

miARN muté(s)	Nom du mutant	Type de mutant	Code NASC	Fonds génétique	Rôles physiologiques	Evaluation de la réponse à l'infection par <i>P. brassicae</i>	Bibliographie
miR319a	<i>mir319a</i>	KO	NA	Col-0/Ler-0	Synthèse d'acide jasmonique (JA), prolifération cellulaire, infection du nématode à galles	OUI	Données par Koyama et al, 2017 // Nag et al., 2009
miR319b	<i>mir319b</i>	KO	N448500	Col-0		OUI	Rosso et al, 2003
miR319a/b	<i>mir319ab</i>	KO	NA	Col-0/Ler-0		OUI	Données par Koyama et al, 2017
miR396b	<i>mir396b; GK-127F01</i>	KO	N412157	Col-0	Régulateur négatif de la division mitotique, implication dans la réponse au nématode à galles	NON	Rosso et al, 2003
miR164a	<i>mir164a-4</i>	KO	N65836	Col-0	Prolifération cellulaire, homéostasie de l'auxine, réponse au nématode à galles	OUI	Nikovics et al., 2006
miR164b	<i>mir164b-1</i>	KO	N636105	Col-0		OUI	Mallory et al., 2004
miR164c	<i>eep1 / mir164c-1</i>	KO	N65826	Ler-0		NON	Baker et al., 2005
miR164a/b/c	<i>mir164abc</i>	KO	N65828	Ler-0/Col-0		NON	Sieber et al., 2007
miR390a	<i>WisCDsLox440F06</i>	KO	N855944	Col-2	Croissance racine latérale via l'homéostasie de l'auxine	NON	Marin et al., 2010
miR164a/b	<i>mir164a-4 mir164b-1</i>	KO	NA	Col-0	Prolifération cellulaire, homéostasie de l'auxine, réponse au nématode à galles / développement du carpelle	NON	Données par P. Laufs, IJPB, Inrae Versailles
miR164c	<i>mir164c-4.3</i>	KO	NA	Col-0		NON	Données par P. Laufs, IJPB, Inrae Versailles
miR164c	<i>mir164c-7.5</i>	KO	NA	Col-0		NON	Données par P. Laufs, IJPB, Inrae Versailles
miR164a/miR164c	<i>mir164c-4.3 mir164a-4</i>	KO	NA	Col-0		NON	Données par P. Laufs, IJPB, Inrae Versailles
Lignée Rapportrice de l'activité des promoteurs contrôlant l'expression de miARN							
BD080	<i>pmiR164a-ARFP pDR5-Venus</i>	lignée rapportrice	NA	Col-0		NON	Données par P. Laufs, IJPB, Inrae Versailles
BD010	<i>pmiR164a-CFP</i>	lignée rapportrice	NA	Col-0		NON	Données par P. Laufs, IJPB, Inrae Versailles
NA	<i>p164b-GUS</i>	lignée rapportrice	NA	Col-0		NON	Données par P. Laufs, IJPB, Inrae Versailles

Tableau II.2: Liste des amorces utilisées pour le génotypage des mutants miARN commandés auprès du NASC.

miRNA	Amorces	Séquences	Température d'hybridation (°C)	Taille du fragment (BP)
Amorces nécessaires pour évaluer la présence de l'allèle sauvage				
miR396b	LP_127F01	TTGGTTGAGTCTTTTCATCGC	57.89	1143
	RP_127F01	ATGGCCTCAAGTAATCCAACC	58.29	
miR164a-4	LP_miR164a-4	TTTCTATGTTTATCATTTTGCC	58.11	1134
	RP_miR164a-4	GAAATTTAGGGCAGACAAGCC	58.52	
miR164b-1	LP_miR164b-1	GTGGTAACCAAGCAAGAGCAAG	57.64	1145
	RP_miR164b-1	AACATCTGCAAGATTTGCATTC	57.29	
Amorces nécessaires pour évaluer la présence de l'allèle muté				
miR396b	RP_127F01	ATGGCCTCAAGTAATCCAACC	58.29	449-749
	T_DNA_GABI_8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	54	
miR164a-4	RP_miR164a-4	GAAATTTAGGGCAGACAAGCC	58.62	542-842
	T_DNA_GABI_8409	ATATTGACCATCATACTCATTGC	54.02	
miR164b-1	RP_miR164b-1	AACATCTGCAAGATTTGCATTC	57.66	527-827
	T_DNA_SALK	ATTTTCCGATTTCCGAAC	57.66	
Amorces nécessaires pour évaluer la présence des allèles sauvage et muté de miR164c				
miR164abc-1	P1_miR164c-1	GTGGAGTAACAATCAATGTTAAC	51.51	WT ~ 900
	P3_miR164c-1	GTCATGTTCAAAGGTCATTTTG	56.86	
	P2_miR164c-1 (PS308)	GGTCTAACCCGGTTGACCCA	61.81	T-DNA ~ 500

1.1.3. Les mutants d'*A. thaliana*

Les lignées mutantes par Knock-out d'*A. thaliana* impactées dans l'expression d'un ou plusieurs microARN, *mir164a* (N65836), *mir164b* (N636105), *mir164abc* (N65828), *miR396b* (N412157) et *miR390a* (NA855944) ont été commandées auprès du NASC. Le Dr Koyama Tomotsugu du Suntory Foundation For Life Sciences (SUNBOR) au Japon nous a gracieusement envoyé des graines pour les mutants *mir319a*, *mir319b* et *mir319ab*. Les mutants *mir164c* 4.3, *mir164c* 7.5 and *mir164a-4 miR164b-1* ainsi que trois lignées rapportrices, pMIR164B:GUS (Raman *et al.*, 2008), BD010 (pMIR164A:CFP) et BD008 (pMIR164A:RFP pDR5:Venus), ont été données gracieusement par le Dr Patrick Laufs (Institut Jean-Pierre Bourgin, INRAe, France). La lignée BD008 est issue du croisement de deux lignées, pMIR164A:RFP et pDR5:Venus (Maugarny-Calès *et al.*, 2019) pour lesquelles des individus homozygotes pour les deux transgènes ont été identifiés en F3 (Cortizo et Laufs, données non publiées). La lignée BD010, exprimant le transgène pMIR164A:CFP est similaire à la lignée portant le transgène pMIR164A:RFP, seule la protéine fluorescente rouge (RFP) a été remplacée par une protéine fluorescente cyan (CFP ; Cortizo et Laufs, données non publiées). Tous les mutants utilisés sont répertoriés dans le **Tableau II.1**.

L'homozygotie pour la cassette T-DNA des mutants KO obtenus auprès du NASC, *miR164a-1*, *miR164b-1* et *miR164abc*, a été validée *via* l'utilisation d'amorces spécifiques de la cassette T-DNA et du gène ciblé (**Tableau II. 2.**) et la réalisation d'une PCR avec le programme suivant : dénaturation de l'ADN pendant 2 min à 94°C, 35 cycles d'amplification avec une étape de dénaturation à 94°C pendant 30s, une étape d'hybridation dont la température dépend des amorces pendant 30s et une phase d'élongation à 72°C pendant 30s, puis une étape supplémentaire d'élongation à 72°C pendant 5 min. La présence des transgènes dans les mutants *miR396a* et *miR390a* n'a pas été être validée.

1.2. Gamme d'hôtes différentiels

Le génotype de *B. rapa* ssp. *pekinsis* cv 'Granaat' (chou chinois, ECD5), présentant une forte sensibilité à l'ensemble des isolats de *P. brassicae*, est systématiquement ajouté à chaque test pathologique, son fort niveau d'infection permettant de valider l'inoculum et les conditions de culture propices au développement de la maladie.

Tableau II.3. : Gamme d'hôtes différentiels ajoutée aux tests pathologiques pour confirmer l'isolat utilisé. (A) 3 génotypes de *B. napus* composent la gamme de Some et al. (1996) qui permet la différenciation de 8 pathotypes différents (B) De plus, les génotypes de *B. oleracea* C10 et CB151 permettent de caractériser différents isolats appartenant au pathotype P1, dont eH. (-) Les plantes sont considérées comme résistantes lorsque leur indice pathologique est inférieur à 25. (+) Les plantes sont considérées comme sensibles lorsque leur indice pathologique est supérieur à 25.

A

Pathotypes	ECD6	ECD10	Brutor
P1	+	+	+
P2	+	-	+
P3	-	-	+
P4	-	-	-
P5	-	+	+
P6	+	-	-
P7	-	+	-
P8	+	+	-

B

Isolat	C10	CB151
eH	-	-



Figure II.2. : Dispositif expérimental des tests pathologiques réalisés dans une chambre de culture du pôle NS2 sur le site INRAe Bretagne Centre-Normandie, IGEPP. Pour l'ensemble des tests pathologiques réalisés avec la population epiRIL, un dispositif expérimental en blocs complets de Fisher a été utilisé. Pour chaque condition, 2 répétitions biologiques (Rep 1 et Rep 2) constituées de 2 blocs chacune (Bloc A et B ; Bloc C et D) ont été réalisées. Au sein d'une répétition, les deux blocs sont disposés sur deux étages au sein d'une chambre de culture. (Source personnelle).

De plus, la gamme d'hôtes différentiels décrite par Somé et al. (1996) a été utilisée dans chaque expérimentation afin de valider le pathotype de l'isolat de *P. brassicae* utilisé (**Tableau II.3.A**). Elle est composée de 3 génotypes de *Brassica napus* : *B. napus* spp. *oleifera* cv 'Nevin' (ECD6), ssp. *rapifera* cv 'Wilhelmsburger' (ECD10) et ssp. *oleifera* (Brutor). L'ajout de 2 génotypes de *B. oleracea* ssp. *acephala* (C10 et CB151) à la gamme d'hôtes permet de différencier les isolats à l'intérieur du pathotype P1, dont *eH* (**Tableau II.3.B**). Le cultivar de colza « Mendel », résistant aux isolats de pathotype P1 de *P. brassicae*, a d'autre part été ajouté à chaque test afin de déterminer que l'isolat *eH* utilisé n'a pas évolué et n'est pas capable de contourner la résistance portée par Mendel (l'isolat qui contourne Mendel est dit de type P1*). Tous ces génotypes proviennent du Centre de Ressources Biologiques BraCySol (INRAe, IGEPP, <https://www6.rennes.inrae.fr/igepp/L-IGEPP/Plateformes/BrACySol>).

1.3. Matériel parasitaire

Au cours de cette thèse, seul l'isolat monospore *eH* (Fahling *et al.*, 2003) appartenant au pathotype P1 a été utilisé (**Tableaux II.3**). L'isolat est conservé au congélateur à -20°C sous forme de galles de chou chinois (ECD5) développées suite à l'infection par *P. brassicae*. Pour préparer l'inoculum, les galles décongelées sont broyées dans 100 mL d'eau et le broyat est ensuite filtré sur 3 tapis de maillage décroissant de 500, 250 et 100 µm. Le nombre de spores de repos est compté sur une cellule de Malassez puis l'inoculum est préparé à une concentration finale de 10⁷ spores par mL. Le même lot de galles a été utilisé pour tous les tests pathologiques réalisés au cours de la thèse.

2. Conditions de culture et déroulé des tests pathologiques réalisés sur la population *epiRIL*

2.1. Déroulé général des tests pathologiques

Pour tous les tests réalisés pour la population *epiRIL*, les graines de chaque lignée sont placées sur du papier humidifié à 4°C et dans l'obscurité pendant 48h afin de synchroniser leur germination. Les graines sont ensuite semées dans des pots individuels (7*7*8cm) sur un terreau composé de 54% de tourbe, de 40 % de sable et de 6% d'argile. Dix jours après semis (environ une semaine après germination, stade 1.04 de Boyes et al., 2001), les plantes sont inoculées en déposant 1 mL de la solution à 10⁷ spores/ml au niveau du collet des plantules.

Sept jours après l'inoculation, la population epiRIL a été soumise à différentes conditions de culture, en fonction des tests pathologiques, dont trois contraintes abiotiques appliquées seules ou combinées pour une durée d'une semaine. Ces contraintes sont détaillées dans les paragraphes suivants. Trois semaines après inoculation, les plantes sont déterrées, les racines lavées et un phénotypage sur différents critères est réalisé (**cf. Chap II. Section 2.3**).

Pour l'ensemble des tests pathologiques réalisés avec la population epiRIL, un dispositif expérimental en blocs complets de Fisher a été utilisé. Pour chaque condition, 2 répétitions biologiques (Rep 1 et Rep 2) constituées de 2 blocs chacune (Bloc A et B ; Bloc C et D) ont été réalisées dans deux chambres de culture. Au sein d'une répétition, les deux blocs sont disposés sur deux étages différents dans la même chambre de culture (**Fig. II.2.**). Les lignées (six graines par epiRIL et par parent) ont été semées de manière randomisée au sein de chaque bloc. Une sonde mesurant la température générale de la chambre de culture et la luminosité (MCF88 LoRaWANsensor LW12VOC) a été disposée dans chaque chambre de culture. Huit sondes Thermochron iButton (DS1922E/DS1921G) ont été installées par chambre de culture permettant une cartographie thermique sur plusieurs niveaux. Le pourcentage d'eau dans le sol en temps réel a été mesuré à l'aide de 6 six capteurs SenseCAP (LoRaWAN EU868Mhz) qui mesurent le volume d'eau par volume de sol (Volumetric Water Content, VWC, %).

2.2. Conditions de culture et contraintes abiotiques appliquées

Tous les tests pour la population epiRIL ont été réalisés en conditions contrôlées dans 2 chambres de culture où les conditions de température sont réglables mais où l'hygrométrie n'est pas régulée. Quatre conditions abiotiques ont été appliquées à partir du septième jour après l'inoculation et pendant sept jours, ce qui correspond au début de l'infection des cellules du cortex par *P. brassicae*. Ces conditions sont détaillées ci-après.

Condition de culture standard utilisée au laboratoire

La condition de culture standard (appelée par la suite STANDARD) est celle utilisée en routine au sein du laboratoire pour les tests pathologiques. La température diurne, appliquée pendant 16h, est de 22°C et celle nocturne, appliquée durant 8h, est de 19°C. Le pourcentage d'eau dans le sol (Volumetric Water Content, WVC) varie entre 20 et 40%.

Condition d'élévation ponctuelle de la température

Dans la condition HEAT, les plantes ont subi une augmentation de la température de 5°C appliquée pendant 7 jours à partir de 7 jours après l'inoculation : pendant ces 7 jours, la température diurne (16h) est de 27°C ; la température est de 22°C durant les 8h de nuit. Le pourcentage d'eau dans le sol (Volumetric Water Content, WVC) varie entre 20 et 40%.

Condition de sécheresse modérée

En condition de sécheresse modérée (DROUGHT), l'arrosage a été stoppé 4 jours après inoculation pour permettre une diminution progressive du pourcentage d'eau dans le sol jusqu'à une VWC d'environ 25/30% pour le début de la contrainte à 7 jours après inoculation, et jusqu'à 10% ou moins à la fin des sept jours (14 jours après inoculation). Les conditions de température et de photopériode sont similaires à celles de la condition standard.

Condition d'engorgement

En condition de saturation en eau (FLOOD), 6L d'eau claire ont été ajoutés dans chaque bac 7 jours après inoculation. Le niveau de l'eau dans le bac a ensuite été maintenu à la lisière des pots pendant sept jours conduisant à un engorgement avec un pourcentage d'eau dans le sol atteignant les 60% rapidement. Les conditions de température et la photopériode sont similaires à celles appliquées en condition standard de culture.

Combinaison de conditions d'augmentation de température et de disponibilité en eau du sol

Des conditions abiotiques combinées ont également été appliquées pendant certains tests pathologiques. Sept jours après l'inoculation, l'augmentation de la température et une sécheresse modérée ou un engorgement (décrits ci-dessus) ont été simultanément appliquées pendant 7 jours.



Figure II.3. : Illustration chez *A. thaliana* des symptômes racinaires pour chacune des classes de maladie définies pour la hernie des crucifères et permettant le calcul de l'indice pathologique. Classe 0 : les racines ne présentent aucun symptôme ; Classe 1 : des galles sont visibles au niveau du système racinaire secondaire ; Classe 2 : des galles sont présentes sur les systèmes racinaires primaire et secondaire ; Classe 2⁺ : le système racinaire présente d'importantes galles à l'exception de quelques racines et Classe 3 : tout le système racinaire est remplacé par une galle (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000a).

2.3. Caractérisation phénotypique de l'impact de l'infection par *P. brassicae* sur la plante hôte

La réponse de la population epiRIL à l'infection par *P. brassicae* a été caractérisée en utilisant quatre variables phénotypiques :

- L'indice pathologique (IP ou DI pour Disease Index) tel que défini par Manzanares-Dauleux *et al.* (2000)
- La surface des galles (GA)
- La longueur de la plus grande feuille de la rosette (Lfi)
- L'indice GALA tel que défini par Gravot *et al.* (2011)

L'indice pathologique

Trois semaines après inoculation, les plantes ont été dépotées et les racines ont été lavées à l'eau claire une par une. En fonction des symptômes observés (quantité et localisation), les plantes sont affectées à l'une des 5 classes décrites par Manzanares-Dauleux *et al.* (2000) (**Fig. II.3.**) :

- 0 : les racines sont saines (absence totale de symptômes)
- 1 : des galles sont visibles sur le système racinaire secondaire
- 2 : des galles sont présentes sur les systèmes racinaires primaire et secondaire
- 2⁺ : le système racinaire présente d'importantes galles à l'exception de quelques racines
- 3 : tout le système racinaire est remplacé par une galle

Un indice pathologique a ensuite été calculé en affectant un coefficient au nombre de plantes de chaque classe et en divisant par le nombre total de plantes :

$$DI = (n_1 \times 25 + n_2 \times 50 + n_{2+} \times 75 + n_3 \times 100) / N$$

Avec « n_i » le nombre de plantes dans la classe « i » et « N » le nombre total de plantes évaluées. Une lignée présentant un indice pathologique de 0 sera totalement résistante tandis qu'une lignée présentant un indice pathologique de 100 sera totalement sensible à l'infection. Les plantes sont considérées comme résistantes lorsque leur indice pathologique est inférieur à 25.

La surface des galles

Toutes les plantes, une fois lavées et étalées, ont été prises en photo. A l'aide du logiciel ImageJ, la surface de la galle de chaque plante a été détournée obtenant ainsi la surface moyenne de la galle (GA) de chaque lignée en cm^2 .

La longueur de la plus grande feuille de la rosette

Afin de mesurer l'impact de l'agent pathogène sur le développement aérien de la plante, la longueur de la plus grande feuille de la rosette de chaque plante a été mesurée en utilisant un pied à coulisse, 4 semaines après semis. Les valeurs de la variable Lfi sont données en cm.

L'indice GALA

L'indice GALA a été calculé comme décrit par Gravot et al. (2011) en utilisant la valeur de la variable GA en cm^2 divisée par la valeur de la variable Lfi élevée au carré ($LA = Lfi^2$). L'indice GALA a ensuite été calculé en multipliant le ratio GA/LA par un coefficient arbitraire égal à 5000. Cet indice prend en compte le développement foliaire de la plante dans l'évaluation des symptômes et permet donc de comparer les symptômes entre des plantes présentant des développements foliaires différents.

2.4. Caractérisation phénotypique de l'impact des contraintes abiotiques sur les plantes non infectées par la hernie

Afin de différencier l'impact des contraintes abiotiques de celui de l'infection par *P. brassicae* sur le développement de la plante, nous avons phénotypé la population epiRIL non infectée par la hernie dans les différentes conditions abiotiques décrites plus haut. Le dispositif expérimental en blocs complets est similaire à celui décrit en paragraphe 2.2 : par condition, 2 répétitions biologiques, avec 2 blocs par répétition, ont été réalisées. Trois plantes par lignée et par bloc ont été évaluées. La longueur de la feuille la plus longue de la rosette a été mesurée avec un pied à coulisse (variable Lfni) 4 semaines après semis. Une nouvelle variable appelée dLf a été calculée par la différence entre les valeurs de mesure de la plus longue feuille des plantes non inoculées et celle des plantes inoculées : $dLf = Lfni - Lfi$. La valeur de dLf, en cm, permet d'estimer l'effet de l'infection sur la longueur de la feuille.

3. Identification de QTL épigénétiques

3.1. Analyses statistiques des données de phénotypage

Un modèle linéaire (lm) a été utilisé pour déterminer l'effet des facteurs analysés sur les valeurs phénotypiques observées (Y_{ijk}) selon l'équation suivante :

$$\textbf{Equation 1 } Y_{ijk} = \mu + EG_i + R_j + B_k(R_j) + e_{ijk}$$

Avec μ l'effet moyen général, EG_i l'effet épigénétique de la ligne i , R_j l'effet de la répétition j , $B_k(R_j)$ l'effet du bloc k imbriqué dans l'effet de la répétition j , et e_{ijk} le résidu ajusté sur une distribution gaussienne.

Une ANOVA a ensuite été réalisée avec la fonction *aov* de R 4.2.1 (R Core Team, 2022) pour chaque trait phénotypique et l'héritabilité au sens large (H^2) a été calculée comme suit :

$$\textbf{Equation 2 } H^2 = \frac{Ge}{Ge+Gr}$$

Avec Ge la variance estimée due à l'épigénotype et Gr la variance estimée due au design expérimental.

Pour chaque trait phénotypique, les données ont été corrigées *via* la méthode des moyennes ajustées selon le modèle lm présenté en équation 1. La variable dLf a été calculée avec les valeurs des moyennes ajustées de Lfi et Lfni.

3.2. Carte épigénétique de la population epiRIL

Les lignées de la population epiRIL issue du croisement entre Col-*ddm1-2* et Col-0 présentent un fond génétique quasiment identique mais des différences au niveau du méthylome. Un total de 2611 régions différentiellement méthylées (DMR) ont été identifiées sur un sous-ensemble de 123 lignées par Colome-Tatche *et al.* (2012) mais seulement 33.2% de ces DMR (867) présentaient un ratio mendélien de 3 :1 attendu dans la population.

Seuls 126 DMR ou épimarqueurs ont été conservés pour la construction de la carte épigénétique (Colome-Tatche *et al.*, 2012). Les épimarqueurs (MM) sont répartis comme suit : 30 MM sont localisés sur le chromosome 1 couvrant une distance de 106.31 cM ; 19 MM sont localisés sur le chromosome 2 couvrant une distance de 61.38 cM ; 23 MM sont localisés sur le chromosome 3 couvrant une distance de 101.44 cM ; 23 MM sont localisés sur le chromosome 4 couvrant une distance de 82.67 cM et 31 MM sont localisés sur le chromosome 5 couvrant une distance de 65.93 cM. Cette carte génétique permet de couvrir 74.7% du chromosome 1, 77% du chromosome 2, 98.4% du chromosome 3, 91.1% du chromosome 4 et 74% du chromosome 5. En moyenne, ces épimarqueurs sont séparés d'environ 3.45cM (0.804 Mb) et sont majoritairement localisés au niveau de séquences répétées et des régions hétérochromatiniennes (Colome-Tatche *et al.*, 2012).

3.3. Détection de QTL épigénétiques (QTL^{epi})

Les QTL^{epi} ont été détectés à l'aide du package *r/qtl* (Broman *et al.*, 2003) de la version R 4.2.1 (R Core Team, 2022). Une analyse par Single Interval Mapping (SIM) a d'abord été réalisée pour identifier les QTL^{epi} potentiels avec la méthode d'imputation multiple (*imp*) en utilisant un pas de 2 cM et une fenêtre de 10 cM. Le seuil SIM a été évalué en effectuant 5000 tests de permutation et la significativité a été fixée à $\alpha=0,05$. Pour améliorer la puissance statistique de la détection des QTL^{epi}, une analyse par Multiple QTL Mapping (MQM) a été réalisée en utilisant la fonction *stepwise*. Les seuils du logarithme des impairs (LOD) ont été calculés avec 5000 permutations en utilisant la fonction *scantwo* avec un niveau de signification de $\alpha=0,05$. Lorsque des QTL^{epi} ont été détectés, le modèle a été ajusté avec la fonction *fitqtl* pour calculer l'effet (R^2) de chaque QTL^{epi}. La fonction *lodint* a été utilisée pour calculer l'intervalle de confiance de chaque QTL^{epi} et la fonction *effectplot* pour l'obtention d'un graphe avec l'effet de l'épiallèle étudié. Enfin, la fonction *addint* a été utilisée pour évaluer l'interaction putative entre les QTL^{epi} détectés.

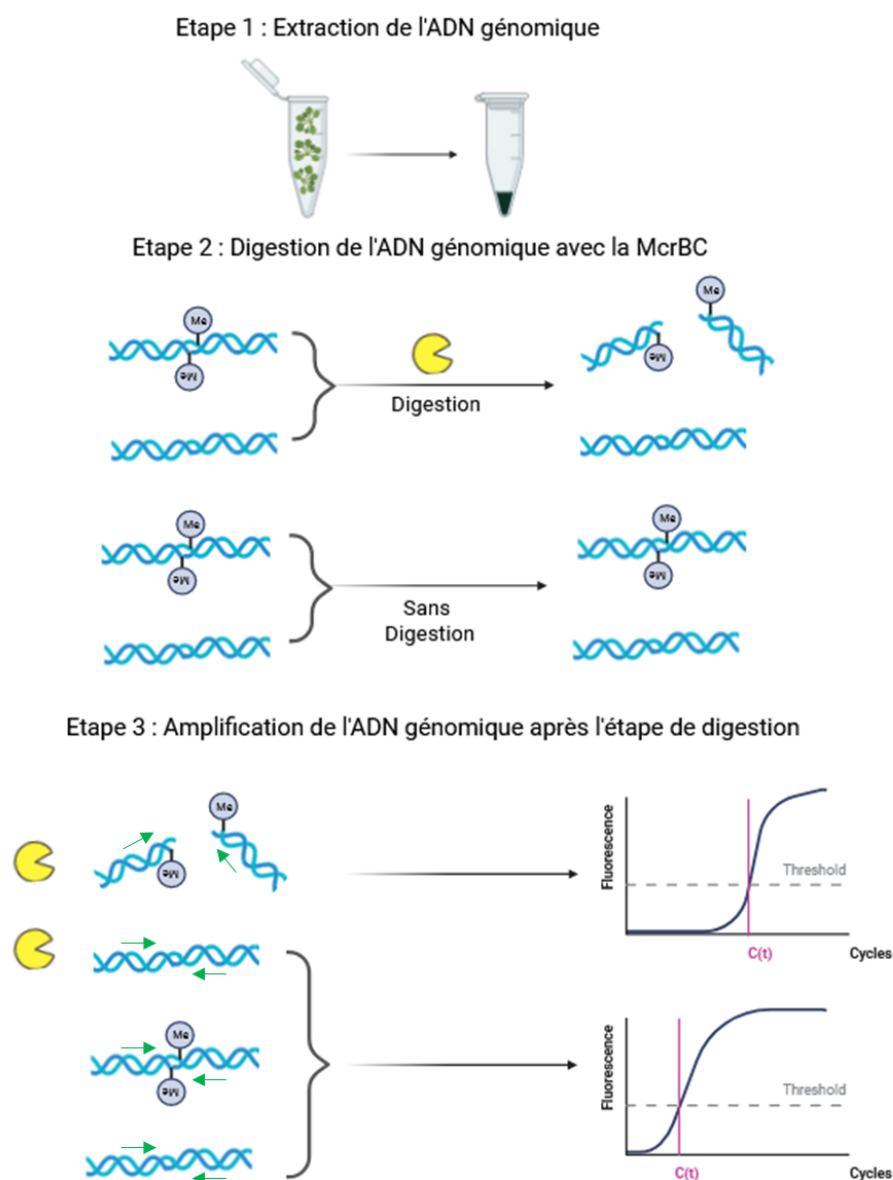


Figure II.4. : Principe de la Chop-PCR avec digestion des brins fortement méthylés par l'enzyme de restriction McrBC et amplification par PCR quantitative. La McrBC est capable de couper les brins d'ADN méthylés. Ces brins d'ADN sont alors peu ou pas amplifiés par la PCR ou qPCR. L'étape 1 correspond à l'extraction d'ADN génomique de la plante. L'étape 2 consiste en la digestion, ou non, de cet ADN par l'enzyme McrBC. Cette enzyme est capable de couper les brins d'ADN fortement méthylés. A l'étape 3, une qPCR permet d'évaluer le niveau de molécules d'ADN intactes dans chacune des conditions, digérée et non digérée. Les brins d'ADN originalement méthylés et digérés ne sont pas amplifiés. Le pourcentage de méthylation se calcule en pourcentage de molécules perdues lors de la digestion par la McrBC selon la formule décrite par Silveira et al. (2013) par rapport à la quantité de molécules amplifiées pour l'ADN non digéré (Adaptée de Rausch and Laubinger, 2016). Les traits verts correspondent aux amorces utilisées pour l'amplification PCR, localisées de part et d'autre du site de la coupure.

3.4. Analyses statistiques de l'effet des variants génétiques présents dans l'intervalle de confiance des QTL^{epi}

Afin d'évaluer l'effet des variations de la séquence d'ADN (SNP, indel ou TE) sur la détection des QTL^{epi}, trois modèles linéaires différents ont été comparés (Kooke *et al.*, 2015) : (1) en utilisant les épimarqueurs présents au pic de chaque QTL^{epi}, (2) en utilisant les marqueurs génétiques (SNP, indel, insertion TE à l'état homozygote) situés dans l'intervalle de confiance de chaque QTL^{epi} à la place des marqueurs épigénétiques et (3) en utilisant tous les marqueurs épigénétiques et génétiques situés dans l'intervalle de confiance de chaque QTL^{epi}. Si les variants génétiques ont un effet plus important que l'épimarqueur au pic du QTL^{epi}, alors le modèle ajusté est meilleur que le modèle initial et le QTL^{epi} détecté n'est pas considéré comme étant d'origine épigénétique mais d'origine génétique.

4. Etude du niveau de méthylation de régions génomiques en fonction des conditions abiotiques appliquées

Afin de suivre le niveau de méthylation de certaines DMR et de gènes d'intérêt dans la population epiRIL et les écotypes Col-0 et Bur-0 en fonction des conditions abiotiques et biotiques appliquées, nous avons utilisé la méthode Chop qPCR, basée sur l'utilisation de l'enzyme de restriction McrBC (Holemon *et al.*, 2007; Petell *et al.*, 2017). Cette méthode repose sur la capacité de l'enzyme de restriction McrBC à couper les brins d'ADN fortement méthylés entraînant un retard de l'amplification par PCR/qPCR de ces brins d'ADN coupés. Il est alors possible d'évaluer le niveau de méthylation en comparant des échantillons digérés et non digérés (**Fig. II.4.**).

L'état de méthylation de deux DMR, MM171 et MM863 localisées sur les chromosomes 2 et 5, respectivement, ainsi que des deux gènes *AT5G47260* et *AT5G47280*, identifiés comme causaux du QTL *PbAt-Pb 5.2*, a été étudié. Les amorces (**Tableau II.4.**) ont été définies en utilisant les données de séquençage de 1001 Genomes (Kawakatsu *et al.*, 2016b) ainsi que les données de méthylation acquises sur le parent sauvage Col-0 et le parent muté Col-*ddm1-2* (Colome-Tatche *et al.*, 2012; Stroud *et al.*, 2013). Les ADN ont été extraits comme explicité dans le paragraphe 2.3. Ils ont ensuite été traités avec l'enzyme McrBC (New England BioLabs, NEB, M0272S) qui coupe l'ADN au niveau des cytosines méthylées (**Fig. II.4.**).

Tableau II.4. : Liste des amorces utilisées pour l'étude du niveau de méthylation de différentes régions génomiques ainsi que pour l'étude du niveau d'expression de gènes d'intérêt, des précurseurs de miARN et de leurs gènes cibles.

Amorces définies pour le niveau de méthylation			
Gènes/Régions Génomiques	Méthode	Amorce F	Amorce R
<i>AT5G47400</i>	Chop-qPCR	GAAGCCGAACTGCAAACCTGT	ATGGTCCGGCTCTAGGAAAA
<i>MM171</i>	Chop-qPCR	TGGAGAAACGGCCTTGGTAT	AGAAGGTTTGTGGGAAACGC
<i>MM863</i>	Chop-qPCR	GTGGTGAAGACGTCGGAGAT	AATAGATTGCGCCATTTTGG
<i>AT5G47260</i>	Chop-qPCR	TGCGTCGACCTATCGTTACA	CCATGCCGTATCAAGCAAC
<i>AT5G47280</i>	Chop-qPCR	ATTTCCCAAGGCAGAAGTT	GGTAGGGATGGGGAAGTCAT
Amorces définies pour le niveau d'expression des gènes & miARN			
Gènes/miARN	Méthode	Amorce F	Amorce R
<i>AT5G47260.1</i>	qPCR	AAGGTGGTCCAATCGGGAAC	GATGGGGCAATCTGGTGTGA
<i>AT5G47280.2</i>	qPCR	AGCATACCAAGTTCCGCAGT	TCGGGCCAAGTCATGTTGAA
<i>PP2AA2</i>	qPCR	GATCTGCATTGGCCTCAGTT	GCTGGCAACAAGGATTGTGA
<i>PP2AA3</i>	qPCR	AGTATCGCTTCTCGCTCCAGT	TGCGAAATACCGAACATCAA

Les conditions de digestion de l'ADN sont les suivantes : 0,5 µL BSA (20 mg/mL), 0,5 µL de GTP (20 mM), 5 µL NEB (10X) et 0,2 µL McrBC (10000 U/mL) pour traiter 40 ng d'ADN. Deux ng des ADN digérés et non digérés ont ensuite été utilisés pour les réactions de CHOP qPCR (**Fig. II.4.**).

Pour déterminer l'état de méthylation de la région étudiée, chaque échantillon est présent sous sa forme digérée et non digérée (contrôle) par la McrBC. Le niveau de méthylation de la région ciblée a été calculé en pourcentage de molécules perdues lors de la digestion par la McrBC selon la formule décrite par (Silveira *et al.*, 2013) :

$$\text{Niveau de méthylation} = (1 - 2^{-(Cp \text{ échantillon digéré} - Cp \text{ échantillon non digéré})}) * 100$$

Cp échantillon digéré correspond au cycle seuil issu de la qPCR réalisée sur l'échantillon digéré par la McrBC et le Cp échantillon non digéré correspond au cycle seuil issu de la qPCR réalisée sur le même échantillon non digéré par la McrBC.

Le gène *AT5G47400* hyperméthylé en condition standard de culture a été utilisé comme témoin afin de valider la bonne digestion des échantillons.

5. Etude de l'expression des gènes *AT5G47260* et *AT5G47280*

Le jour de la récolte, les plantes non inoculées ont été lavées minutieusement à l'eau claire puis les racines ont été prélevées par génotype et par bloc, congelées dans l'azote liquide et lyophilisées. L'ARN a été extrait en utilisant le kit SV Total RNA Isolation System (Promega) selon les recommandations du fabricant. Deux amorces localisées dans les introns du gène *AT1G31940* ont été utilisées pour évaluer la possible contamination de nos échantillons par de l'ADN selon le programme PCR suivant : dénaturation à 94°C pendant 2 min, 35 cycles d'une étape de dénaturation à 94°C pendant 30 s puis d'une hybridation à 60°C pendant 30 s et une étape d'élongation à 72°C pendant 30 s, suivie une étape de fin d'élongation de 5 min à 72°C. Les échantillons qui présentaient une bande ont été de nouveau traités avec le kit DNase I (ThermoFisher) selon le protocole établi par le fabricant. Les ARN nettoyés ont ensuite été dosés au Quantus en utilisant le kit QuantiFluor® RNA system (Promega) et au NanoDrop ND-1000.

Après un contrôle qualité des ARN sur gel électrophorèse, le kit Transcriptase inverse SuperScript™ II (Invitrogen) a été utilisé pour l'étape de transcription inverse des ARN en ADNc. Les RT-qPCR ont été réalisées sur les ADNc avec un thermocycler LightCycler®480 (Roche) en utilisant le Syber Green (LightCycler® 480 SYBR Green I Master) selon les recommandations du fabricant. L'expression des gènes d'intérêt a été normalisée en utilisant comme référence deux gènes ayant une expression considérée comme stable quel que soient les conditions de culture, *PP2AA2* (*AT3G25800*) et *PP2AA3* (*AT1G13320*) via la méthode $\Delta\Delta Ct$ (Pfaffl, 2001). Pour chaque gène, des jeux d'amorces spécifiques ont été dessinés ou sont issues de la littérature (**Tableau II. 4.**).

6. Implication des microARN dans la réponse d'*A. thaliana* à *P. brassicae*

L'implication des miARN dans la réponse à la hernie chez *Arabidopsis* a été réalisée par l'étude d'un jeu de données acquis avant le début de ma thèse et encore non valorisé. Ci-après est décrit le dispositif expérimental et les méthodes utilisées pour l'obtention de ces données et leur analyse (**Fig. II.5.**).

6.1. Dispositif expérimental

Les tests pathologiques ont été réalisés en chambre de culture en conditions de jour long avec 16h de lumière à 22°C et 8h d'obscurité à 19°C. Les graines de Col-0 et Bur-0 ont tout d'abord été placées pendant 48h sur du papier absorbant humifié à 4°C dans l'obscurité avant d'être semées dans des pots individuels de 4 cm de diamètre sur un substrat composé de 2/3 de compost et 1/3 de vermiculite. Les plantules ont été inoculées 10 jours après le semis (stade 1.04, Boyes *et al.*, 2001) avec 1 mL d'une suspension de spores de repos à 10^7 spores par mL. Les expérimentations ont été menées en trois blocs randomisés. Les plantes inoculées et non inoculées (contrôles) ont été récoltées à 7 jours post inoculation (30 plantes par bloc par génotype) et 14 jours post inoculation (18 plantes par bloc et par génotype). L'indice pathologique a été évalué 21 jours après inoculation comme expliqué dans le paragraphe **2.3.**

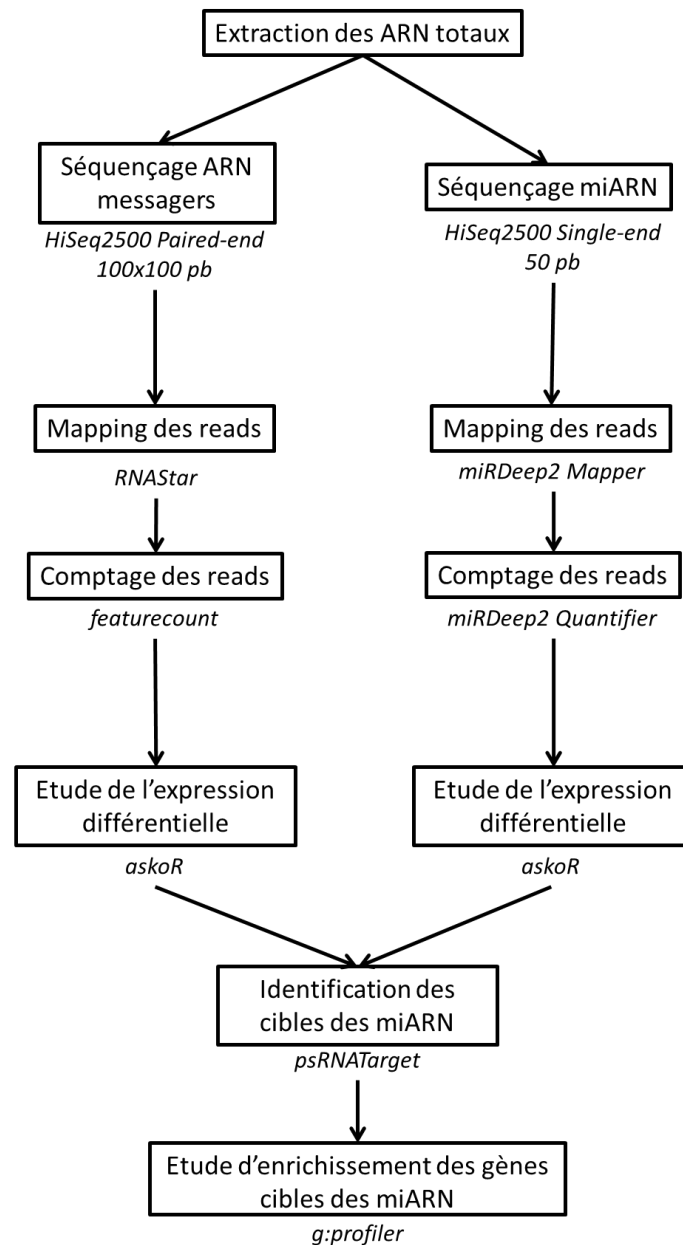


Figure II.5. : Processus d'identification des miARN et de leurs cibles lors de l'infection par *P. brassicae* chez les génotypes sensible, Col-0 et partiellement résistant, Bur-0. Les ARN totaux ont été extraits puis séquencés par la plateforme NGS de l'institut Marie Curie, Paris. Un mapping a été réalisé via différents outils sur la plateforme Galaxy (Bras et al., 2013) suivi d'un comptage des reads. L'utilisation de l'outil Askor sur RStudio a permis d'identifier les ARNm et miARN différentiellement exprimés. L'outil psRNATarget (Dai et al., 2018) a permis d'identifier dans notre pool de gènes différentiellement exprimés, les cibles potentielles des miARN différentiellement exprimés. Une analyse d'enrichissement fonctionnel via l'outil *g:profiler* (Raudvere et al., 2019) a permis d'identifier les potentielles fonctions physiologiques des cibles de ces miARN.

6.2. Isolement et séquençage des ARN totaux

A chaque point cinétique (7 et 14 jours après inoculation), les plantes ont été lavées minutieusement à l'eau claire puis les racines ont été prélevées, congelées dans l'azote liquide et lyophilisées. Les ARN totaux ont été extraits en utilisant le kit mirVana™ miARN Isolation Kit (Ambion) en suivant les instructions du fabricant (**Fig. II.5.**). Les ARN ont été dosés en utilisant le NanoDrop ND-1000 et leur qualité évaluée en utilisant une puce ARN 600 assay kit total RNA (Agilent). Les échantillons possédant un RIN (RNA integrity number) supérieur ou égal à 7 ont été utilisés pour le séquençage. La construction des banques de séquençage ainsi que le séquençage ont été réalisés par la plateforme NGS de l'institut Marie Curie de Paris. La technologie HiSeq2500 de type paired-end (100x100 pb) a été utilisée pour le séquençage des ARN messagers et la technologie HiSeq2500 de type single-end (50 pb) pour le séquençage des microARN.

6.3. Alignement et comptage des reads issus du séquençage

Ces analyses ont été réalisées sur la plateforme Galaxy Gene Ouest (Bras *et al.*, 2013).

Gènes

Les reads nettoyés issus du séquençage des ARN messager ont été alignés par rapport au génome de référence Colombia (Col-0, TAIR10, GTF Annotation Mar20201) d'*Arabidopsis* pour l'écotype Col-0 et pour Bur-0, à l'aide de l'outil RNAStar (Dobin *et al.*, 2013) sur Galaxy (Afgan *et al.*, 2018). Les reads obtenus pour Bur-0 ont également été mappés par rapport au génome de Bur-0 (Gan *et al.*, 2011), mais l'efficacité de mapping étant trop faible, seul l'alignement par rapport au génome de Col-0 a été conservé dans la suite des analyses. Pour les deux écotypes, les comptages ont été réalisés à l'aide de l'outil featureCounts (Liao *et al.*, 2014).

MicroARN

Les reads issus du séquençage des microARN ont été mappés via l'outil de cartographie miR-Deep2 (Yang *et al.*, 2011; Friedländer *et al.*, 2012) par rapport au génome de référence d'*Arabidopsis* (TAIR10, GTF Annotation Mar20201) ainsi qu'aux miARN matures connus de la base de données miRbase (Griffiths-Jones, 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2014) sur Galaxy (Afgan *et al.*, 2018). Pour les deux écotypes, les lectures ont été comptées à l'aide de l'outil de quantification miRDeep2 (Yang *et al.*, 2011; Friedländer *et al.*, 2012).

6.4. Identification des gènes et microARN différentiellement exprimés

Que ce soit pour les microARN ou les ARN messagers, les analyses d'expression différentielle ont été réalisées à l'aide du pipeline Askor sur RStudio (RStudio Team, 2022) qui utilise les packages EdgeR, UpSetR, topGO et Coseq (Alves-Carvalho *et al.*, 2021). Les ARNm ou microARN dont l'expression diffère de manière significative ont été identifiés en utilisant une correction du False Discovery Rate (FDR) de 5 % ($p < 0,05$; ajustement de Benjamini-Hochberg). Seuls les ARNm et microARN dont l'expression a été soit doublée soit divisée par deux ont été conservés pour la suite des analyses.

6.5. Analyse fonctionnelle des gènes et microARN différentiellement exprimés

L'analyse d'enrichissement fonctionnel des ARN messagers cibles a été réalisée à l'aide du logiciel g:Profiler (Raudvere *et al.*, 2019) en utilisant tous les gènes connus, c'est-à-dire les gènes annotés et les gènes non annotés et les autres paramètres par défaut (g:SCS $< 0,05$). De plus, l'outil psRNATarget a été utilisé avec les paramètres par défaut (Dai *et al.*, 2018) pour identifier les cibles potentielles des miARN identifiés, c'est-à-dire les ARN messagers dont une partie de la séquence nucléotidique est complémentaire de celle des miARN. Pour cela, les gènes et les miARN précédemment identifiés comme différentiellement exprimés ont été utilisés. A partir des résultats produits par psRNATarget, un tri a été réalisé pour conserver les interactions miARN-gènes dont les expressions étaient cohérentes, c'est à dire si un miARN est induit dans les tissus infectés, sa cible doit être réprimée, et inversement. Nous avons pu ensuite caractériser les cibles de chaque famille de miARN en utilisant l'outil g:profiler, comme précédemment (Raudvere *et al.*, 2019).

7. Etude de la réponse des mutants de microARN à l'infection par *P.*

brassicae

La réponse à l'infection par la hernie (isolat eH) a été évaluée pour sept mutants impactés dans l'expression de certains miARN (**Tableau II.1.**). Lors de ce test pathologique, les deux écotypes Col-0 et Ler-0 sensibles à l'isolat eH de *P. brassicae* ont également été phénotypés en tant que témoins sensibles et fonds génétiques sauvages dans lesquels ont été générés les mutants. Bur-0 lui a été phénotypé en tant que génotype témoin présentant une résistance partielle vis-à-vis de l'isolat eH.

7.1. Dispositif expérimental

Les graines de chaque génotype ont été placées 4 jours sur du papier filtre humidifié à 4°C dans l'obscurité. Elles ont ensuite été semées dans des pots individuels de 4 cm de diamètre sur un terreau composé de 65% de tourbe irlandaise, 20 % de tourbe noir balte gelée, 15% perlite et 2% d'argile danois (Faliénor 922016F1). Le dispositif expérimental comporte 3 blocs (A, B et C). Par bloc et par génotype, 12 plantes ont été inoculées 10 jours après le semis avec 1 mL d'une suspension de spores de repos à 10^7 spores par mL et 6 plantes n'ont pas été inoculées et serviront comme plantes contrôle pour étudier l'expression des gènes cibles et des miARN. La gamme d'hôtes différentiels de Somé et al (1996) ainsi que C10, CB151 et ECD5 ont été semés dans chaque répétition pour valider l'infection et l'isolat eH.

7.2. Caractérisation phénotypique de l'impact de l'infection par *P. brassicae* sur la plante hôte

Trois traits ont été évalués sur les plantes inoculées : la longueur de la plus longue feuille de la rosette (Lfi), la surface des galles (GA) et l'indice pathologique (IP). Sur les plantes non inoculées contrôle, seule la longueur de la plus longue feuille de la rosette a été mesurée (Lfni). Ces données ont permis le calcul de l'indice GA/LA et de dLF pour chaque génotype et pour chaque bloc.

**CHAPITRE III : Impact de contraintes abiotiques
sur l'architecture épigénétique de la réponse d'*Ara-*
bidopsis thaliana à la hernie**

CHAPITRE III : Impact de contraintes abiotiques sur l'architecture épigénétique de la réponse d'*Arabidopsis* *thaliana* à la hernie

1. Introduction

De nombreuses études rapportent l'impact négatif de contraintes abiotiques – notamment dans le cadre du changement climatique – sur la production agricole (Lobell *et al.*, 2011; Wheeler & von Braun, 2013; Zhao *et al.*, 2017b). Les études rapportant l'impact des contraintes abiotiques sur la réponse des plantes aux agents pathogènes sont moins nombreuses et rares sont celles qui traitent de l'impact de facteurs abiotiques combinés aux facteurs biotiques. De par les interactions possibles entre les stress, l'effet de stress multiples (abiotique et biotique) sur un phénotype est compliqué à évaluer. S'il n'y a pas d'interaction entre les différents facteurs en jeu on peut s'attendre à une additivité des effets des différents stress. S'il y a une interaction, celle-ci peut résulter soit d'une synergie positive (effet plus positif que l'additivité prédite) ou négative (effet plus négatif que l'additivité prédite), soit d'un antagonisme positif (effet moins positif que l'additivité prédite) ou négatif (effet moins négatif que l'additivité prédite) (Piggott *et al.*, 2015) (Cf Chapitre I.1.3.1).

La résistance à la hernie a été caractérisée chez *Arabidopsis* et dans différentes espèces du genre *Brassica* (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000a; Rocherieux *et al.*, 2004; Jubault *et al.*, 2008b). Cette résistance est contrôlée par des gènes majeurs et des QTL à effet modéré détectés sur des populations de cartographie et d'analyse génétiques dont les marqueurs moléculaires sont basés sur des variations nucléotidiques. La détection et l'effet de certains QTL de résistance dépendent cependant de facteurs biotiques tels que les isolats de *P. brassicae* utilisés (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000a; Rocherieux *et al.*, 2004; Jubault *et al.*, 2008b) ainsi que de facteurs abiotiques comme notamment la disponibilité en azote (Laperche *et al.*, 2017; Aigu *et al.*, 2018) ou en eau du substrat (Gravot *et al.*, 2016a). Les travaux de l'IGEPP ont montré également que la résistance à la hernie chez *A. thaliana* est contrôlée par des épimutations naturelles et induites (Liégard *et al.*, 2019a,b).

La détection et l'effet de certaines de ces épimutations sont également dépendantes des conditions expérimentales, notamment une élévation de trois degrés de la température (Liégard *et al.*, 2019a) et de la disponibilité en eau du substrat (Gravot *et al.*, 2016a). Le QTL *Pb-At 5.2*, détecté dans une population en ségrégation issue du croisement entre Bur-0 (partiellement résistant) et Col-0 (sensible) (Jubault *et al.*, 2008b) a ainsi été caractérisé comme étant contrôlé par une épimutation (Liégard *et al.*, 2019b). En effet, la cartographie fine de ce QTL, a conduit à l'identification de deux gènes causaux *AT5G47260* et *AT5G47280* codant des récepteurs NLR et dont l'expression est négativement corrélée à leur niveau de méthylation (Liégard *et al.*, 2019b). Une hyperméthylation des deux gènes est associée au phénotype de sensibilité observé chez Col-0 et une hypométhylation des deux gènes est associé au phénotype de résistance partielle observé chez Bur-0.

Dans cette partie de ma thèse je me suis attachée à évaluer l'impact de trois contraintes abiotiques ponctuelles seules ou en combinaison sur l'architecture du contrôle épigénétique (c'est-à-dire le nombre, l'effet et la localisation des QTL^{epi}) de la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie : une hausse de la température de 5°C, un déficit hydrique modéré et un engorgement du sol. Nous avons caractérisé la réponse à la hernie de 123 lignées de la population epiRIL, issue du croisement entre le mutant *ddm1-2* et l'écotype sauvage Col-0 (Johannes *et al.*, 2009) dans les conditions abiotiques décrites ci-dessus. Plusieurs traits liés au développement de la plante ou à la réponse de la plante à l'infection ont été évalués et utilisés pour réaliser une analyse d'épigénétique quantitative, en utilisant la carte épigénétique de 126 marqueurs épigénétiques construite par Colome-Tatche *et al.* (2012). Je me suis dans un premier temps intéressée à l'impact des trois conditions abiotiques prises individuellement sur l'architecture épigénétique de la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie (**Cf Chapitre III.2.**). Cette partie est présentée sous la forme d'un article soumis à la revue *Frontiers in Plant Science* dans la collection « Plant Plasticity and Epigenetics ». En complément de cette première partie, j'ai évalué l'impact de ces conditions abiotiques sur le niveau de méthylation de certaines régions génomiques potentiellement impliquées dans la résistance partielle d'*A. thaliana* à la hernie (**Cf Chapitre III.3.**). J'ai ensuite étudié l'impact de ces contraintes abiotiques combinées deux à deux sur la réponse d'*A. thaliana* à la hernie (**Cf Chapitre III.4.**). Une discussion sera proposée au sein de chaque partie et une conclusion partielle sera réalisée en **III.5.**

2. Environmental conditions modulate the effect of epigenetic factors controlling the response of *Arabidopsis thaliana* to *Plasmodiophora brassicae*

Key words: DNA methylation, temperature rise, flood, drought, clubroot, plasticity

Mathilde Petitpas¹, Romane Lapous¹, Mathieu Le Duc¹, Christine Lariagon¹, Jocelyne Lemoine¹, Christophe Langrume¹, Maria J. Manzanares-Dauleux¹ and Mélanie Jubault¹

¹ IGEPP, Institut Agro Rennes-Angers – INRAE – Université de Rennes, F-35000 Rennes, France

Running title: Epigenetic plasticity of *Arabidopsis* response to clubroot

Abstract

The resistance of *Arabidopsis thaliana* to clubroot, a major disease of *Brassicaceae* caused by the obligate protist *Plasmodiophora brassicae*, is controlled in part by epigenetic factors. The detection of some of these epigenetic QTL (QTL^{epi}) has been shown to depend on experimental conditions. The aim of the present study was to assess whether and how temperature and/or soil water availability influenced both the detection and/or the extent of the effect of response QTL^{epi}. The epiRIL population, derived from the cross between *ddm1-2* and Col-0 (partially resistant and susceptible to clubroot, respectively), was phenotyped for response to *P. brassicae* under four abiotic conditions including a 5°C temperature increase, drought and flooding. The abiotic constraints tested had a significant impact on both the leaf growth of the epiRIL and the outcome of the epiRIL/pathogen interaction. Of the 31 response QTL^{epi} detected, 17 were specific to one abiotic condition and 14 were common to at least two environments. EpiRIL showed significant plasticity under epigenetic control which appeared to be specific to the traits evaluated and to the abiotic conditions. These results highlight that the environment can affect the epigenetic architecture of plant growth and immune responses and advance our understanding of the epigenetic factors underlying plasticity in response to climate change.

2.1. Introduction

Epigenetics studies the mechanisms involved in the modulation of gene expression without changes in DNA sequence (Waddington, 1959; Holliday, 1987). Transgenerational epigenetics focuses on the epigenetic marks that are not reset during mitotic or meiotic divisions and are therefore transmitted from one generation to the next (Heard & Martienssen, 2014; Quadrana & Colot, 2016). DNA methylation, *i.e.* the addition of a methyl group to the cytosine of the DNA sequence, is one of the most important epigenetic mechanisms involved in genome stability and modulation of gene expression (reviewed in Zhang *et al.*, 2018). Methylation targets gene promoters, transposable elements, tandem and interspersed repeats and occurs in three different contexts: symmetric CH and CHG and the rarest asymmetric CHH with H being either A, T or C (Downen *et al.*, 2012; Deleris *et al.*, 2016).

In the model species *Arabidopsis thaliana*, there is growing evidence that transgenerational epimutations, and in particular DNA methylation variations, are involved in the control of complex traits related to developmental processes (Johannes *et al.*, 2009; Cortijo *et al.*, 2014a), metabolism (Aller *et al.*, 2018), and response to abiotic (Kooke *et al.*, 2015) and biotic stresses (Furci *et al.*, 2019; Liégard *et al.*, 2019a). Indeed, as sessile organisms, plants are exposed to a wide range of pathogens that cause yield losses and threaten global food security (O'Brien *et al.*, 2021). Climate change, especially fluctuations in temperature and water availability, affects both plant development and the response to pathogenic organisms (Barbetti *et al.*, 2012; Bhadra *et al.*, 2022). The extent to which environmental factors affects plants depends on the pathosystem, the intensity of the stress and the duration of the stress application (for a review, see Desaint *et al.* (2021) and Velásquez *et al.* (2018)). Furthermore and depending on the pathosystem, it has been shown that the application of an abiotic constraint can lead to improved resistance (Aoun *et al.*, 2017) or increased susceptibility of a plant to a pathogen (Bidzinski *et al.*, 2016). In addition, plants can adapt to environmental changes via phenotypic plasticity, which refers to the ability of one genotype to present different phenotypes under different environmental conditions (Bradshaw, 1965). Studying plastic responses to infection by pathogens would give us a better understanding of how to use (epi)genetic resistance in plant breeding to cope with climate change.

Plasmodiophora brassicae is a protist, soil-borne obligate pathogen and the causal agent of clubroot disease in *Brassicaceae* family, which includes important economic crops (oilseed rape, cabbages...) as well as *Arabidopsis* (Dixon, 2009a).

P. brassicae disrupts nutrient and water cycles, leading to yield loss and potential plant death (Dixon, 2009a). After infection of the root hairs (primary infection) by primary zoospores released during germination of resting spores, secondary zoospores infect the cortical cells (secondary infection) of the root tissues and lead to gall formation through hyperplasia (cell division) and hypertrophy (cell enlargement) (Liu *et al.*, 2020b). The genetic architecture of the plant response to clubroot has been described in several *Brassicaceae* species (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000a; Rocherieux *et al.*, 2004; Jubault *et al.*, 2008b; Lee *et al.*, 2015), as well as the modulation of the effect of some genetic resistance factors by abiotic constraints such as nitrogen supply (Laperche *et al.*, 2017; Aigu *et al.*, 2018), water availability (Gravot *et al.*, 2016a) or soil pH (Gossen *et al.*, 2012). Temperature was also found to significantly influence the outcome of *P. brassicae* infection (Sharma *et al.*, 2011a,b; Gossen *et al.*, 2012). Interestingly, in *Arabidopsis*, natural and induced epigenetic QTL (QTL^{epi}) have been shown to be involved in the plant response to *P. brassicae* (Liégard *et al.*, 2019b, 2019a), with the detection of some of these QTL^{epi} being dependent on experimental conditions (Liégard *et al.*, 2019a).

In the present paper, we further investigated whether and how the epigenetic architecture of the plant response to clubroot depended on temperature and soil water content. To this end, the epigenetic recombinant inbred line (epiRIL) population (Johannes *et al.*, 2009), derived from the cross between the *Col-ddm1-2* mutant (partially resistant to clubroot) and *Col-0* (susceptible to clubroot) (Liégard *et al.*, 2019b), was evaluated for clubroot resistance under different abiotic conditions: punctual and moderate temperature increase ($\pm 5^{\circ}\text{C}$ during night and day), water deficit or excess water. Overall, our study confirmed that epigenetic variations were involved in controlling *A. thaliana* response to *P. brassicae* infection and highlighted that the environment can affect the epigenetic architecture of both plant growth and immune responses.

2.2. Materials and Methods

2.2.1. Plant material

The epigenetic recombinant inbred line (epiRIL) population derived from the cross between the wild-type *Colombia Col-0* and the EMS mutant *Col-ddm1-2* (Johannes *et al.*, 2009) were obtained from the Versailles *Arabidopsis* Stock Center at the Institute Jean-Pierre Bourgin (<https://publiclines.versailles.inrae.fr>).

The parental line Col-*ddm1-2* did not germinate in all tests, which explains the lack of data for this genotype in some of our experiments. In order to validate the inoculation process and the pathotype of the *P. brassicae* isolate used, the following genotypes were used as part of the differential host set as characterised in Some et al. (1996): *Brassica napus* ssp. *oleifera* cv ‘Nevin’ (ECD6), *B. napus* ssp. *rapifera* cv ‘Wilhelmsburger’ (ECD10), *B. napus* ssp. *oleifera* (Brutor), *B. oleracea* ssp. *acephala* (C10, C7 and CB151), *B. rapa* ssp. *pekensis* cv ‘Granaat’ (ECD5), and *B. napus* cv ‘Mendel’.

2.2.2. *Plasmodiophora brassicae*

All pathological tests were carried out using the *P. brassicae* isolate *eH* (Fahling et al., 2003), which belongs to the pathotype P1 (Some et al., 1996). The inoculum was prepared at 10^7 spores/mL as in Manzanares-Dauleux et al. (2000), and 1mL of the inoculum was applied to the base of the seedlings ten days post-sowing (stage 1.04; Boyes et al., 2001). The life cycle of *P. brassicae* in *A. thaliana* is completed in 21 days post-inoculation with the primary infection lasting seven days and the secondary infection starting seven days after infection until the end of the cycle (Liu et al., 2020b).

2.2.3. Growth conditions and experimental set-up

The epiRIL response to clubroot was assessed under four environmental conditions in two growth chambers. The standard growth conditions used in our laboratory for pathological clubroot tests were used as the control environment (denoted STANDARD) with 22°C during the 16h of light and 19°C during the 8h of darkness and a volumetric water content (VWC, %) varying from 20% to 50% across the test. For the three other environmental conditions, plants were grown under the same conditions as in STANDARD, except from seven to fourteen days post-inoculation, which corresponds to the beginning of the secondary phase of infection (Liu et al., 2020b), where the temperature or the soil water content was modified for 7 days. For the heat condition (denoted HEAT), a temperature increase of 5°C was applied (27°C during the light period and 24°C at night). For the moderate drought condition (denoted DROUGHT), watering was stopped 3 days before the start of the secondary cycle of *P. brassicae* resulting in a decrease of the VWC from 30% to less than 10%. For the flooding condition (denoted FLOOD), plants were watered with 6 L of clear water for 7 days leading to water saturation and a VWC above 50%.

These abiotic conditions were chosen so that the plant could perceive the stress applied while ensuring that both the plant and the pathogen could continue to grow. Finally, the 5°C temperature increase applied in this study corresponds to the increase predicted in the worst-case climate change scenario (IPCC, 2023).

For each environment, the epiRIL population as well as the parental lines were phenotyped in a randomised complete block design with two replicates by growth chamber, two blocks per replicate and six plants per epigenotype per block (48 plants by epiRIL). For each pathological test, seed germination was synchronised by placing seeds on wet blotting paper in Petri dishes for 2 days at 4°C in the dark. Seeds were sown individually in pots (7x7x8 cm) containing a soil mix of 54% peat, 40% sand and 6% clay. The differential host set was repeated four times for each condition. For STANDARD, all four repetitions of the differential host set were placed under the conditions described for STANDARD. For HEAT, DROUGHT and FLOOD, two repetitions were put in the STANDARD conditions and the two others were placed in the conditions described for HEAT, DROUGHT and FLOOD respectively.

In order to distinguish the impact of the abiotic environment from that of the pathogen infection on the plant development, the epiRIL population was also grown under the four environmental conditions STANDARD, HEAT, DROUGHT and FLOOD but without being inoculated by *P. brassicae*, in a randomised four-block design with two blocks per replicate, two replicates and three plants per block (24 plants per epiRIL).

Ten ThermoChron iButton Device (DS1922E/DS1921G) sensors per growth chamber were used to control the temperature and six SenseCAP (LoRaWAN EU868Mhz) sensors were used for VWC assessment.

2.2.4. Phenotyping

The growth of plants infected or not infected by *P. brassicae* was assessed by measuring the length of the longest leaf of inoculated (Lfi) and non-inoculated plants (Lni). For each condition, measurements were taken between 24 and 27 days after sowing. We denoted dLf the difference between Lfni and Lfi to assess the impact of the pathogen on plant growth.

Plant response to *P. brassicae* infection was evaluated three weeks post-inoculation (31 days after sowing): plants were dug up, rinsed with clear water, then the disease index (DI) described in Manzanares-Dauleux et al. (2000), was calculated, with $DI = (n_1 \times 25 + n_2 \times 50 + n_3 \times 75 + n_4 \times 100)/N$, where n_i is the number of plants in the symptom class i and N the total number of plants assessed. Pictures of the plants were taken, enabling the acquisition of the gall area measure (variable GA) using FIJI (Schindelin *et al.*, 2012). The DI is representative of the impact of clubroot on the root system, while the GA variable gives an indication on the size of the symptoms (gall size). A third disease-related trait (GALA), which expresses root disease symptoms relative to shoot development, was calculated as follows: $(GA / (Lfi^2)) \times 5000$, as defined in Gravot et al. (2011). Phenotypic plasticity, defined as the ability of plants to modulate their phenotype depending on their environment, was estimated by the difference between the value of each trait obtained under the STANDARD condition and that obtained in one of the other abiotic conditions tested (variable called deltaTrait). Thus, six deltaTraits were calculated: deltaLfni, deltaLfi, deltadLf, deltaDI, deltaGA, and deltaGALA. These variables were measured for the following comparisons: Standard - Heat (StdHeat), Standard - Drought (StdDrought), and Standard - Flood (StdFlood).

2.2.5. Statistical analyses

A linear model was used to determine the effect of the epigenome and the effect of the experimental design for each trait assessed under the four environmental conditions using the following equation (**Supp. Table 1**):

$$\text{Equation 1 } Y_{ijk} = \mu + EG_i + R_j + B_k(R_j) + e_{ijk}$$

where μ is the global mean, EG_i is the epigenotype effect of the i line, R_j the replicate effect, $B_k(R_j)$ the block effect nested in the replicate effect, and e_{ijk} the residual fitted on a Gaussian distribution. The model was fitted using the function *lm* of the package *stats*, using R version 4.2.1 (R Core Team, 2022). For each trait, adjusted average values were computed from the results of Equation 1.

Analyses of variance were performed for each disease related trait and broad-sense heritability (h^2) was calculated as followed:

$$\text{Equation 2} \quad h^2 = \frac{Ge}{Ge+Gr}$$

where Ge is the estimated epigenetic variance and Gr the estimated block x repetition effect. Ge and Gr were obtained from the lm model described in Equation 1.

Principal component analysis and clusterisation were achieved using all deltaTraits and were carried out using the R packages *FactoMineR* (Lê *et al.*, 2008) and *Factoextra* packages (Kassambara & Mundt, 2020). All the comparisons between traits or conditions were achieved through the Kruskal-Wallis test, unless stated otherwise.

2.2.6. QTL^{epi} detection

The differences in methylation between the different lines was characterised by Colome-Tatche *et al.* (2012) and was used as a base for the definition of epigenetic markers in order to create an epigenetic map for linkage analysis studies. QTL^{epi} were detected using the R package *qtl* (Broman *et al.*, 2003) of the R 4.2.1 version (R Core Team, 2022). Single interval mapping (SIM) was first used to identify potential QTL^{epi} with the multiple imputation (imp) method using step size of 2 cM and a window size of 10 cM. SIM thresholds were evaluated by doing a 5000 permutational tests and significance was fixed at $\alpha=0.05$. To improve the statistical power of the QTL^{epi} detection, multiple QTL mapping (MQM) (Arends *et al.*, 2010) was achieved with the function *stepwise*. Logarithm of the odds (LOD) thresholds were calculated with 5000 permutations using the *scantwo* function with a significance level of $\alpha=0.05$. When QTL^{epi} were detected, the model was fitted with the *fitqtl* function to calculate the percentage of variation explained (R^2) by each QTL^{epi}. The *lodint* function was used to calculate the confidence interval of each QTL^{epi}, and the function *effectplot* to estimate the epiallele effect. Finally, the *addint* function was used to assess putative interactions between detected QTL^{epi}.

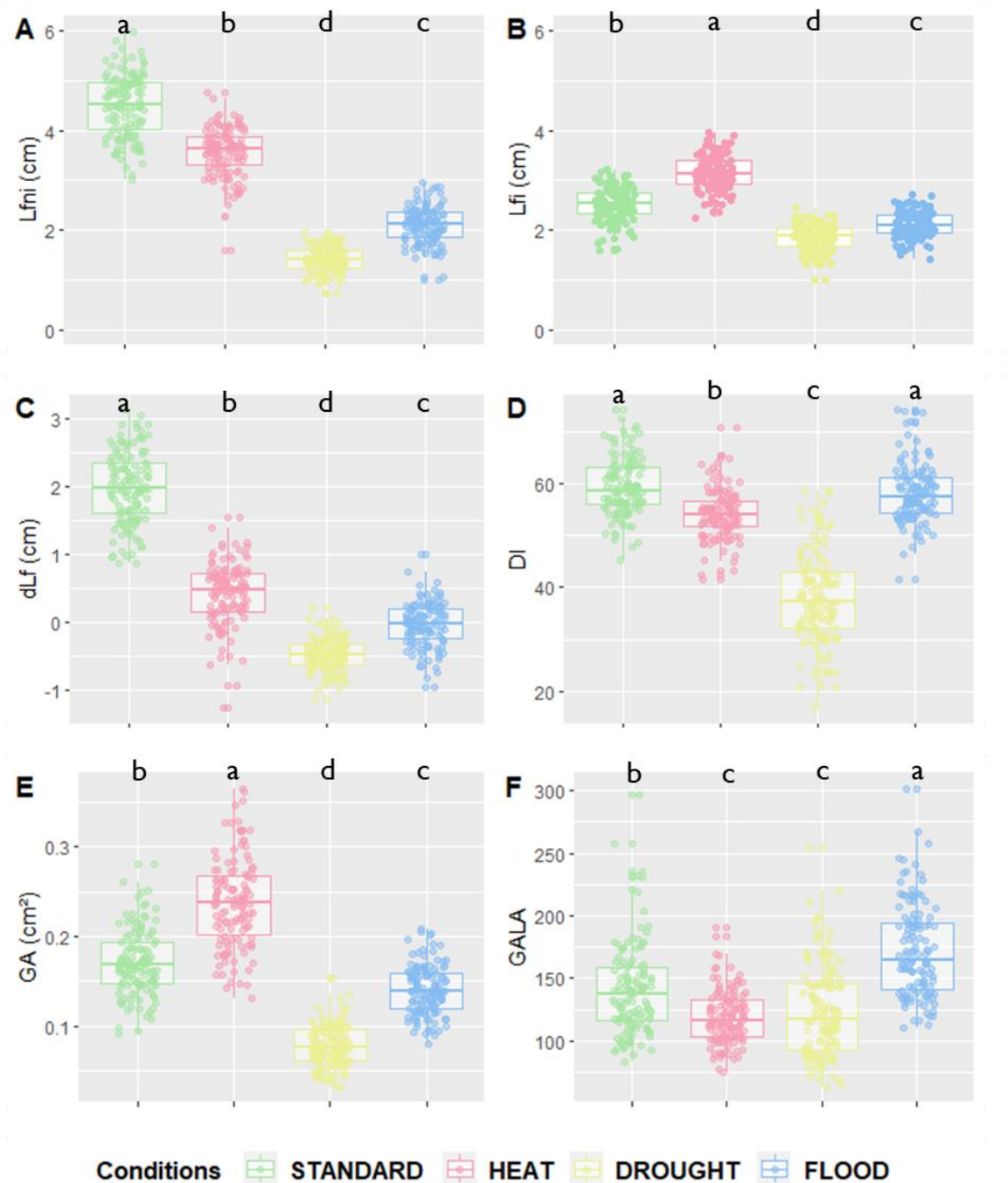


Figure III. 1.: Leaf growth and disease-related trait values according to the different abiotic conditions for A) Lfni, B) Lfi, C) dLf, D) DI, E) and F) GALA variables. Green is for STANDARD, pink for HEAT, yellow for DROUGHT and blue for FLOOD conditions. Significant differences for each trait between conditions are given by different letters obtained by a Kruskal-Wallis test, p -value < 0.05.

2.2.7. DNA sequence variation

To assess whether the QTL^{epi} detected were due only to epigenetic variations and not to genetic variations, we also tested the significance of the genetic variants present in the confidence interval of the QTL^{epi}. Whole genome sequence data were available for the 123 epiRIL epigenomes (Gilly *et al.*, 2014). GATK HaplotypeCaller was used to identify single-base substitutions (SNP) and indels (<100bp) among 122 epiRIL and TE-Tracker (Gilly *et al.*, 2014) was used to identify transposition events (TE) as previously described (Liégard *et al.*, 2019a). In order to evaluate the impact of genetic variants on heritable variation in the response to clubroot, 3 QTL models were compared as described in Kooke *et al.* (2015): (1) using epigenetic markers at the QTL^{epi} peak, (2) using genetic DNA variants (SNP, indel, TE insertion) located in the confidence interval instead of epigenetic markers and (3) using both epigenetic and genetic variants.

2.3. Results

2.3.1. Effect of abiotic factors on the epigenetic architecture controlling foliar development

Leaf growth of the epiRIL population was significantly affected by abiotic conditions

In order to study the impact of the abiotic conditions HEAT, DROUGHT and FLOOD on the epiRIL population, the length of the longest leaf of non-inoculated plants (Lfni) was measured as a proxy of leaf growth. Col-0 showed a significant reduction of Lfni by 45% in the FLOOD (Kruskal-Wallis test, $p = 0.0087$) and DROUGHT ($p = 0.0012$) conditions, while no significant effect was observed for the HEAT condition (**Supp. Fig. 1.**). Data were not available for *ddm1-2* as seeds did not germinate. The leaf growth of the epiRIL population was significantly affected by HEAT, DROUGHT and FLOOD conditions, resulting in a significant reduction compared to the STANDARD condition. HEAT had a small effect on leaf growth (20% reduction of Lfni; $p < 0.001$), while DROUGHT and FLOOD had a strong effect (68% and 53% reduction, respectively; $p < 0.001$) (**Fig. III.1.A**). In addition to the significant variability observed between conditions, leaf growth of the epiRIL population displayed variability within each abiotic condition with coefficients of variation ranging from 12.8% for STANDARD to 18.5% for DROUGHT.

Table III. 1.: Broad sense heritability (h^2) for leaf growth and disease-related traits in the epiRIL population under four abiotic conditions STANDARD, HEAT, DROUGHT and FLOOD. Mean and Standard Deviation for h^2 are given within each condition and for each trait.

h^2	STANDARD	HEAT	DROUGHT	FLOOD	Mean	Standard Deviation
Lfni	0.78	0.72	0.64	0.69	0.71	0.06
Lfi	0.71	0.68	0.66	0.76	0.70	0.04
DI	0.49	0.48	0.57	0.53	0.52	0.04
GA	0.66	0.55	0.58	0.62	0.60	0.05
GALA	0.67	0.63	0.47	0.52	0.57	0.09
Mean	0.66	0.61	0.58	0.62		
Standard Deviation	0.11	0.10	0.07	0.10		

h^2 is the broad sense heritability calculated as followed:

$H^2 = \frac{Ge}{Ge+Gr}$ with Ge is the estimated epigenetic variance and Gr is the estimated block x repetition effect.

Lfni: length of the longest leaf of uninoculated plants, Lfi: length of the longest leaf of inoculated plants, DI: disease index, GA: gall area and GALA: GA/Lfi² index.

The epigenetic architecture controlling leaf growth was modified by abiotic conditions

For the four environments tested, Lfni presented continuous distributions in the epiRIL population (**Supp. Figure 1**), suggesting a poly-epigenetic control of this trait, with moderate to high broad-sense heritability (0.64 to 0.78, depending on the abiotic conditions; **Table III. 1**). In total, 13 moderate-effect QTL^{epi} (R^2 ranging from 8.09 to 18.40%) controlling leaf growth were detected for all four conditions. Three QTL^{epi} were filtered out, as one genetic variant within the QTL^{epi} interval had a significantly larger effect than the epigenetic marker at the peak of the QTL^{epi} (Supp. Table 2). Thus, 10 *bona fide* QTL^{epi} were conserved: 2 for STANDARD on chromosomes 1 and 2; 4 for HEAT on chromosomes 1, 3, 4, and 5; 2 for DROUGHT on chromosomes 1 and 3; and 2 for FLOOD on chromosomes 1 and 2 (**Fig. III. 2**). Several QTL^{epi} controlling Lfni overlapped and shared most of their confidence interval between conditions. Indeed, four QTL^{epi} overlapped on chromosome 1 for STANDARD, FLOOD, DROUGHT and HEAT, two QTL^{epi} overlapped on chromosome 2 for STANDARD and FLOOD and two overlapped on chromosome 3 for HEAT and DROUGHT. The phenotypic variability explained by these overlapping QTL^{epi} (R^2) was consistent regardless of the abiotic conditions. Two epigenetic factors controlling Lfni were specific to HEAT condition, one QTL^{epi} on chromosome 4 and one QTL^{epi} on chromosome 5.

2.3.2. The abiotic conditions significantly modulated the response of the parents and the epiRIL population to clubroot

To fully assess the plant response to clubroot, several traits were measured. As previously done on non-inoculated plants, leaf growth of the inoculated plants was estimated by measuring the length of the longest leaf (Lfi). The effects of *P. brassicae* on plant leaf growth were assessed by calculating the variable dLf. GA and DI assessing the gall symptom size and the severity of the disease, respectively, allowed the evaluation of clubroot symptoms and root system functionality. As epiRIL showed different leaf growth under STANDARD conditions and for a same epiRIL, differences between the abiotic conditions, the GALA index, which considers leaf growth (Lfi) as a function of symptom size (GA), was calculated to compare both symptoms between epiRIL under one condition and between epiRIL in the different abiotic conditions. For each experiment, proper inoculation and the pathotype P1 of the *eH* isolate used were confirmed using the differential host set under the condition STANDARD.

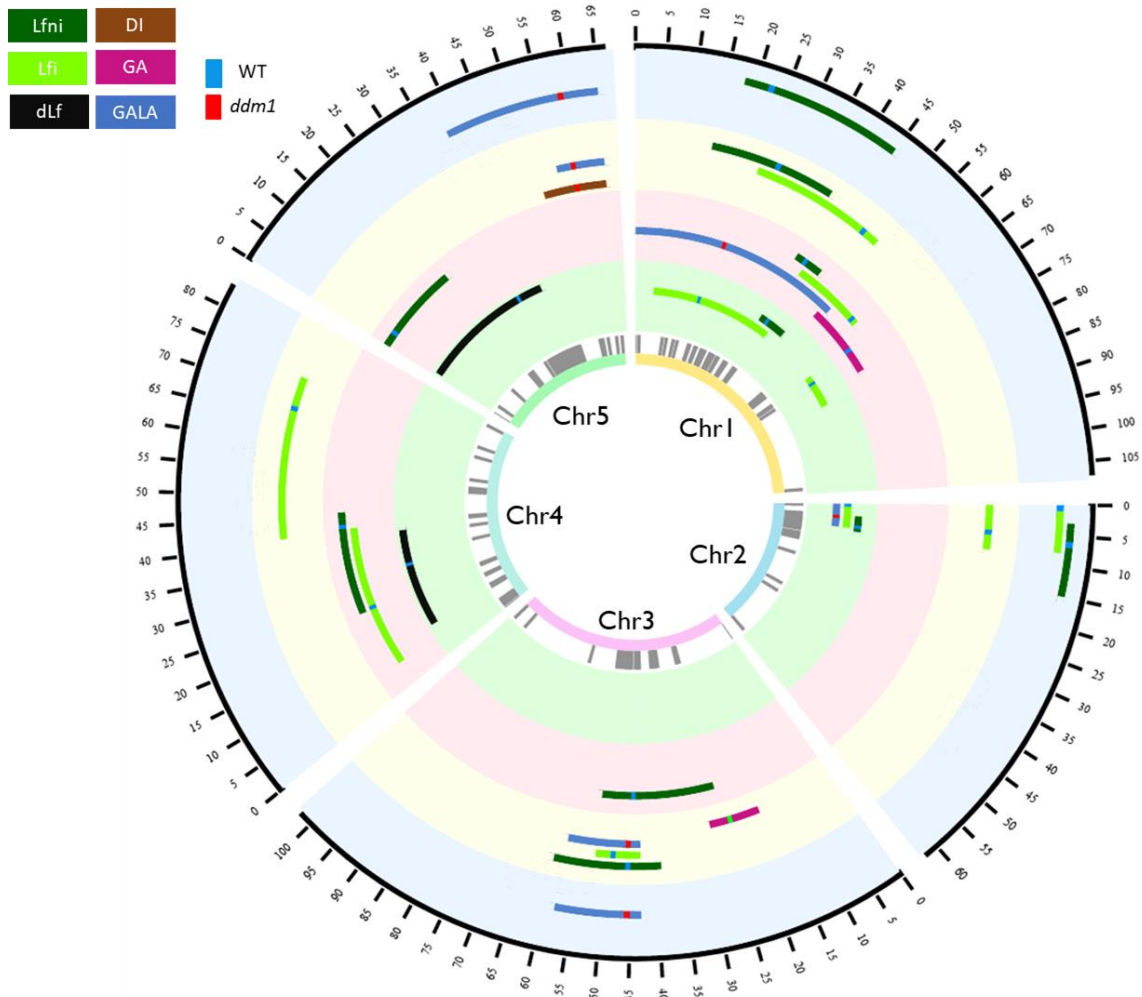


Figure III.2.: Circos representing the QTL^{epi} detected in the epiRIL population phenotyped for response to clubroot under four abiotic conditions. From the inner to the outer circle is given: the chromosome number, the differentially methylated regions used as epimarkers in grey, QTL^{epi} detected for STANDARD condition, QTL^{epi} detected for HEAT condition, QTL^{epi} detected for DROUGHT condition and QTL^{epi} detected for FLOOD condition. The black outer circle represents the position in cM of the epigenetic map. Brown is associated with DI, pink with GA, blue with GALA, lightgreen with Lfi, darkgreen with Lfni and black with dLf variables. When methylation derived from the wild-type Col-0 is associated with higher values of the trait, line at the marker at the peak of QTL^{epi} is green. When hypomethylation derived from the mutant *ddm1-2* is associated with higher values, line at the marker at the peak of QTL^{epi} is red.

The symptoms observed on the differential hosts under HEAT and FLOOD conditions were similar to those observed under STANDARD condition. Under the DROUGHT condition, the differential host set showed a significant reduction in disease symptoms for all susceptible genotypes, with, for example, a reduction of 32% in disease severity for the susceptible control accession ECD5 (Wilcoxon test, $p = 0.0015$) (**Supp. 1. Table 3**).

The response of Col-0 and *ddm1-2* to clubroot was differently influenced by the abiotic factors. While neither FLOOD nor HEAT had a significant impact on the response of Col-0, the DROUGHT condition led to a significant reduction of leaf growth (32% decrease; $p = 0.029$), symptom severity (33% decrease; Kruskal-Wallis, $p = 0.042$) and root biomass (56% decrease; $p = 0.029$) compared to the STANDARD condition. For *ddm1-2*, leaf growth was positively affected by HEAT (increase for Lfi by 53 %; $p = 0.029$), negatively affected by DROUGHT (Lfi reduced by 26 %; $p = 0.029$) and not impacted by FLOOD; both disease severity and gall size were negatively affected by DROUGHT (reduction of DI by 65 %; $p = 0.042$, and GA by 62 %; $p = 0.029$). Only the HEAT condition resulted in a significant reduction in symptom size standardised by leaf growth, as the GALA index was reduced by 46 % ($p = 0.029$) (Supp. Fig. 1).

The response of the epiRIL population to clubroot was also significantly impacted by abiotic factors. Indeed, compared to the STANDARD, the HEAT condition resulted in a significant increase in leaf growth (25% increase in Lfi; $p < 0.001$), gall size (39% increase in GA; $p < 0.001$), and a significant decrease in disease severity and symptom size normalised by leaf growth (DI reduced by 9%, $p < 0.001$, and GALA reduced by 15%; $p < 0.001$) (Figure 1). The DROUGHT and FLOOD conditions resulted in a significant decrease in leaf growth (26% and 16% reduction in Lfi respectively with both $p < 0.001$). DROUGHT led to a significant reduction in disease severity (DI reduced by 36%; $p < 0.001$), gall size (GA reduced by 54%; $p < 0.001$) and symptoms size normalised by leaf growth (GALA reduced by 11%; $p < 0.001$). In the FLOOD condition, galls were significantly smaller (GA reduced by 18%; $p < 0.001$), but disease severity was not affected and symptom size standardised by leaf growth increased significantly (GALA increased by 22%; $p < 0.001$). The disease index variable (DI) did not display much variability across abiotic conditions. In the STANDARD condition, *P. brassicae* significantly reduced leaf growth as dLf was equal to an average of 1.98 +/- 0.52 cm. For the other conditions, however, the impact of the pathogen on leaf growth was almost negligible as dLf was equal to an average of 0.42 +/- 0.45 cm, -0.47 +/- 0.24 cm and -0.03 +/- 0.32 cm for HEAT, DROUGHT and FLOOD, respectively (**Fig. III.1.**).

Table III.2.: Summary table of all the QTL^{epi} detected for STANDARD (green), HEAT (pink), DROUGHT (orange) and FLOOD (blue) conditions. Information given: leaf growth and disease-related traits ordered by alphabetical order, the name of the QTL^{epi} (QTL^{epi} Names), the molecular maker at the peak of the QTL^{epi} (MM), the chromosome (Chr), the confidence interval (CI), the position at the peak marker (Pos, cM), the phenotypic variance explained (Var, R², %), the favourable allele being the allele associated with higher values and the type of QTL^{epi}. The QTL^{epi} were characterised as follow: the QTL^{epi} that are specific to one condition (specific), the QTL^{epi} that have a common confidence interval in at least two conditions (overlap) and the QTL^{epi} that have the same epimarker at their peak (colocalise).

Conditions	Disease Related Traits	QTL ^{epi} Names	MM	Chr	Pos (cM)	Lod	CI (cM)	Var (R ² , %)	Favourable allele	Type of QTL ^{epi}
STANDARD	Lfni	Lfni-Ch1-Standard	MM128	1	48	8.48	42-54	17.38	WT	Overlap
	Lfni	Lfni-Ch2-Standard	MM330	2	7.02	4.28	4.20-9.86	8.09	WT	Colocalise
	Lfi	Lfi-Ch1a-Standard	MM11	1	18.17	3.57	juin-48	8.89	WT	Overlap
	Lfi	Lfi-Ch1b-Standard	MM160	1	70.09	4.242	68.36-78	10.68	WT	Specific
	Lfi	Lfi-Ch2-Standard	MM167	2	0.56	3.88	0-8.72	9.7	WT	Colocalise
	dLf	dLf-Ch5-Standard	MM724	5	34.97	3.99	2-43.98	11.85	WT	Specific
	dLf	dLf-Ch4-Standard	MM686	4	30	4.99	oct-40	15.08	WT	Specific
GALA	GALA-Ch2-Standard	MM171	2	5.33	3.95	0-8	13.74	<i>ddm1-2</i>	Specific	
HEAT	Lfni	Lfni-Ch1-Heat	MM126	1	44.796	8.57	42-48	18.4	WT	Overlap
	Lfni	Lfni-Ch3-Heat	MM418	3	44.366	4.63	26.587-52	9.21	WT	Overlap
	Lfni	Lfni-Ch4-Heat	MM693	4	42.98	4.178	21.47-46	8.25	WT	Specific
	Lfni	Lfni-Ch5-Heat	MM707	5	4	4.64	0-14	9.25	WT	Specific
	Lfi	Lfi-Ch1-Heat	MM147	1	61.2	4.49	44.79-63.46	11.85	WT	Overlap
	Lfi	Lfi-Ch4-Heat	MM679	4	22	3.01	juin-42	7.73	WT	Specific
	GA	GA-Ch1-Heat	MM159	1	68.36	3.95	54-74	13.43	WT	Specific
GALA	GALA-Ch1-Heat	MM12	1	23.79	2.94	0-56	10.2	<i>ddm1-2</i>	Specific	
DROUGHT	Lfni	Lfni-Ch1-Drought	MM25	1	29.04	5.21	16-40	15.84	WT	Specific
	Lfni	Lfni-Ch3-Drought	MM432	3	46.65	4.79	40-60	14.87	WT	Overlap
	Lfi	Lfi-Ch1-Drought	MM128	1	50	4.81	26.68-54	10.41	WT	Overlap
	Lfi	Lfi-Ch2-Drought	MM330	2	7.03	5.74	0-8.72	12.63	WT	Overlap
	Lfi	Lfi-Ch3-Drought	MM515	3	49.46	7.76	44.37-52.26	17.75	WT	Overlap
	Lfi	Lfi-Ch4-Drought	MM701	4	68.33	3	42-74	6.28	WT	Specific
	DI	DI-Ch5-Drought	MM863	5	59.93	2.52	52-65.93	8.13	<i>ddm1-2</i>	Specific
	GA	GA-Ch3-Drought	MM396	3	24	4.43	18-28	13.96	WT	Specific
	GALA	GALA-Ch3-Drought	MM432	3	46.65	4.27	44.37-58	12.54	<i>ddm1-2</i>	Colocalise
GALA	GALA-Ch5-Drought	MM863	5	59.929	3.28	56.45-65.93	9.46	<i>ddm1-2</i>	Colocalise	
FLOOD	Lfni	Lfni-Ch1-Flood	MM11	1	23.23	5.31	18-45.93	13.99	WT	Overlap
	Lfni	Lfni-Ch2-Flood	MM330	2	7.03	3.86	4.21-14.94	9.87	WT	Colocalise
	Lfi	Lfi-Ch2-Flood	MM167	2	0.557	3.58	0-8.72	14.57	WT	Colocalise
	GALA	GALA-Ch3-Flood	MM432	3	46.651	4.77	44.37-58	14.05	<i>ddm1-2</i>	Colocalise
	GALA	GALA-Ch5-Flood	MM863	5	59.93	3.11	39.49-65.93	8.9	<i>ddm1-2</i>	Colocalise

Regardless of the conditions, the positive correlation between leaf growth and gall size was maintained (Pearson $r = 0.6$), highlighting that gall development was not independent of leaf growth, and that the Lfi and GA traits may be under the control of common epigenetic factors (**Supp. Figure 2**). The existence of a positive or negative correlation between variables may depend on abiotic conditions, as illustrated by the correlation between disease index and gall size which was positive under DROUGHT (Pearson $r = 0.39$) and negative under STANDARD (Pearson $r = -0.29$) conditions.

2.3.3. The epigenetic architecture controlling the response of epiRIL to clubroot is modified by abiotic constraints

For all abiotic conditions, the distributions of disease-related variables were continuous, suggesting a poly-epigenetic control of all traits (**Supp. Figure 1**). Broad-sense heritability values ranged from moderate to high (**Table III.1.**), indicating that most part of phenotypic variation observed was explained by the epigenotype. Twenty-three QTL^{epi} were detected for all abiotic conditions and all traits, but two of them were eliminated because the closest genetic variants had a significantly larger effect than the epigenetic markers at the QTL^{epi} peak (Supp. Table 2). Twenty-one moderate-effect QTL^{epi} were then considered *bona fide* epigenetic QTL controlling plant response to clubroot in all conditions (**Supp. Table 2**). The number of QTL^{epi} detected for each condition was different: 6 QTL^{epi} were detected for STANDARD, 4 for HEAT, 8 for DROUGHT, and 3 for FLOOD (Figure 2). Very few QTL^{epi} were detected for the variables dLf (two QTL^{epi} detected under STANDARD condition) and DI (one QTL^{epi} detected in DROUGHT condition), which is consistent with the low phenotypic variability observed for these two traits in the epiRIL population. Regardless of the abiotic conditions, the epiRIL carrying the hypomethylated allele derived from *ddm1-2* showed greater symptoms standardised by leaf growth (higher GALA) and greater disease severity (higher DI) while displaying smaller rosettes (smaller Lfi). With the exception of two QTL^{epi} (Lfi-Ch1b-STANDARD and Lfi-Ch4-DROUGHT), all Lfi QTL^{epi} overlapped (*i.e.* they shared most of their confidence interval) with QTL^{epi} detected for Lfni. Further details on the QTL^{epi} localisations and confidence intervals are given in **Table III.2**.

Eight QTL^{epi} colocalised (we considered that 2 QTL colocalised when they had the same epigenetic marker at the peak of the QTL) and ten QTL^{epi} overlapped between at least two abiotic conditions. (**Table III.2**).

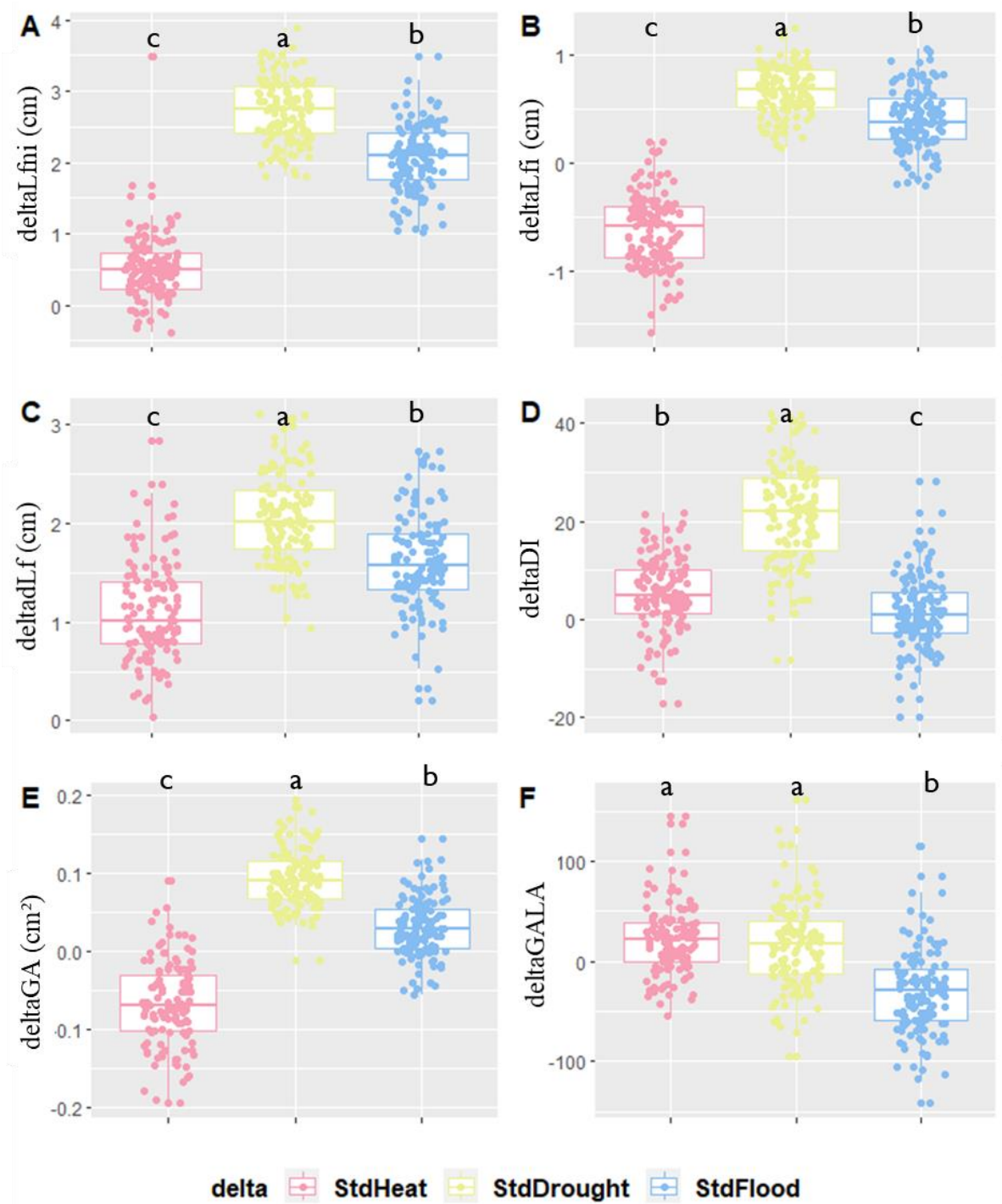


Figure III.3.: Phenotypic plasticity calculated as the difference between the value of each trait evaluated under STANDARD conditions and that assessed under one of the three other conditions HEAT, DROUGHT or FLOOD. Differences between STANDARD and HEAT (pink), STANDARD and DROUGHT (yellow) or STANDARD and FLOOD (blue) for each trait for A) deltaLfni, B) deltaLfi, C) deltadLf, D) deltaDI, E) deltaGA and F) deltaGALA variables. Significant differences for each deltatrait between conditions are given by different letters obtained by a Kruskal-Wallis test, p -value < 0.05.

Some of the QTL^{epi} detected under the STANDARD condition were also detected in other conditions, in particular for Lfi, in two genomic regions located on chromosomes 1 and 2. Other QTL^{epi}, not detected in STANDARD, were found in at least two abiotic conditions, in particular for GALA for which 4 QTL^{epi} colocalised between DROUGHT and FLOOD on chromosomes 3 and 5. Finally, 13 QTL^{epi} were specific to one abiotic condition. For Lfi, one QTL^{epi} on chromosome 1 was specific to STANDARD, two on chromosomes 3 and 4 were specific to DROUGHT and one on chromosome 4 was specific to HEAT. For GA, two QTL^{epi} were specific to HEAT and DROUGHT on chromosomes 1 and 3, respectively. For GALA, two QTL^{epi} were specific to HEAT and STANDARD on chromosomes 1 and 2, respectively. For DI, one QTL^{epi} on chromosome 5 was specific to DROUGHT.

2.3.4. Epigenetic factors involved in the control of phenotypic plasticity

We examined in more detail the phenotypic plasticity observed within the epiRIL population between STANDARD and the other three abiotic conditions, that is to say the ability of an epigenotype to modulate its phenotype as a function of the environment. Plasticity was estimated by the difference between the value of each trait obtained under the STANDARD condition and that obtained under another abiotic condition. For each trait, the correlation between conditions was assessed. For the GALA index a correlation of 1 was observed between DROUGHT and FLOOD conditions. For the other traits, the correlation coefficients between the conditions ranged from 0.282 to 0.689 (**Supp. Figure 3**).

EpiRIL responded differently to clubroot depending on abiotic conditions

The two parental lines did not show similar phenotypic plasticity, neither for phenotypic traits nor between abiotic conditions (Supp. Figure 4). With respect to all deltaTraits, Col-0 and *ddm1-2* showed similar plasticity in HEAT conditions (mean of absolute delta = 22 +/- 16.89 for StdHeat and 31 +/- 18.88, respectively). Under DROUGHT condition, both *ddm1-2* (mean delta= 39 +/- 23.84 for StdDrought) and Col-0 (mean delta = 59 +/- 43.33 for StdDrought) showed great phenotypic plasticity except for deltaGALA for which values ranges from 10.8 to 14.4. For FLOOD, Col-0 displayed greater phenotypic plasticity (mean absolute delta = 41 +/- 30.74 for StdFlood) than *ddm1-2* (mean delta = 18 +/- 13.33 for StdFlood). The influence of abiotic factors on the response of the epiRIL population to clubroot was not the same under all conditions (**Fig. III. 3**).

For $\Delta Lfni$, ΔLfi and ΔdLf , low phenotypic plasticity was observed when comparing STANDARD and HEAT whereas high plasticity was found under StdDrought and StdFlood, (**Figure III. 3A to 3C.**). For ΔDI and ΔGA , phenotypic plasticity was high for StdDrought and low for StdHeat and StdFlood (**Fig. III. 3D.and 3E.**). For $\Delta GALA$, plasticity was low for StdHeat and StdDrought and high for StdFlood (**Fig. III.3.F.**).

In order to find lines that were phenotypically more stable ($\Delta Traits$ close to 0) or more plastic (high absolute values of $\Delta Traits$) in their response to *P. brassicae* regardless of abiotic conditions, principal component analysis (PCA) and *K-means* clusterisation were achieved using $\Delta Traits$ calculated between STANDARD and HEAT, DROUGHT and FLOOD (Figure 4A. 4B.). To facilitate the analysis and retain epiRIL with extreme phenotypes, the best quality epiRIL on the PCA were retained (square cosine >0.4). For each abiotic trait, correlation between SdtHeat, StdDrought and StdFlood was observed (**Fig. III.4.A**). The first principal component was explained by $\Delta Lfni$ and ΔdLf while the second principal component was mainly explained by ΔLfi and ΔGA . Ninety-one lines were kept and spread within three clusters (**Figure III. 4.B**). EpiRIL in the first cluster displayed less plasticity regardless of the trait than the lines in the two other clusters, while lines in the second cluster displayed higher plasticity for GA and Lfi and lines in the third cluster showed higher plasticity for dLf, Lfni and GALA.

For each $\Delta Trait$, the observed phenotypic plasticity varied moderately between abiotic conditions according to the $\Delta Traits$. For $\Delta Lfni$, for example, lines belonging to the first cluster were less plastic for all abiotic conditions. For ΔLfi , lines belonging to the second cluster were less plastic under StdHeat whereas for StdFlood and StdDrought, the less plastic lines belonged to the third cluster (**Supp. Figure 5**).

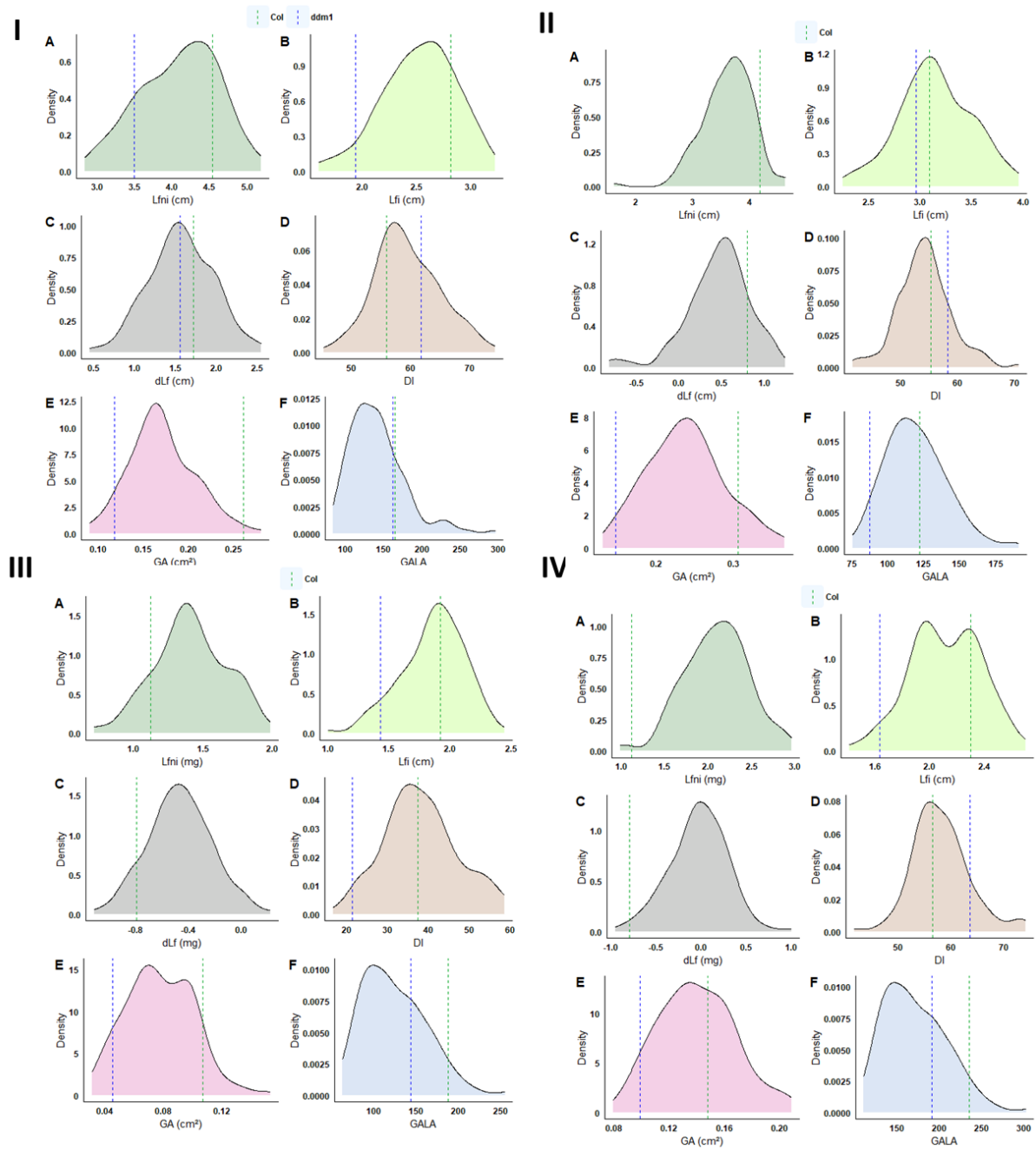
Phenotypic plasticity in the epiRIL clubroot response is partly controlled by epigenetic factors

The distributions of all $\Delta Traits$ were continuous in the epiRIL population (Supp. Figure 4). Ten moderate effect QTL^{epi} were found to control phenotypic plasticity (Table 3) and all were *bona fide* QTL^{epi} (**Supp. Table 4.**).

No QTL^{epi} were detected for StdFlood. One QTL^{epi} was detected for DI plasticity between STANDARD and HEAT and one for Lfi and Lfni plasticity between STANDARD and DROUGHT; three QTL^{epi} were detected for GALA plasticity between STANDARD and HEAT and four QTL^{epi} were detected for GALA plasticity between STANDARD and DROUGHT. An epistatic interaction was found between two QTL^{epi} controlling GALA plasticity under HEAT on chromosome 1 and 5 (**Table. III.3.**). EpiRIL carrying a Col-0 derived hypermethylation allele showed lower deltaGALA and deltaDI for StdHeat while displaying higher deltaLfni, deltaLfi and deltaGALA for three out of four QTL^{epi} for StdDrought (Supp. Figure 6). For StdDrought, similar epigenetic control was observed for Lfi, Lfni and deltaLfi, deltaLfni. Indeed, all QTL^{epi} detected for deltaLfi and deltaLfni overlapped with QTL^{epi} detected previously for Lfni and Lfi. For deltaGALA, four out of seven QTL^{epi} detected overlapped with QTL^{epi} detected for GALA. No QTL^{epi} detected for deltaDI overlapped with QTL^{epi} detected for DI (Supp. Figure 7). Explained phenotypic variability by the detected QTL^{epi} was similar for Lfni/deltaLfi and Lfi/deltaLfi (R^2 Lfi = 16.8 +/- 0.8; R^2 Lfni = 9.9 +/- 0.8; R^2 deltaLfi = 9.55 et R^2 deltaLfni = 17.12) as well as for GALA (R^2 = 18.84 +/- 2.5) and deltaGALA (15.63 +/- 8.1).

2.4. Discussion

In the present study, we investigated the impact of three abiotic conditions on the response of *A. thaliana* against the protist *P. brassicae* and to what extent the epigenetic control of *Arabidopsis* response to clubroot was impacted by these abiotic conditions. To that aim, the epiRIL population of Johannes et al. (2009) was phenotyped under three abiotic conditions never before studied for this population: a punctual and moderate rise of temperature, a drought or a flooding. These abiotic conditions led to a significant modification in *Arabidopsis* leaf growth, its response to clubroot and the epigenetic factors controlling these traits. This work also enabled the identification of QTL^{epi} underlying the plastic response of *A. thaliana* to clubroot, which depended on the phenotypic traits assessed and the abiotic conditions. This study allowed to extend our knowledge on the impact of abiotic conditions on the epigenetic factors controlling both plant responses to biotic and abiotic stresses and phenotypic plasticity.

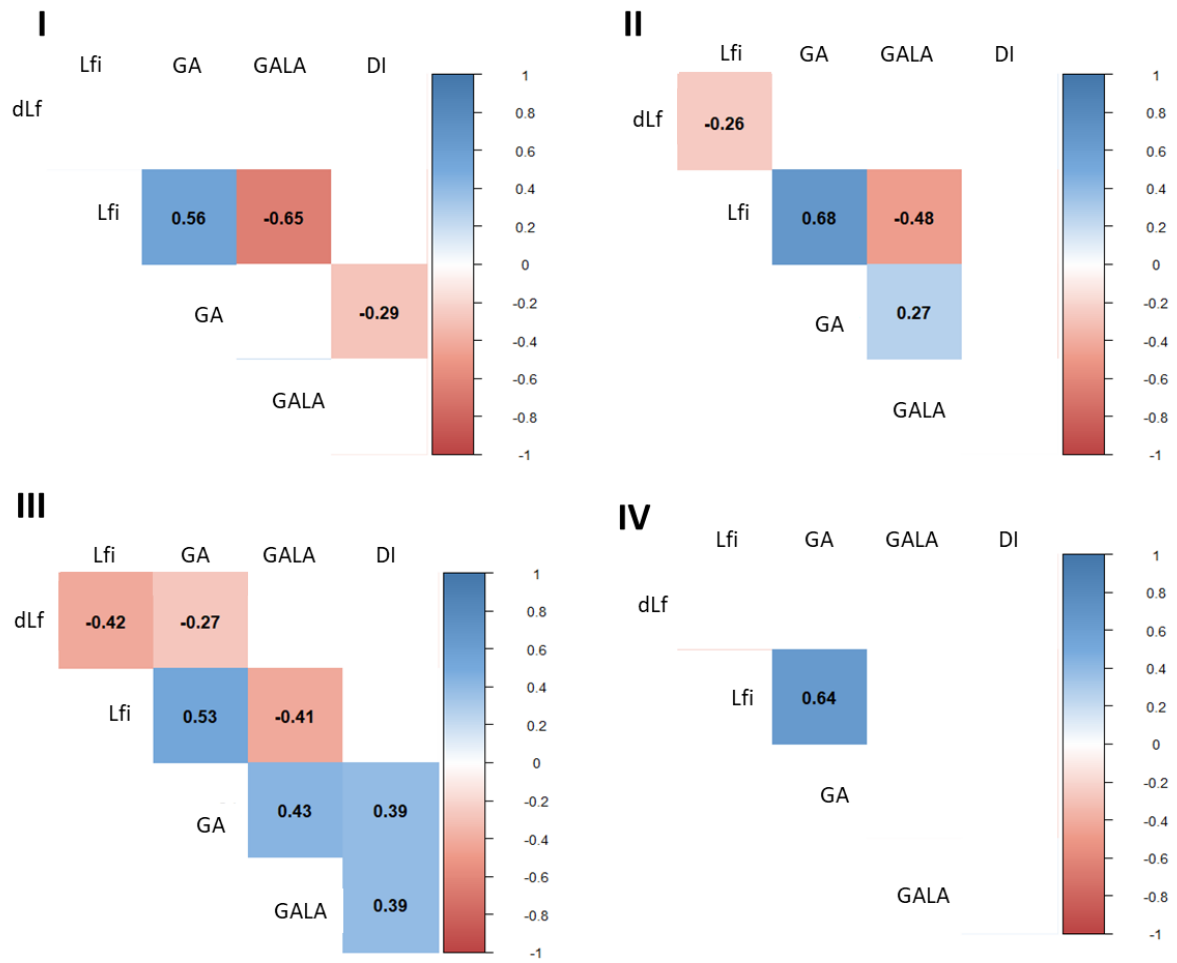


Supp Figure 1: Distributions of developmental and disease-related traits under I) STANDARD, II) HEAT, III) DROUGHT and IV) FLOODING conditions with A) Lfni, B) Lfi, C) dLf D) DI, E) GA and F) GALA. Green and blue dashed lines correspond to the phenotypic values of the parental lines Col-0 and *ddm1-2*, respectively.

Five to ten QTL^{epi} per condition and one to ten QTL^{epi} per trait were identified as involved in *A. thaliana* response to clubroot under the four different abiotic conditions. This small number of QTL^{epi} can be explained by the lack of phenotypic variability observed for disease-related traits. Indeed, the 123 epiRIL studied were selected by Colome-Tatche et al. (2012) for their contrasted morphological traits and not for their response to pathogens. The small size of the epiRIL population (123 lines), the low number of epigenetic markers available (126 markers) and the bias in the segregation of the Col-0 (73%) and *ddm1-2* (27%) epialleles may also have led to a lack of power in the linkage analyses.

Furthermore, the length of the longest leaf in each rosette was the only proxy used to estimate leaf growth, other criteria, such as leaf mass, leaf area, or even photosynthetic ratio per leaf area, were not taken into account. According to Weraduwage et al. (2015), the relationship between leaf area growth and plant growth is not necessarily linear as it depends on carbon distribution in the plant tissues. This suggested that the use of the Lfni variable cannot reflect alone the complexity of leaf growth. For example, Kooke et al. (2015) evaluated the impact of salt stress on *Arabidopsis* development using several variables such as relative growth rate (RGR), leaf area at 20 days (LA20) and total plant height (TPH). Despite these limitations, measuring the length of the longest leaf enabled us to detect differences between conditions. The reduction in leaf size between the STANDARD and the other conditions also allowed to validate that the plants perceived the constraints applied.

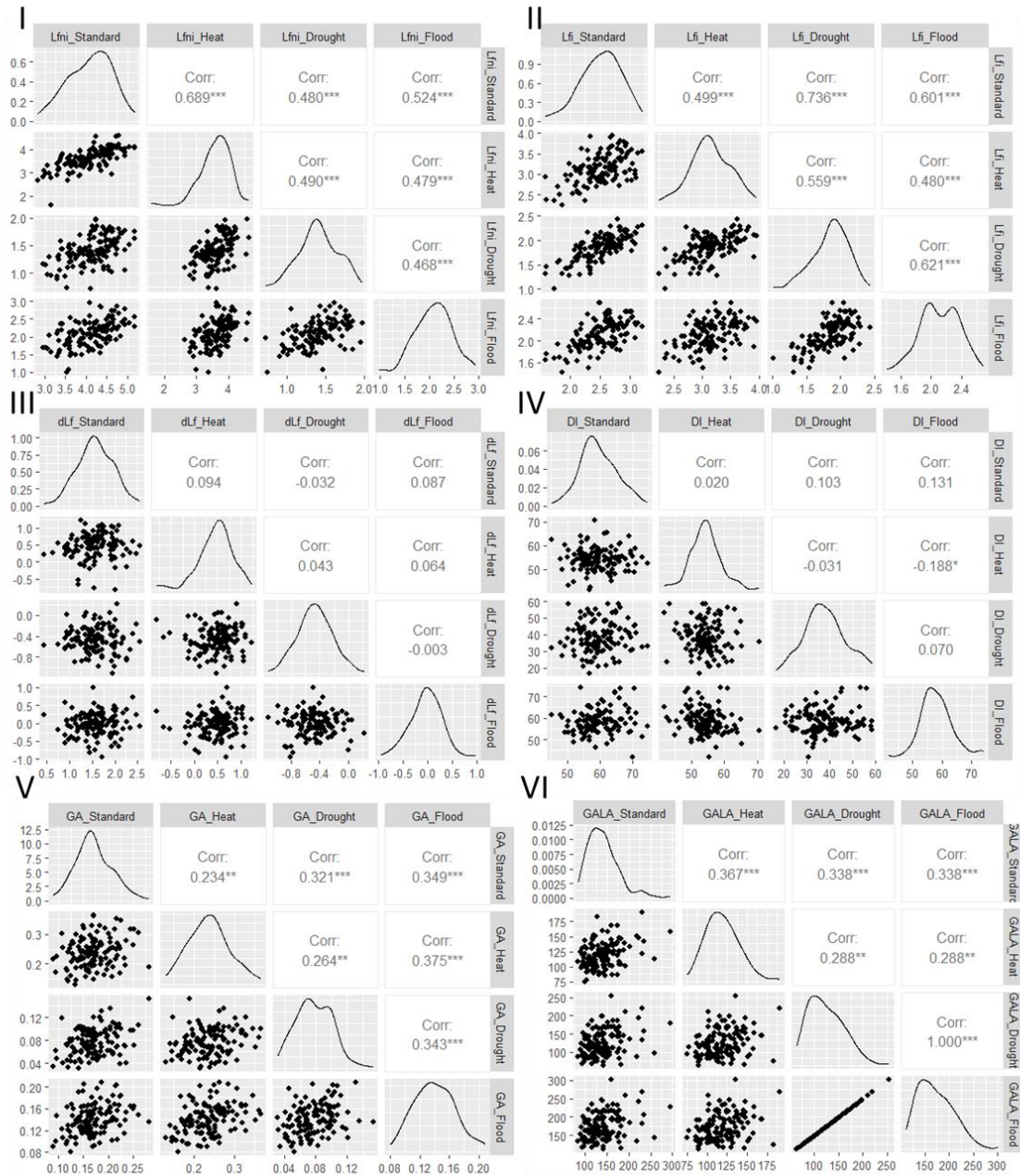
The small number of QTL^{epi} detected within our study is coherent with the low number of QTL^{epi} detected by Kooke et al. (2015) using the same epiRIL population tested under saline conditions. For example, leaf area at 20 days (LA20) was controlled by five and four QTL^{epi} under control and saline conditions, respectively. Furthermore, the epigenetic markers (MM11, MM160) at the peak of two of the five QTL^{epi} detected in our study controlling leaf growth (Lfni and Lfi) were also those detected at the peak of the QTL^{epi} in the study of Kooke et al. (2015). This may suggest that plant development was controlled by common epigenetic factors regardless of abiotic conditions. The lines carrying the hypomethylated allele were smaller than the lines carrying the hypermethylated allele for most leaf growth QTL^{epi}, which is consistent with the growth abnormalities observed for the homozygous *ddm1-2* mutant (Kakutani *et al.*, 1996).



Supp Figure 2: Correlations between all traits for each condition in I) STANDARD, II) HEAT, III) DROUGHT and IV) FLOOD conditions. Only the significant correlations are presented with p -value<0.05.

The abiotic constraints applied were chosen according to the characteristics and needs of both *A. thaliana* and the pathogen *P. brassicae*. Only a moderate drought was thus applied as the zoospores of *P. brassicae* require high soil moisture to move and properly infect the plants (Aist & Williams, 1971; Iwama *et al.*, 1994). Although the plant displayed reduced leaf growth, no wilting was observed confirming that the drought applied is a moderate constraint for the plant (Bac-Molenaar *et al.*, 2016). A previous study also demonstrated that soil water content, and more particularly flooding during 14 days, had an impact on both the outcome of the infection and the genetic factors involved in plant response to clubroot (Gravot *et al.*, 2016a). We applied a FLOOD constraint of only seven days in contrast to Gravot *et al.* (2016) which led to a reduction in leaf growth and an enhanced production of anthocyanins, suggesting a plant response to oxidative stress caused by the water excess (Nakabayashi *et al.*, 2014; Savchenko *et al.*, 2019). Finally, the increase of 5°C for 7 days, which also led to a reduction of leaf growth, corresponds to a warm ambient temperature as described in Sriden and Charoensawan (2022) and is in accordance with the worst-case climate change scenario, which estimates for 2100 an increase of more than 4°C (IPCC, 2023).

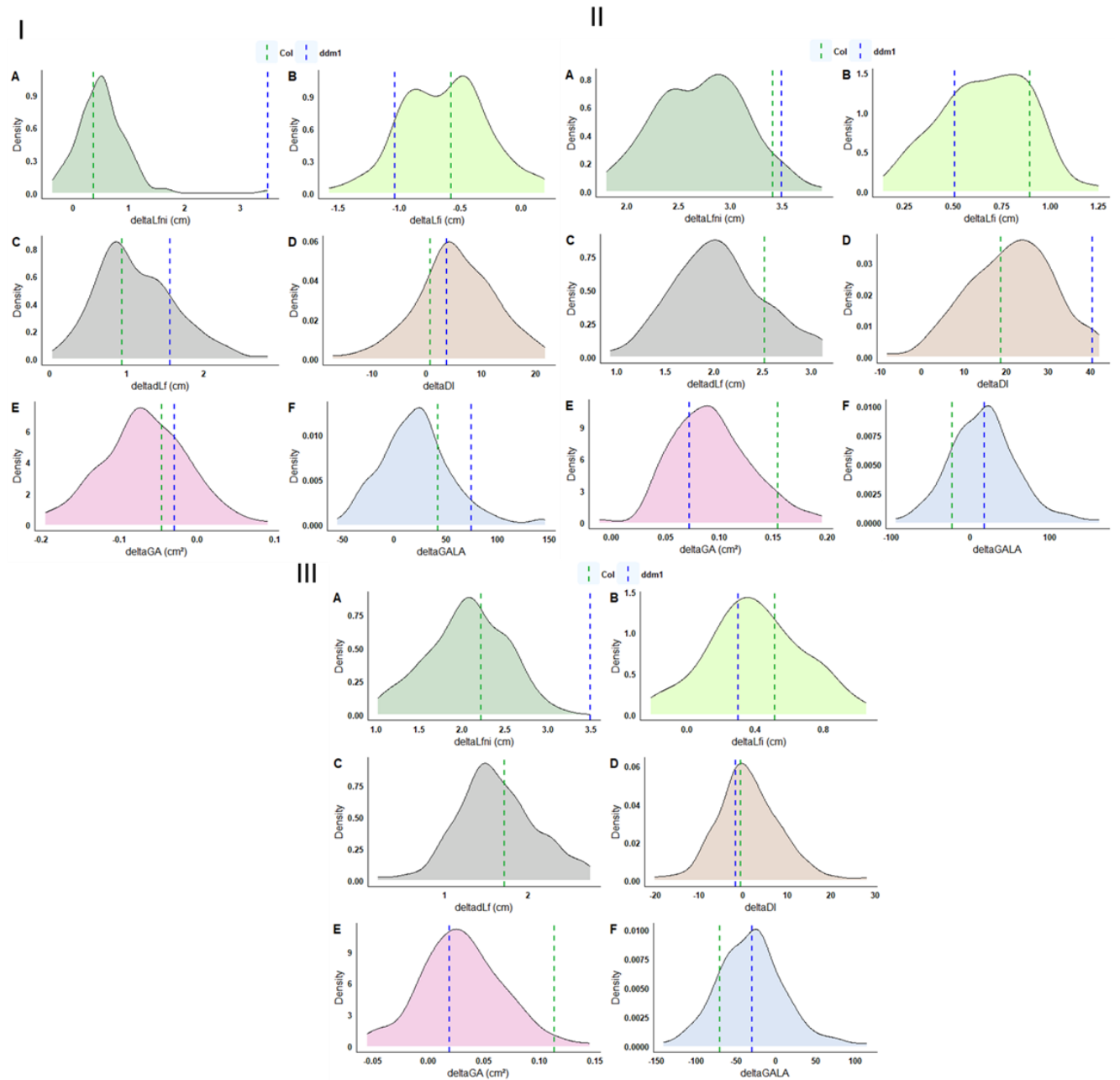
Comparison of the results obtained with literature data is complicated due to the diversity of conditions under which abiotic stresses were exerted in terms of duration, intensity and time of application as well as the sequential or concomitant application of these stresses. In our study, increasing temperature to 27°C during the day and 22°C at night, for 7 days, led to a significant decrease in leaf growth. A temperature of 28°C had a significant negative effect on the total biomass of *Arabidopsis* (Jin *et al.*, 2011) with a bigger hypocotyl and reduced developmental time (Hwang *et al.*, 2017; Ibañez *et al.*, 2017). Decreased plant growth, flowering time and yield are commonly observed for several crops, such as wheat or oilseed rape at 29.5°C (Morrison & Stewart, 2002; Mondal *et al.*, 2013). DROUGHT and FLOOD conditions also led to a significant decrease in leaf growth in our study. Drought caused a reduction in leaf size in *Medicago sativa* (Quan *et al.*, 2016), *B. napus* (Batool *et al.*, 2023) and *A. thaliana* (Tisné *et al.*, 2013; Bac-Molenaar *et al.*, 2016, p.) as flooding in *A. thaliana* (Pigliucci, 2002). Concerning the epigenetic architecture controlling response to HEAT, DROUGHT and FLOOD, we have detected a maximum of ten moderate-effect QTL^{epi} (R² between 8 and 20%). A small number of moderate-effect QTL have also been found to control plant response to water deficit (Tisné *et al.*, 2013), as well as major genes in the control of plant tolerance to flooding (Akman *et al.*, 2017) or drought (Marchadier *et al.*, 2019).



Supp Figure 3: Correlations between all conditions for each trait with I) Lfni, II) Lfi, III) dLf, IV) DI, V) and VI) GALA.

Depending on the sources of resistance and the isolates studied, clubroot resistance in *Brassicaceae* is controlled by a few major resistance loci (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000a; Laperche *et al.*, 2017; Aigu *et al.*, 2018) or a small number of QTL/QTL^{epi} with moderate effects (Rocherieux *et al.*, 2004; Liégard *et al.*, 2019a), as in the present study. The epiRIL population was phenotyped for response against *Hyaloperonospora arabidopsidis*, a downy mildew pathogen of *Arabidopsis*, (Furci *et al.*, 2019), but no QTL^{epi} was detected in common between our two studies, suggesting that the epigenetic factors involved in plant response to biotic stresses are pathogen-specific. It would be interesting to study the epigenetic determinism of the epiRIL response to other isolates of *P. brassicae* and other pathogens, in order to determine the specificity of the detected epigenetic factors and their interest in the control of immunity in *Arabidopsis*.

For the first time, the impact of three abiotic constraints was studied on plant clubroot response and the underlying epigenetic factors controlling these traits using the epiRIL population. The importance of taking environmental factors into account for studying plant resistance to biotic attacks was highlighted in the 60's (Walker, 1965), but to date no trend could be drawn as the impact of abiotic factors on plant response to pathogens is complex. Indeed, the outcome of the plant-pathogen interaction depends on the plant, the pathogen, as well as the environment and the duration and the way in which the abiotic constraints are applied (Velásquez *et al.*, 2018; Desaint *et al.*, 2021; Zandalinas and Mittler, 2022). Under combined abiotic constraints, the plant physiological response observed is different than the response observed under one stress (Suzuki *et al.*, 2014). Assessing the impact of combined biotic and abiotic stress is all the more complex as the pathogen can also be impacted by the abiotic stress (Pandey *et al.*, 2015). For instance, the temperature of 27°C that we used in the HEAT condition is above the optimum temperature for growth of *P. brassicae* which is 25°C (Sharma *et al.* 2011a); similarly DROUGHT conditions may have impaired *P. brassicae* life cycle (infection of the cortex cells by the secondary spores), as both the epiRIL population and the susceptible *Brassica* ECD5 showed lower susceptibility. This lower susceptibility to clubroot may indeed be explained by a lower infection of plants by *P. brassicae* due to the poor survival and/or motility of zoospores in a dry environment (Aist & Williams, 1971; Iwama *et al.*, 1994) but also by the obligatory biotrophic nature of *P. brassicae*, whose development therefore depends on that of its host plant (Schwelm *et al.*, 2016; Rolfe *et al.*, 2016).

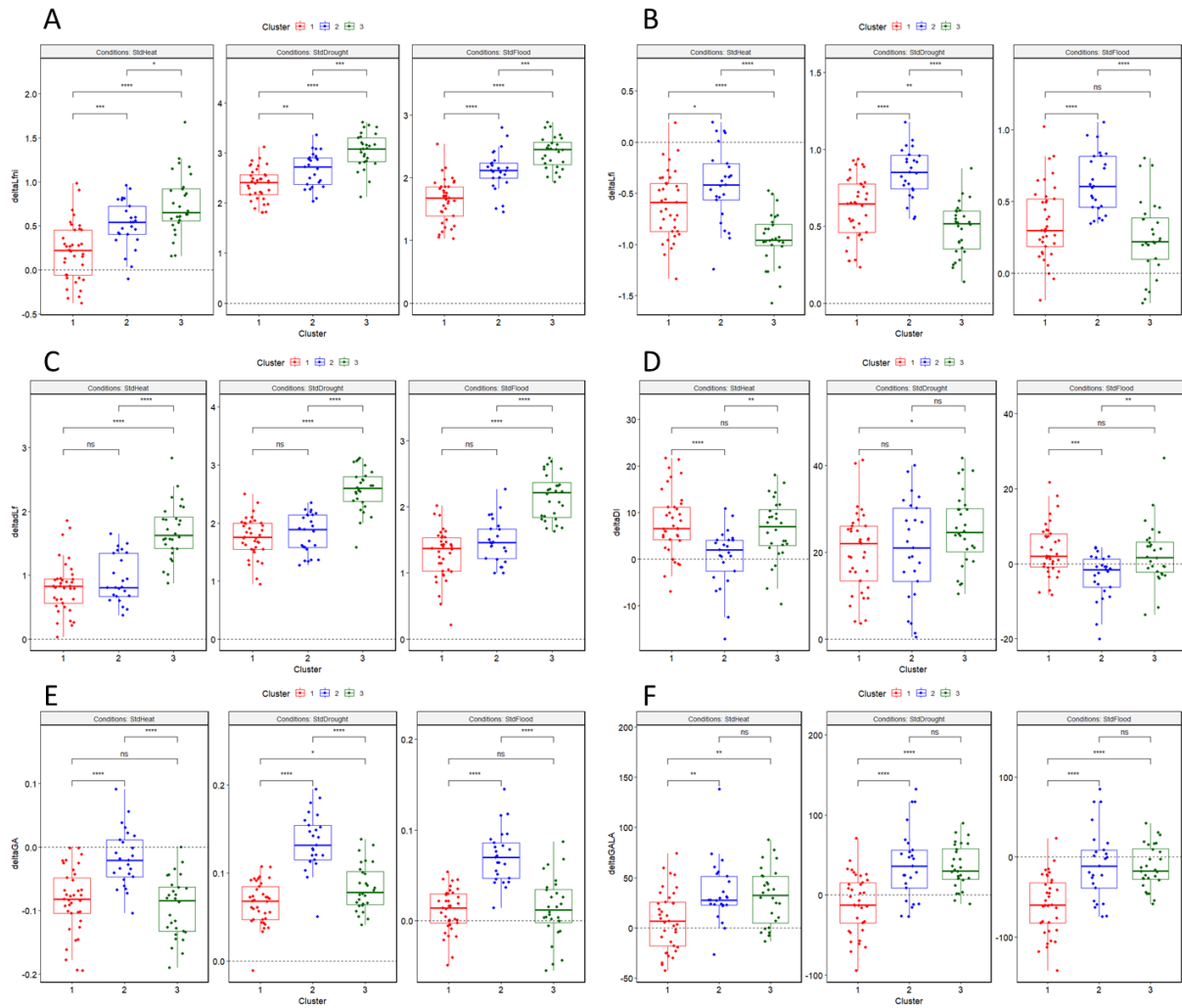


Supp Figure 4: Distributions of A) deltaLfni, B) deltadLf, C) deltaLfi, D) deltaDI, E) deltaGA and F) deltaGALA for the comparisons between I) STANDARD and HEAT, II) STANDARD and DROUGHT and III) STANDARD and FLOOD. Green and blue dashed lines correspond to the phenotypical values of the parental lines Col-0 and *ddm1-2*, respectively.

Depending on the abiotic constraints, their application and the pathosystem, abiotic constraints can lead to a decrease or an increase in symptoms. Under drought, a decrease in tomato grey mould infection (Achuo *et al.*, 2006) and an increase in the susceptibility of common bean to charcoal rot disease (Mayek-Pérez *et al.*, 2002) were observed. Taken together, these results strongly highlight the importance and complexity of the impact of abiotic factors on plant-pathogen interactions, since abiotic factors can impair the development of both plants and pathogens and their interaction.

Epigenetic factors controlling response to clubroot were specific to one or several abiotic conditions. We were able to detect 18 QTL^{epi} common to at least two abiotic conditions and 11 QTL^{epi} specific to the abiotic condition applied, suggesting that the epigenetic architecture controlling response to clubroot includes both QTL^{epi} stable regardless of the abiotic conditions and QTL^{epi} specific to each abiotic condition. We cannot compare these results to the literature because, to our knowledge, no other work has been conducted on the impact of abiotic factors on the epigenetic architecture controlling plant response to biotic stresses. However, in several works dealing with genetic control of resistance, the same genetic factors of resistance were detected under different abiotic conditions. In a previous study, we showed that two resistance QTL to clubroot were systematically detected regardless of the nitrogen supply but had a different effect depending on the nutritional constraint (Laperche *et al.* 2017). Galiano-Carneiro *et al.* (2021) reported the stability of genetic factors involved in corn resistance to leaf blight across multi-environmental conditions. On the contrary, in *A. thaliana* new resistance QTL to *Ralstonia solanacearum* were detected under conditions of increased temperature (Aoun *et al.*, 2017). All QTL^{epi} detected in all conditions in our study displayed similar moderate effect. However, we cannot completely exclude the possibility of modulation of the QTL^{epi} effect by abiotic constraints, since the lack of detection power in the epiRIL population could prevent the detection of weak-effect QTL^{epi}. Thus, QTL^{epi} qualified as specific must therefore be taken with caution and additional work is necessary to evaluate and confirm their specificity. Only single abiotic constraints were assessed in this work, but studying the combined effect of several abiotic stresses or with a different application time, on the resistance to a pathogen could allow to better understand the plant response to real and fluctuating environmental constraints.

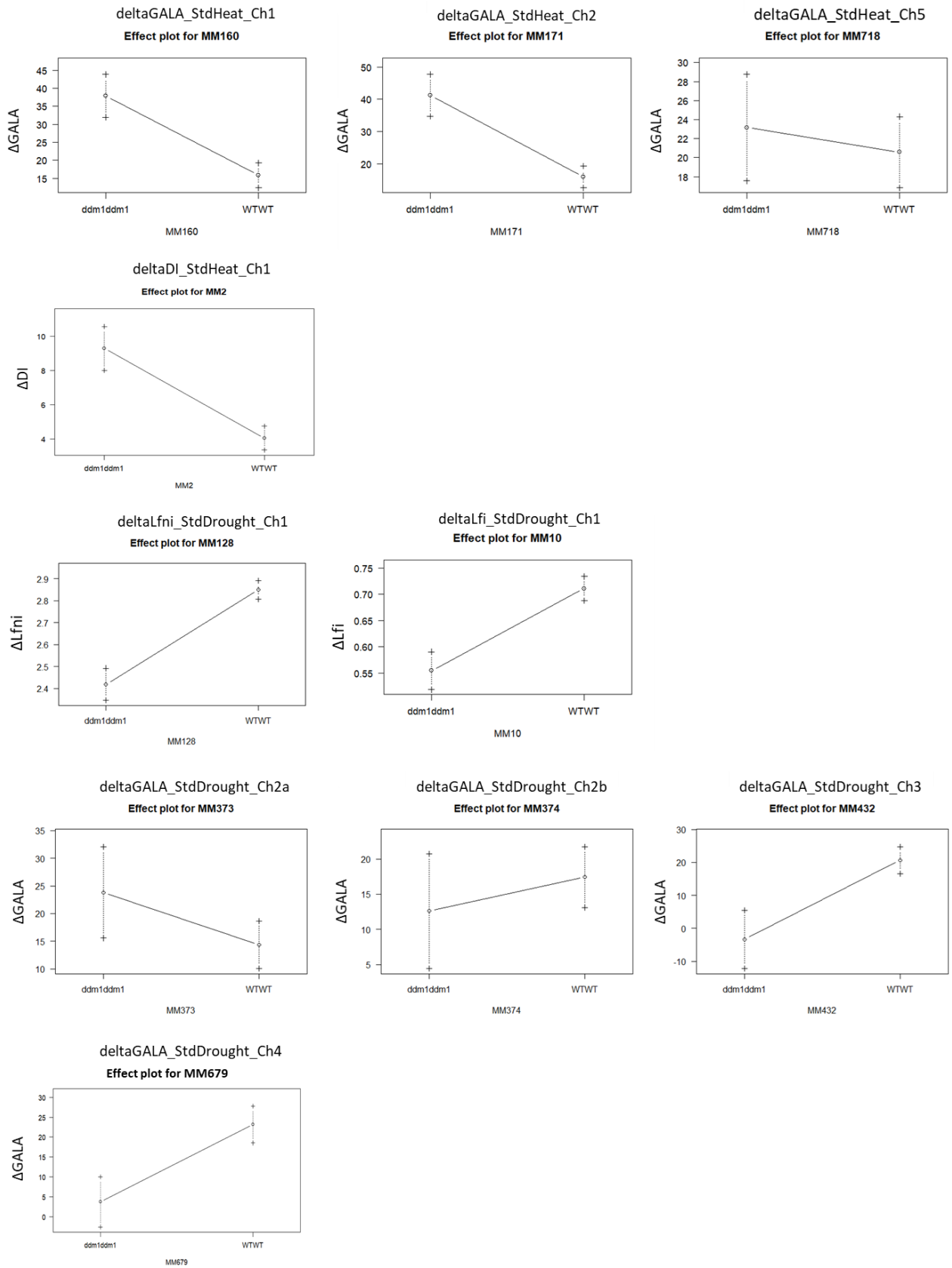
The majority of QTL^{epi} were located within the pericentromeric regions of *Arabidopsis* chromosomes, most likely due to the involvement of *DDMI* in maintaining transposable element methylation (Cortijo *et al.*, 2014a) in the pericentromeric regions.



Supp Figure 5: Boxplots displaying values for 91 epiRIL displaying a $\cos^2 > 0.4$) with A) deltaL_{fni}, B) deltaL_{fi}, C) deltaL_f, D) deltaDI, E) deltaGA and F) deltaGALA for the StdHeat, StdDrought and StdFlood. Cluster 1 is in red, cluster 2 is in blue and cluster 3 is in green.

However, three QTL^{epi} (GALA-Ch5-DROUGH, GALA-Ch5-FLOOD and DI-Chr5-DROUGHT) were also identified outside these regions. These QTL^{epi} overlapped with *Pb-At5.2*, a QTL previously detected by Jubault et al. (2008) using a RIL population from the cross Col-0 x Bur-0, and whose effect was modulated by the water irrigation regime (Gravot *et al.*, 2016a). *Pb-At5.2* QTL fine-mapping led to the identification of two causal NLR genes *AT5G47260* and *AT5G47280* controlled by a natural epimutation (Liégard *et al.*, 2019b). However, because these *AT5G47260* / *AT5G47280* genes are 500 kbp distant from the MM863 epimarker at the peak of the three QTL^{epi}, and of a large number of genes in the QTL^{epi} confidence interval (more than 900 genes) we not allow us to conclude whether or not it is the same causal gene(s). The QTL^{epi} at the end of chromosome 5 also overlapped with a QTL^{epi} at the epimarker 859 controlling short chains glucosinolate levels (Aller *et al.*, 2018), even if no candidate gene involved in glucosinolate biosynthesis pathway was found in the QTL^{epi} detected by Aller et al. (2018). Further work is therefore needed to identified the causal genes underlying these QTL^{epi}.

Phenotypic plasticity was assessed as the ability of individual epiRIL to modulate their phenotype according to environmental conditions (Bradshaw, 1965). For each genotype, plasticity was found to be dependent on both the abiotic conditions applied and the traits assessed. Phenotypic plasticity was brought depending on the traits observed by both hyper- and hypomethylated alleles, while previous work on saline stress associated more plasticity with the lines carrying the hypermethylated allele at the epigenetic marker of the QTL^{epi} (Kooke *et al.*, 2015). While the QTL^{epi} controlling developmental plasticity overlapped with the QTL^{epi} detected for the developmental trait (leaf length), the QTL^{epi} controlling the disease-related trait plasticity were different from that controlling the associated phenotypic trait, suggesting that different factors are involved in the control of plasticity and their related traits. In *A. thaliana*, in a recent study identifying the genetic factors controlling flower-size plasticity at different temperatures, the authors also showed that the genetic control of the plasticity differed from the control of flower-size itself (Wiszniewski *et al.*, 2022). The specificity of QTL controlling phenotypic plasticity has also been observed in crops, such as tomato (Diouf *et al.*, 2020; Bineau *et al.*, 2021) and maize (Kusmec *et al.*, 2017). If minimising the interaction between the epigenotype and the environment would assure a stable resistance in several environmental conditions, looking for lines particularly plastic for one condition could also be relevant in plant breeding.



Supp Figure 6: Effect plots for each QTL^{epi} detected for deltatrait.

While the control of disease resistance traits by transgenerational epimutations has already been demonstrated (Furci *et al.*, 2019; Liégard *et al.*, 2019b), our study reported for the first time the modulation by environmental conditions of epigenetic factors conferring partial clubroot resistance in *A. thaliana*. We have shown an epigenetic control of the phenotypic variability under all constraint conditions. Epigenetic factors that control plant response to biotic stress could therefore be used as a new source of resistance epialleles in crops in the context of climate change (Gahlaut *et al.*, 2020b; Dalakouras & Vlachostergios, 2021). The role of heritable DNA methylation in the control of complex traits was already shown in crops of high agronomical interest such as *Brassica* (Long *et al.*, 2011), or trees like *Populus* (Lu *et al.*, 2020). The search for epimutations associated with clubroot resistance in *Brassica* crops could help to better understand the involvement of epigenetic factors in plant immunity. Taken together, all these results open the prospect of using epigenetic factors in plant breeding.

2.5. Acknowledgements

We acknowledge our IGEPP Colleagues for their technical support and the Biological Resource Centers BrACySol and Versailles Arabidopsis Stock Center for providing *Brassica* and epiRIL seeds, respectively. This research was supported by L'Institut Agro Rennes-Angers, INRAE and Université de Rennes. Mathilde Petitpas was a PhD student co-funded by INRAE BAP department and Brittany Region.

2.6. Author contributions

MP, RL, MLD, MJ, JL and CLar carried out the experiments and collected the data; MP, RL, MLD, JL and CLar carried out the molecular biology work; MP carried out the genetic analyses and the bioinformatics analyses; CLan help with the monitoring of the experiment; MP, MJM-D and MJ wrote the article and MP, MJM-D and MJ designed and coordinated the study.

2.7. Bibliography

- Achuo, E. A., Prinsen, E., and Hofte, 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. doi: 10.1111/j.1365-3059.2006.01340.x.
- Aigu, Y., Laperche, A., Mendes, J., Lariagon, C., Guichard, S., Gravot, A., et al. (2018). Nitrogen supply exerts a major/minor switch between two QTLs controlling *Plasmodiophora brassicae* spore content in rapeseed. *Plant Pathol* 67, 1574–1581. doi: 10.1111/ppa.12867.
- Aist, J. R., and Williams, P. H. (1971). The cytology and kinetics of cabbage root hair penetration by *Plasmodiophora brassicae*. *Can. J. Bot.* 49, 2023–2034. doi: 10.1139/b71-284.
- Akman, M., Kleine, R., van Tienderen, P. H., and Schranz, E. M. (2017). Identification of the Submergence Tolerance QTL Come Quick Drowning1 (CQD1) in *Arabidopsis thaliana*. *J Hered* 108, 308–317. doi: 10.1093/jhered/esx014.
- Aller, E. S. T., Jagd, L. M., Kliebenstein, D. J., and Burow, M. (2018). Comparison of the Relative Potential for Epigenetic and Genetic Variation To Contribute to Trait Stability. *G3 Genes/Genomes/Genetics* 8, 1733–1746. doi: 10.1534/g3.118.200127.
- Aoun, N., Tauleigne, L., Lonjon, F., Deslandes, L., Vailliau, F., Roux, F., et al. (2017). Quantitative Disease Resistance under Elevated Temperature: Genetic Basis of New Resistance Mechanisms to *Ralstonia solanacearum*. *Front. Plant Sci.* 8, 1387. doi: 10.3389/fpls.2017.01387.
- Arends, D., Prins, P., Jansen, R. C., and Broman, K. W. (2010). R/qtl: high-throughput multiple QTL mapping: Fig. 1. *Bioinformatics* 26, 2990–2992. doi: 10.1093/bioinformatics/btq565.
- Bac-Molenaar, J. A., Granier, C., Keurentjes, J. J. B., and Vreugdenhil, D. (2016). Genome-wide association mapping of time-dependent growth responses to moderate drought stress in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* 39, 88–102. doi: 10.1111/pce.12595.
- Barbetti, M. J., Banga, S. S., and Salisbury, P. A. (2012). Challenges for crop production and management from pathogen biodiversity and diseases under current and future climate scenarios – Case study with oilseed Brassicas. *Field Crops Research* 127, 225–240. doi: 10.1016/j.fcr.2011.11.021.
- Batool, M., El-Badri, A. M., Hassan, M. U., Haiyun, Y., Chunyun, W., Zhenkun, Y., et al. (2023). Drought Stress in *Brassica napus*: Effects, Tolerance Mechanisms, and Management Strategies. *J Plant Growth Regul* 42, 21–45. doi: 10.1007/s00344-021-10542-9.
- Bhadra, P., Maitra, S., Shankar, T., Hossain, A., Praharaj, S., and Aftab, T. (2022). “Climate change impact on plants: Plant responses and adaptations,” in *Plant Perspectives to Global Climate Changes* (Elsevier), 1–24. doi: 10.1016/B978-0-323-85665-2.00004-2.

- Bidzinski, P., Ballini, E., Ducasse, A., Michel, C., Zuluaga, P., Genga, A., et al. (2016). Transcriptional Basis of Drought-Induced Susceptibility to the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front. Plant Sci.* 7. doi: 10.3389/fpls.2016.01558.
- Bineau, E., Diouf, I., Carretero, Y., Duboscq, R., Bitton, F., Djari, A., et al. (2021). Genetic diversity of tomato response to heat stress at the QTL and transcriptome levels. *The Plant Journal* 107, 1213–1227. doi: 10.1111/tpj.15379.
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., et al. (2001). Growth Stage–Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. 12.
- Bradshaw, A. D. (1965). “Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity in Plants,” in *Advances in Genetics* (Elsevier), 115–155. doi: 10.1016/S0065-2660(08)60048-6.
- Broman, K. W., Wu, H., Sen, S., and Churchill, G. A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 19, 889–890. doi: 10.1093/bioinformatics/btg112.
- Colome-Tatche, M., Cortijo, S., Wardenaar, R., Morgado, L., Lahouze, B., Sarazin, A., et al. (2012). Features of the Arabidopsis recombination landscape resulting from the combined loss of sequence variation and DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 16240–16245. doi: 10.1073/pnas.1212955109.
- Cortijo, S., Wardenaar, R., Colome-Tatche, M., Gilly, A., Etcheverry, M., Labadie, K., et al. (2014). Mapping the Epigenetic Basis of Complex Traits. *Science* 343, 1145–1148. doi: 10.1126/science.1248127.
- Dalakouras, A., and Vlachostergios, D. (2021). Epigenetic approaches to crop breeding: current status and perspectives. *Journal of Experimental Botany* 72, 5356–5371. doi: 10.1093/jxb/erab227.
- Deleris, A., Halter, T., and Navarro, L. (2016). DNA Methylation and Demethylation in Plant Immunity. *Annu. Rev. Phytopathol.* 54, 579–603. doi: 10.1146/annurev-phyto-080615-100308.
- Desaint, H., Aoun, N., Deslandes, L., Vaillau, F., Roux, F., and Berthomé, R. (2021). Fight hard or die trying: when plants face pathogens under heat stress. *New Phytol* 229, 712–734. doi: 10.1111/nph.16965.
- Diouf, I., Derivot, L., Koussevitzky, S., Carretero, Y., Bitton, F., Moreau, L., et al. (2020). Genetic basis of phenotypic plasticity and genotype \times environment interactions in a multi-parental tomato population. *Journal of Experimental Botany* 71, 5365–5376. doi: 10.1093/jxb/eraa265.
- Dixon, G. R. (2009). The Occurrence and Economic Impact of *Plasmodiophora brassicae* and Clubroot Disease. *J Plant Growth Regul* 28, 194–202. doi: 10.1007/s00344-009-9090-y.
- Downen, R. H., Pelizzola, M., Schmitz, R. J., Lister, R., Downen, J. M., Nery, J. R., et al. (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, E2183–E2191. doi: 10.1073/pnas.1209329109.

- Fahling, M., Graf, H., and Siemens, J. (2003). Pathotype Separation of *Plasmodiophora brassicae* by the Host Plant. *J Phytopathol* 151, 425–430. doi: 10.1046/j.1439-0434.2003.00744.x.
- Furci, L., Jain, R., Stassen, J., Berkowitz, O., Whelan, J., Roquis, D., et al. (2019). Identification and characterisation of hypomethylated DNA loci controlling quantitative resistance in *Arabidopsis*. *eLife* 8, e40655. doi: 10.7554/eLife.40655.
- Gahlaut, V., Zinta, G., Jaiswal, V., and Kumar, S. (2020). Quantitative Epigenetics: A New Avenue for Crop Improvement. *Epigenomes* 4, 25. doi: 10.3390/epigenomes4040025.
- Galiano-Carneiro, A. L., Kessel, B., Presterl, T., and Miedaner, T. (2021). Intercontinental trials reveal stable QTL for Northern corn leaf blight resistance in Europe and in Brazil. *Theor Appl Genet* 134, 63–79. doi: 10.1007/s00122-020-03682-1.
- Gilly, A., Etcheverry, M., Madoui, M.-A., Guy, J., Quadrana, L., Alberti, A., et al. (2014). TE-Tracker: systematic identification of transposition events through whole-genome resequencing. *BMC Bioinformatics* 15, 377. doi: 10.1186/s12859-014-0377-z.
- Gossen, B. D., Adhikari, K. K. C., and McDonald, M. R. (2012). Effects of temperature on infection and subsequent development of clubroot under controlled conditions: Effects of temperature on clubroot. *Plant Pathology* 61, 593–599. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02536.x.
- Gravot, A., Grillet, L., Wagner, G., Jubault, M., Lariagon, C., Baron, C., et al. (2011). Genetic and physiological analysis of the relationship between partial resistance to clubroot and tolerance to trehalose in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 191, 1083–1094. doi: 10.1111/j.1469-8137.2011.03751.x.
- Gravot, A., Lemarié, S., Richard, G., Lime, T., Lariagon, C., and Manzaneres-Dauleux, M. J. (2016). Flooding affects the development of *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis* roots during the secondary phase of infection. *Plant Pathol* 65, 1153–1160. doi: 10.1111/ppa.12487.
- Heard, E., and Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. *Cell* 157, 95–109. doi: 10.1016/j.cell.2014.02.045.
- Holliday, R. (1987). The Inheritance of Epigenetic Defects.
- Hwang, G., Zhu, J.-Y., Lee, Y. K., Kim, S., Nguyen, T. T., Kim, J., et al. (2017). PIF4 Promotes Expression of LNG1 and LNG2 to Induce Thermomorphogenic Growth in *Arabidopsis*. *Front. Plant Sci.* 8, 1320. doi: 10.3389/fpls.2017.01320.
- Ibañez, C., Poeschl, Y., Peterson, T., Bellstädt, J., Denk, K., Gogol-Döring, A., et al. (2017). Ambient temperature and genotype differentially affect developmental and phenotypic plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 17, 114. doi: 10.1186/s12870-017-1068-5.
- IPCC (2023). “IPCC, 2023: Summary for Policymakers,” in *Climate Change 2023: Synthesis Report. A Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change* (IPCC, Geneva, Switzerland, 36 pages. (in press).), 36.

- Iwama, H., Osozawa, S., Ushiroda, T., and Kubota, T. (1994). Analysis of soil water matric potential requirement for infection of turnip with *Plasmodiophora brassicae* using negative pressure water circulation technique. *Soil Science and Plant Nutrition* 40, 293–299. doi: 10.1080/00380768.1994.10413303.
- Jin, B., Wang, L., Wang, J., Jiang, K.-Z., Wang, Y., Jiang, X.-X., et al. (2011). The effect of experimental warming on leaf functional traits, leaf structure and leaf biochemistry in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* 11, 35. doi: 10.1186/1471-2229-11-35.
- Johannes, F., Porcher, E., Teixeira, F. K., Saliba-Colombani, V., Simon, M., Agier, N., et al. (2009). Assessing the Impact of Transgenerational Epigenetic Variation on Complex Traits. *PLoS Genet* 5, e1000530. doi: 10.1371/journal.pgen.1000530.
- Jubault, M., Lariagon, C., Simon, M., Delourme, R., and Manzanares-Dauleux, M. J. (2008). Identification of quantitative trait loci controlling partial clubroot resistance in new mapping populations of *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* 117, 191–202. doi: 10.1007/s00122-008-0765-8.
- Kakutani, T., Jeddeloh, J. A., Flowers, S. K., Munakata, K., and Richards, E. J. (1996). Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 12406–12411.
- Kassambara, A., and Mundt, F. (2020). *factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses*. Available at: <https://cran.r-project.org/web/packages/factoextra/index.html> [Accessed June 6, 2023].
- Kooke, R., Johannes, F., Wardenaar, R., Becker, F., Etcheverry, M., Colot, V., et al. (2015). Epigenetic Basis of Morphological Variation and Phenotypic Plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* 27, 337–348. doi: 10.1105/tpc.114.133025.
- Kusmec, A., Srinivasan, S., Nettleton, D., and Schnable, P. S. (2017). Distinct genetic architectures for phenotype means and plasticities in *Zea mays*. *Nature Plants* 3, 715–723. doi: 10.1038/s41477-017-0007-7.
- Laperche, A., Aigu, Y., Jubault, M., Ollier, M., Guichard, S., Glory, P., et al. (2017). Clubroot resistance QTL are modulated by nitrogen input in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 130, 669–684. doi: 10.1007/s00122-016-2842-8.
- Lê, S., Josse, J., and Husson, F. (2008). **FactoMineR**: An R Package for Multivariate Analysis. *J. Stat. Soft.* 25. doi: 10.18637/jss.v025.i01.
- Lee, J., Izzah, N. K., Choi, B.-S., Joh, H. J., Lee, S.-C., Perumal, S., et al. (2015). Genotyping-by-sequencing map permits identification of clubroot resistance QTLs and revision of the reference genome assembly in cabbage (*Brassica oleracea* L.). *DNA Res*, dsv034. doi: 10.1093/dnares/dsv034.
- Liégard, B., Baillet, V., Etcheverry, M., Joseph, E., Lariagon, C., Lemoine, J., et al. (2019a). Quantitative resistance to clubroot infection mediated by transgenerational epigenetic variation in *Arabidopsis*. *New Phytol* 222, 468–479. doi: 10.1111/nph.15579.

- Liégard, B., Gravot, A., Quadrana, L., Aigu, Y., Bénéjam, J., Lariagon, C., et al. (2019b). Natural Epiallelic Variation is Associated with Quantitative Resistance to the Pathogen *Plasmodiophora brassicae*. bioRxiv doi: 10.1101/776989.
- Liu, L., Qin, L., Zhou, Z., Hendriks, W. G. H. M., Liu, S., and Wei, Y. (2020). Refining the Life Cycle of *Plasmodiophora brassicae*. *Phytopathology*® 110, 1704–1712. doi: 10.1094/PHYTO-02-20-0029-R.
- Long, Y., Xia, W., Li, R., Wang, J., Shao, M., Feng, J., et al. (2011). Epigenetic QTL Mapping in *Brassica napus*. *Genetics* 189, 1093–1102. doi: 10.1534/genetics.111.131615.
- Lu, W., Xiao, L., Quan, M., Wang, Q., El-Kassaby, Y. A., Du, Q., et al. (2020). Linkage-linkage disequilibrium dissection of the epigenetic quantitative trait loci (epiQTLs) underlying growth and wood properties in *Populus*. *New Phytol* 225, 1218–1233. doi: 10.1111/nph.16220.
- Manzanares-Dauleux, M. J., Delourme, R., Baron, F., and Thomas, G. (2000). Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 101, 885–891. doi: 10.1007/s001220051557.
- Marchadier, E., Hanemian, M., Tisné, S., Bach, L., Bazakos, C., Gilbault, E., et al. (2019). The complex genetic architecture of shoot growth natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* 15, e1007954. doi: 10.1371/journal.pgen.1007954.
- Mayek-Pérez, N., GarcÍA-Espinosa, R., LÓpez-CastaÑeda, Cá., Acosta-Gallegos, J. A., and Simpson, J. (2002). Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 60, 185–195. doi: 10.1006/pmpp.2001.0388.
- Mondal, S., Singh, R. P., Crossa, J., Huerta-Espino, J., Sharma, I., Chatrath, R., et al. (2013). Earliness in wheat: A key to adaptation under terminal and continual high temperature stress in South Asia. *Field Crops Research* 151, 19–26. doi: 10.1016/j.fcr.2013.06.015.
- Morrison, M. J., and Stewart, D. W. (2002). Heat Stress during Flowering in Summer Brassica. *Crop Sci.* 42, 797–803. doi: 10.2135/cropsci2002.7970.
- Nakabayashi, R., Yonekura-Sakakibara, K., Urano, K., Suzuki, M., Yamada, Y., Nishizawa, T., et al. (2014). Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal* 77, 367–379. doi: 10.1111/tpj.12388.
- O’Brien, P., Kral-O’Brien, K., and Hatfield, J. L. (2021). Agronomic approach to understanding climate change and food security. *Agronomy Journal* 113, 4616–4626. doi: 10.1002/agj2.20693.
- 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. *Front. Plant Sci.* 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00723.

- Pigliucci, M. (2002). Phenotypic Plasticity and Integration in Response to Flooded Conditions in Natural Accessions of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Brassicaceae). *Annals of Botany* 90, 199–207. doi: 10.1093/aob/mcf164.
- Quadrana, L., and Colot, V. (2016). Plant Transgenerational Epigenetics. *Annu. Rev. Genet.* 50, 467–491. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035254.
- Quan, W., Liu, X., Wang, H., and Chan, Z. (2016). Comparative Physiological and Transcriptional Analyses of Two Contrasting Drought Tolerant Alfalfa Varieties. *Front. Plant Sci.* 6. doi: 10.3389/fpls.2015.01256.
- R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Available at: URL <https://www.R-project.org/>.
- Rocherieux, J., Glory, P., Giboulot, A., Boury, S., Barbeyron, G., Thomas, G., et al. (2004). Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in *Brassica oleracea*. *Theor Appl Genet* 108, 1555–1563. doi: 10.1007/s00122-003-1580-x.
- Rolfe, S. A., Strelkov, S. E., Links, M. G., Clarke, W. E., Robinson, S. J., Djavaheri, M., et al. (2016). The compact genome of the plant pathogen *Plasmodiophora brassicae* is adapted to intracellular interactions with host *Brassica* spp. *BMC Genomics* 17, 272. doi: 10.1186/s12864-016-2597-2.
- Savchenko, T., Rolletschek, H., Heinzl, N., Tikhonov, K., and Dehesh, K. (2019). Waterlogging tolerance rendered by oxylipin-mediated metabolic reprogramming in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 70, 2919–2932. doi: 10.1093/jxb/erz110.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., et al. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9, 676–682. doi: 10.1038/nmeth.2019.
- Schwelm, A., Dixelius, C., and Ludwig-Müller, J. (2016). New kid on the block – the clubroot pathogen genome moves the plasmodiophorids into the genomic era. *Eur J Plant Pathol* 145, 531–542. doi: 10.1007/s10658-015-0839-9.
- Sharma, K., Gossen, B. D., and McDonald, M. R. (2011a). Effect of Temperature on Cortical Infection by *Plasmodiophora brassicae* and Clubroot Severity. *Phytopathology*® 101, 1424–1432. doi: 10.1094/PHYTO-04-11-0124.
- Sharma, K., Gossen, B. D., and McDonald, M. R. (2011b). Effect of temperature on primary infection by *Plasmodiophora brassicae* and initiation of clubroot symptoms: Temperature affects primary infection by *P. brassicae*. *Plant Pathology* 60, 830–838. doi: 10.1111/j.1365-3059.2011.02458.x.
- Some, A., Manzanares, M. J., Laurens, F., Baron, F., Thomas, G., and Rouxel, F. (1996). **Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates**. *Plant Pathology* 45, 432–439. doi: 10.1046/j.1365-3059.1996.d01-155.x.

- Sriden, N., and Charoensawan, V. (2022). Large-scale comparative transcriptomic analysis of temperature-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 110, 425–443. doi: 10.1007/s11103-021-01223-y.
- Suzuki, N., Rivero, R. M., Shulaev, V., Blumwald, E., and Mittler, R. (2014). Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol* 203, 32–43. doi: 10.1111/nph.12797.
- Tisné, S., Serrand, Y., Bach, L., Gilbault, E., Ben Ameer, R., Balasse, H., et al. (2013). Pheno-scope: an automated large-scale phenotyping platform offering high spatial homogeneity. *Plant J* 74, 534–544. doi: 10.1111/tpj.12131.
- Velásquez, A. C., Castroverde, C. D. M., and He, S. Y. (2018). Plant–Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Current Biology* 28, R619–R634. doi: 10.1016/j.cub.2018.03.054.
- Waddington, C. H. (1959). Canalization of Development and Genetic Assimilation of Acquired Characters. *Nature* 183, 1654–1655. doi: 10.1038/1831654a0.
- Walker, J. C. (1965). Use of Environmental Factors in Screening for Disease Resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* 3, 197–208. doi: 10.1146/annurev.py.03.090165.001213.
- Weraduwege, S. M., Chen, J., Anozie, F. C., Morales, A., Weise, S. E., and Sharkey, T. D. (2015). The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 6. doi: 10.3389/fpls.2015.00167.
- Wiszniewski, A., Uberegui, E., Messer, M., Sultanova, G., Borghi, M., Duarte, G. T., et al. (2022). Temperature-mediated flower size plasticity in *Arabidopsis*. *iScience* 25, 105411. doi: 10.1016/j.isci.2022.105411.
- Zandalinas, S. I., and Mittler, R. (2022). Plant responses to multifactorial stress combination. *New Phytologist* 234, 1161–1167. doi: 10.1111/nph.18087.
- Zhang, H., Lang, Z., and Zhu, J.-K. (2018). Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19, 489–506. doi: 10.1038/s41580-018-0016-z.

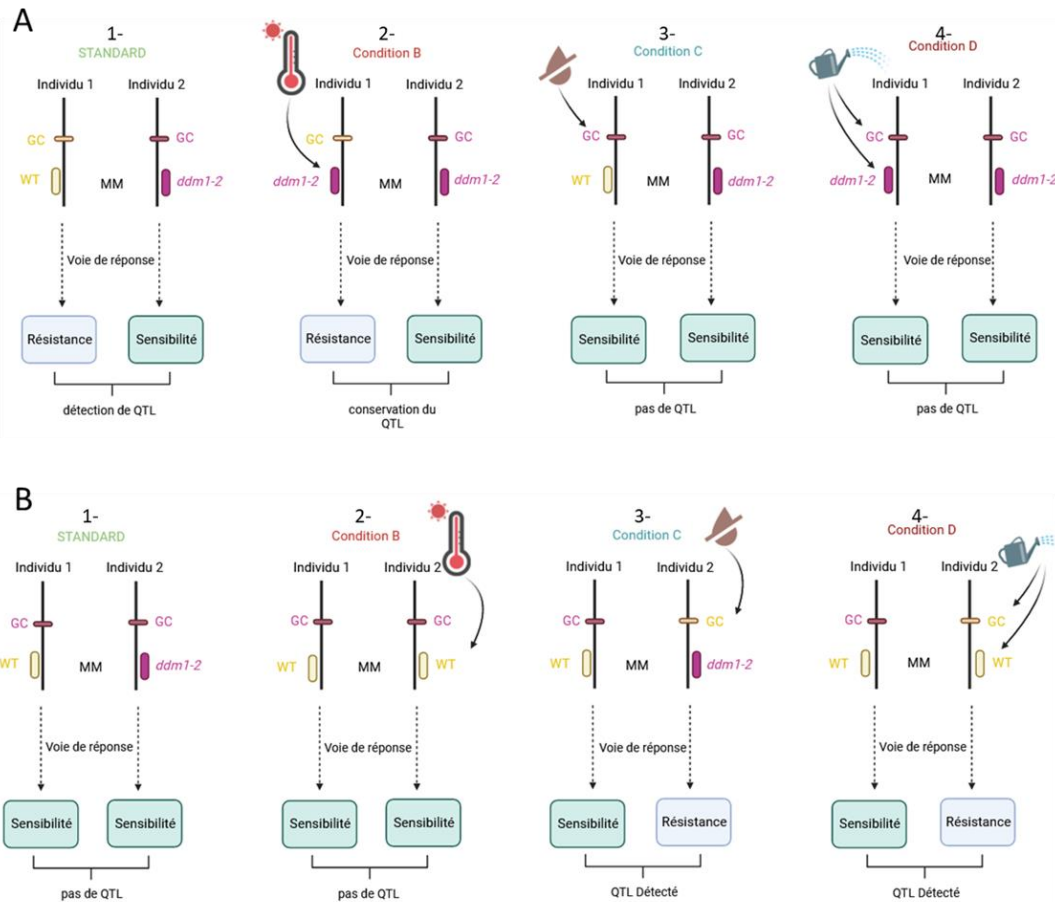


Figure III. 5. : Hypothèses sur l'impact des conditions abiotiques sur le niveau de méthylation des « gènes » causaux et/ou des épimarqueurs et conséquences sur la détection de QTL^{epi}. A) Cas d'un QTL^{epi} détecté en condition STANDARD. 1- En condition STANDARD, les individus de type 1 possèdent un épiallèle hyperméthylé au MM en déséquilibre de liaison (DL) avec le gène causal hyperméthylé, conférant une résistance. Les individus de type 2 possèdent l'épiallèle hypométhylé au MM en DL avec le gène causal hypométhylé, ne conférant pas de résistance. La différence de phénotypes entre les individus de type 1 et les individus de type 2 conduit à la détection d'un QTL. 2- La condition abiotique B conduit à une hypométhylation du MM pour les individus de type 1 mais n'impacte pas le niveau de méthylation du gène causal : le phénotype de chaque individu n'est pas modifié, la détection de QTL n'est pas impactée puisque la carte épigénétique, basée sur le niveau de méthylation des marqueurs en conditions optimales de culture, reste inchangée. 3- La condition C entraîne une hypométhylation du gène causal chez les individus de type 1. Les individus de type 1 et 2 présentent un phénotype similaire conduisant à la non-détection de QTL. 4- la condition D entraîne une hypométhylation du gène causal et du MM des individus de type 1, conduisant à la non-détection du QTL. B) Cas d'un QTL^{epi} non détecté en condition STANDARD. 1- en condition STANDARD, l'épimarqueur MM est en déséquilibre de liaison avec un gène causal hypométhylé chez les deux types d'individus n'induisant pas de différence de phénotype : il n'y a pas de détection de QTL 2- la condition B conduit à une hyperméthylation du MM chez les individus de type 2 n'entraînant pas de modification du phénotype : il n'y a pas de détection de QTL. 3- la condition C conduit à une hyperméthylation du gène causal en déséquilibre avec le MM chez les individus de type 2 et donc à un phénotype de résistance (en réprimant par exemple un gène de sensibilité), conduisant ainsi à la détection d'un QTL^{epi}. 4- la condition D conduit à une hyperméthylation du gène causal et du MM chez les individus de type 2, et donc à un phénotype de résistance chez les individus de type 2 : un QTL^{epi} est détecté. *Pour le marqueur épigénétique (MM) et/ou le gène causal (GC) en déséquilibre de liaison avec le MM, les épiallèles hyperméthylés (de type WT) et hypométhylés (de type ddm1-2) sont représentés en jaune et rose respectivement.*

3. Impact des conditions abiotiques sur le niveau de méthylation de régions génomiques d'*Arabidopsis*

Une contrainte abiotique peut altérer les mécanismes de résistance et de défense de la plante en réponse à l'attaque des agents pathogènes, soit de manière positive en conduisant à une meilleure résistance, soit de manière négative en favorisant le développement de la maladie (Son & Park, 2022; Yang *et al.*, 2023; Singh *et al.*, 2023). Un des mécanismes moléculaires qui pourrait expliquer la modulation des voies de défense par les conditions abiotiques est la méthylation de l'ADN. En effet, différentes études ont mis en évidence un changement du niveau de méthylation global du génome ainsi que de celui de certaines régions génomiques dû à des contraintes abiotiques telles qu'un stress thermique (Korotko *et al.*, 2021), un déficit hydrique (Ackah *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2023) ou un excès hydrique (Komivi *et al.*, 2018). La méthylation de l'ADN, lorsque localisée dans les régions promotrices d'un gène est très fortement associée à la répression de l'expression des gènes, bien que certains gènes exprimés présentent un niveau de méthylation élevé dans leur promoteur (de Mendoza *et al.*, 2022). Dans notre étude, nous supposons que l'hyperméthylation d'une région est associée à un état transcriptomique inactif et inversement.

Dans l'article soumis à *Frontiers In Plant Science*, nous avons mis en évidence que l'architecture du contrôle épigénétique de la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie dépendait des conditions abiotiques étudiées et notamment que la détection de certains QTL^{epi} était spécifique d'une condition abiotique. Nous nous sommes donc intéressés à comprendre comment et pourquoi certains QTL^{epi} étaient détectés uniquement dans certaines conditions abiotiques. Trois hypothèses peuvent être émises (**Fig. III.5.** et **Fig. III.6.**) :

- Les conditions abiotiques impactent le niveau de méthylation du (des) gène(s) causal(aux) et donc modifient la réponse de résistance ou de sensibilité de la plante. Les variants génétiques présents au sein de la population epiRIL (indel, transposon, et SNP) peuvent en plus jouer un rôle dans la modification de la méthylation des gènes causaux, conduisant éventuellement à des modifications de la méthylation de façon génotype-dépendant (**Fig. III.5.A et B**).

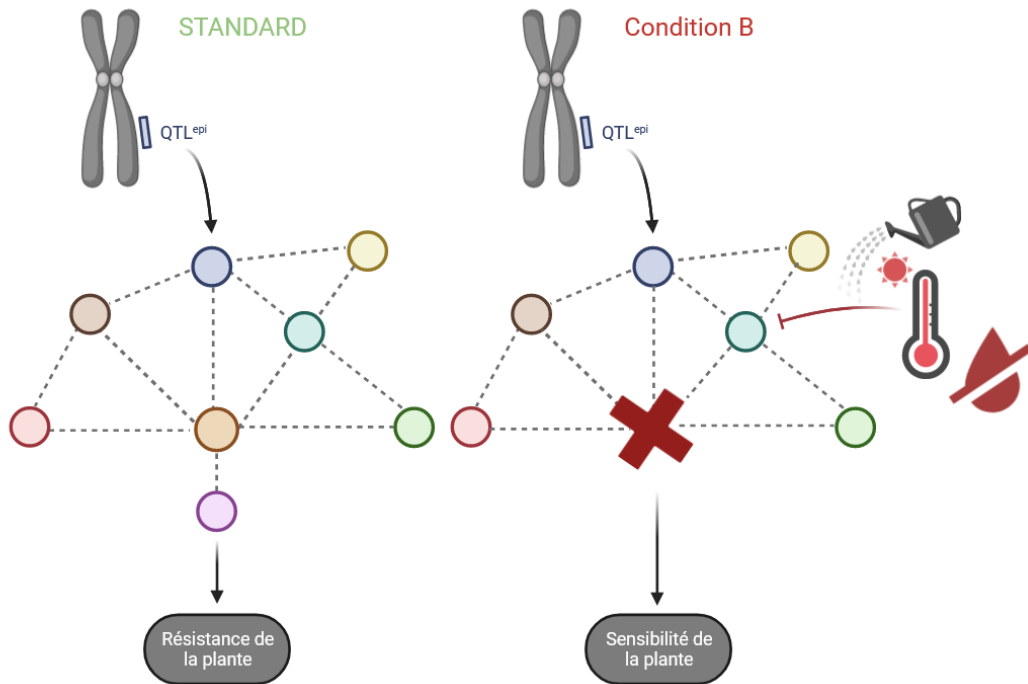


Figure III. 6. : Hypothèses sur l'impact des conditions abiotiques sur les voies de réponse des plantes. En condition STANDARD, le QTL^{epi} identifié lors de la réponse de la plante à la maladie est efficace. L'expression des éléments causaux sous-jacent à ce QTL^{epi} (gène de résistance, par exemple) entraîne une cascade de signalisation (représentée par les multiples cercles colorés) ce qui conduit à la résistance de la plante. La condition B, qui peut être une élévation de la température, un déficit hydrique ou un excès d'eau, impacte l'efficacité d'un des acteurs de la cascade de signalisation déclenchée par l'expression du gène causal du QTL^{epi} et conduit à un défaut de la cascade de signalisation et à une sensibilité de la plante à l'infection ce qui conduit ultimement à l'absence de la détection du QTL^{epi}.

- Les conditions abiotiques appliquées entraînent une variation de la méthylation non seulement au niveau du (des) gène(s) causal(aux) mais aussi des marqueurs épigénétiques (MM) utilisés pour la construction de la carte épigénétique. Les marqueurs moléculaires épigénétiques utilisés par Colome-Tatche *et al.* (2012) pour la réalisation de la carte épigénétique de la population epiRIL ont été obtenus à partir d'ADN extrait des parties aériennes de plantes âgées de 3 semaines, cultivées en jours longs et dans des conditions optimales pour le développement de la plante (Cortijo *et al.*, 2014b). Lors de la construction de la population epiRIL, Cortijo S. (2012) n'a pu conserver que 31.2% des épiallèles hypométhylés issus de *ddm1-2*, les autres ayant réversé plus ou moins rapidement vers un statut hyperméthylé. Même si les 126 épimarqueurs de la carte épigénétique sont conservés au cours des générations cultivées en conditions optimales, nous pouvons faire l'hypothèse que certains loci épimarqueurs connaissent des réversions lors de culture en conditions contraintes (**Fig. III.5.A et B**).
- Sans impacter le niveau de méthylation de régions génomiques, les conditions abiotiques impactent directement les voies de réponse (voies métaboliques ou de signalisation) impliquées dans la réponse de résistance ou de sensibilité à la hernie modulant ainsi le phénotype de résistance de la plante (**Fig. III.6**).

Pour tenter de valider ou réfuter ces hypothèses, nous avons évalué le niveau de méthylation de plusieurs régions génomiques sous différentes contraintes abiotiques.

3.1. Matériels, méthodes et stratégies

3.1.1. Choix des régions génomiques

Dans un premier temps, nous avons souhaité évaluer l'impact des conditions abiotiques sur le niveau de méthylation des gènes causaux des QTL^{epi} et/ou des marqueurs épigénétiques au pic des QTL^{epi} détectés. Dans notre étude, les intervalles de confiance des QTL^{epi} sont grands et ne permettent pas d'étudier individuellement tous les gènes inclus dans ces intervalles.

Tableau III.4. : Caractéristiques des quatre QTL^{epi} pour lesquels le niveau de méthylation des épimarqueurs au pic (MM171 et MM863) a été évalué. Sont présentés en colonne : les traits liés à la maladie, le nom des QTL^{epi}, l'épimarqueur MM le plus proche du pic du QTL^{epi}, le chromosome où est localisé le QTL^{epi}, la position en cM du pic du QTL^{epi} (PoscM), l'intervalle de confiance (CI), le pourcentage de la variance phénotypique expliquée (Var, R², %) et l'allèle associé avec la plus grande valeur du trait. En vert pour la condition STANDARD, en jaune pour la condition DROUGHT et en bleu pour la condition FLOOD.

Disease Related Traits	QTL ^{epi} Names	MM	Chr	Pos (cM)	Lod	CI (cM)	Var (R ² , %)	Allele associated with higher values
GALA	GALA-Ch2-Standard	MM171	2	5.33	4	0-8	13.74	<i>ddm1</i>
DI	DI-Ch5-Drought	MM863	5	59.93	2.5	52-65.93	8.13	<i>ddm1</i>
GALA	GALA-Ch5-Drought	MM863	5	59.929	3.3	56.45-65.93	9.46	<i>ddm1</i>
GALA	GALA-Ch5-Flood	MM863	5	59.93	3.1	39.49-65.93	8.90	<i>ddm1</i>

Toutefois, les intervalles de confiance des QTL^{epi} **GALA-Ch5-Flood**, **GALA-Ch5-Drought** et **DI-Ch5-Drought**, localisés sur la fin du chromosome 5 (dont MM863 est l'épimarqueur au pic), incluent les deux gènes causaux contrôlant le QTL *Pb-At5.2* : *AT5G47260* et *AT5G47280*, localisés à 500kb de l'épimarqueur MM863 : ces deux gènes seront, dans cette section, considérés comme des gènes candidats pour les QTL^{epi} **GALA-Ch5-Flood**, **GALA-Ch5-Drought** et **DI-Ch5-Drought**.

Afin de tester nos hypothèses sur la détection de QTL^{epi} spécifiques d'une condition de culture, deux types de QTL^{epi} ont été étudiés : **1)** des QTL^{epi} détectés seulement en condition classique de culture (et non détectés lors de l'application de contraintes abiotiques) ou **2)** des QTL^{epi} détectés seulement lors de l'application de contraintes abiotiques (et non détectés en condition classique de culture). Deux QTL^{epi}/régions correspondant à chaque cas de figure ont ainsi été choisis (**Tableau III.4**) :

- Le premier type de région correspond au QTL^{epi} **GALA-Ch2-Standard** localisé au niveau du marqueur épigénétique MM171 sur le chromosome 2. En condition classique de culture, l'hyperméthylation de ce QTL^{epi} est associée à une augmentation de la résistance (GALA plus faible) tandis qu'une hypométhylation est associée à une diminution de la résistance à la hernie (GALA plus fort). L'intervalle de confiance de ce QTL^{epi}, détecté uniquement en condition classique de culture, est relativement grand (6 708 kb, soit 6745 éléments dont des gènes codants entre autres des protéines, des transposons, des miARN) ce qui rend difficile l'identification de gènes candidats. Le marqueur épigénétique MM171 a une taille de 1329 bp et contient la séquence du gène *AT2G03965* codant une protéine hypothétique, le gène *AT2G04655*, codant pour un lncARN et l'élément transposable *AT2TE05665*.

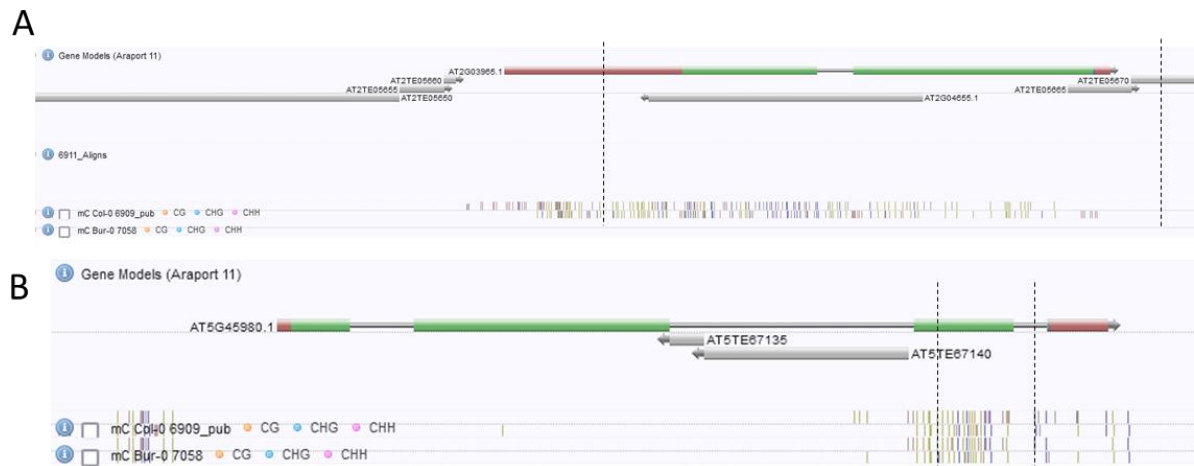


Figure III.7. : Niveaux de méthylation des épimarqueurs MM171 (A) et MM863 (B) pour les écotypes Col-0 (6909) et Bur-0 (7058) selon les données du projet « 1001 genomes » (Kawakatsu *et al.*, 2016b). Bur-0 présente une hypométhylation au niveau de l'épimarqueur MM171 et une hyperméthylation similaire à Col-0 au niveau de l'épimarqueur MM863. Chaque épimarqueur est délimité par les deux lignes noires en pointillés.

- Le second type de région choisie correspond aux QTL^{epi} **GALA-Ch5-Flood**, **GALA-Ch5-Drought** et **DI-Ch5-Drought** localisés sur la fin du chromosome 5 au niveau du marqueur épigénétique MM863. Cette région est significativement associée à la variation des phénotypes DI (**DI-Ch5-Drought**) et GALA (**GALA-Ch5-Drought** ; **GALA-Ch5-Flood**) dans les conditions de sécheresse et d'engorgement et explique une part similaire de variabilité phénotypique quelles que soient les conditions abiotiques (R^2 de **GALA-Ch5-Drought** = 9.45% ; R^2 de **GALA-Ch5-Flood** = 8.69). En conditions de sécheresse et d'engorgement, une hyperméthylation de la région est associée à une plus grande résistance à la hernie pour les trois QTL^{epi}. Ces QTL^{epi} ne sont cependant pas détectés en condition classique de culture ou lors de l'élévation ponctuelle de température. L'épimarqueur MM863 – d'une longueur de 330 bp et situé au niveau d'un exon du gène *AT5G45980* codant un facteur de transcription à homéodomaine – est localisé à 500kb des 2 gènes NLR *AT5G47260* et *AT5G47280*, identifiés comme contrôlant le QTL *Pb-At 5.2* de résistance à la hernie et régulés par une épimutation naturelle (Liégard *et al.*, 2019b). Bien que l'intervalle de confiance soit de taille importante (3775 kbp) et comporte plus de 900 gènes, nous avons pour cette étude considéré ces deux gènes comme gènes candidats causaux des QTL^{epi} **GALA-Ch5-Flood**, **GALA-Ch5-Drought** et **DI-Ch5-Drought**.

3.1.2. Choix des génotypes

Les génotypes parentaux ou lignées epiRIL ont été choisies en fonction de leur hyper- ou hypométhylation au niveau des régions/gènes choisis :

- L'écotype Col-0, présentant une hyperméthylation au niveau des épimarqueurs MM171 et MM863 et au niveau des 2 gènes causaux du QTL *Pb-At 5.2*, *AT5G47260* et *AT5G47280*.
- L'écotype Bur-0, présentant une hypométhylation au niveau de l'épimarqueur MM171, des gènes causaux du QTL *Pb-At 5.2* et une hyperméthylation similaire à Col-0 au niveau de l'épimarqueur MM863 selon les données du projet « 1001 genomes » (Kawakatsu *et al.*, 2016a) (**Fig. III.7.**).

Tableau III.5. : Valeurs de GALA chez Bur-0, Col-0 et l'épiRIL495 en fonction des conditions de culture

Lignées	STANDARD	HEAT	DROUGHT	FLOOD
Bur-0	115.58	130.4	69.19	116.64
Col-0	163.93	122.1	187.55	234.99
epiRIL495	109.54	114.46	85.94	133.39

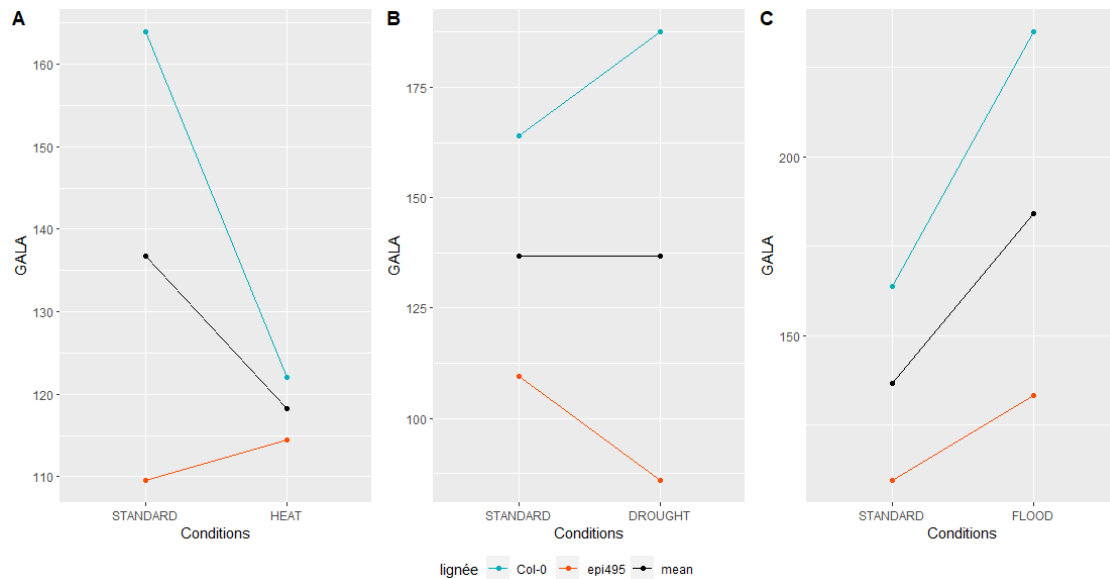


Figure III. 8. : Normes de réaction du trait GALA pour l'écotype Col-0 (bleu) et l'épiRIL495 (rouge). La moyenne des valeurs de GALA au sein de chaque condition est donnée (trait noir). En A) STANDARD et HEAT, en B) STANDARD et DROUGHT et en C) STANDARD ET FLOOD.

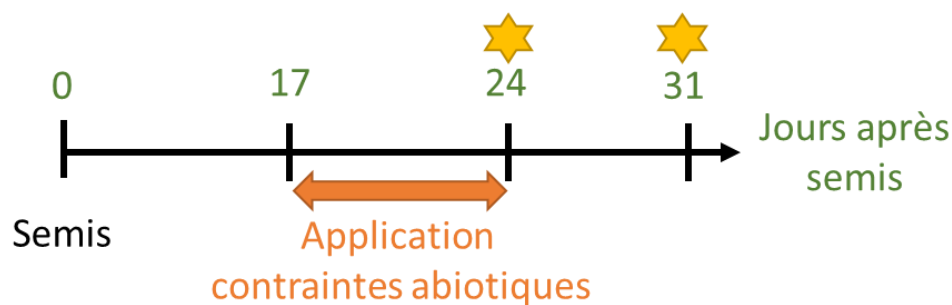


Figure III. 9. : Moment et durée d'application des contraintes abiotiques lors de la culture des génotypes Col-0, Bur-0 et epiRIL495. Les contraintes abiotiques (augmentation de la température diurne et nocturne de 5°C, déficit hydrique ou engorgement) sont appliquées dès le 17^{ème} jour après le semis (JAS) et pour une durée de 7 jours, i.e. jusqu'à 24 JAS. Des feuilles ont été prélevées à la fin de chaque contrainte abiotique à 24 JAS et à 31 JAS, après une phase de 7 jours de récupération sans contrainte abiotique.

- La lignée epiRIL 495 présentant le même état hyperméthylé que Col-0 au niveau des épimarqueurs MM171 et MM863. L'epiRIL 495 et l'écotype Col-0 présentent un niveau de méthylation similaire pour 124 des 126 marqueurs épigénétiques (à l'exception des marqueurs MM392 et MM547 situés respectivement au début et à la fin du chromosome 3), aucun QTL^{epi} n'ayant été identifié ni pour GALA, ni pour d'autres traits au niveau des ces épimarqueurs. L'epiRIL 495 et Col-0 diffèrent également au niveau de 31 variants génétiques répartis sur les cinq chromosomes. Pour le trait GALA, aucun variant génétique n'explique de QTL. En revanche, plusieurs variants génétiques expliquent des QTL pour GA (indel_15935454) en DROUGHT, Lfni (SNP_16205156, SNP_7944780) en FLOOD et STANDARD et Lfi (SNP_7980674) HEAT. Les variations génétiques pourraient ainsi expliquer les différences de phénotypes entre ces deux lignées en fonction des conditions abiotiques : l'epiRIL 495 présentant un indice GALA similaire à Col-0 en conditions STANDARD et HEAT mais un phénotype plus résistant que Col-0 en DROUGHT et FLOOD (**Tableau III.5.**). Par ailleurs, quel que soient les conditions abiotiques, les deux lignées ne présentent pas la même plasticité (**Fig. III.8.**).
- Malheureusement, nous n'avons pas pu étudier *ddm1-2* du fait de difficultés de germination rencontrées par cette lignée.

3.1.3. Conditions expérimentales et choix des points cinétiques

Pour évaluer l'impact des conditions abiotiques sur le niveau de méthylation des régions précitées, les trois génotypes ont été cultivés, sans inoculation par la hernie, dans les 4 conditions de culture décrites précédemment (la condition classique de culture STANDARD et les 3 contraintes abiotiques HEAT, DROUGHT et FLOOD) (**Fig. III. 9.**). Les contraintes ont été mises en place 17 jours après le semis pendant 7 jours, temps et durée qui correspondent à ceux choisis dans les tests précédents en conditions inoculées. Le niveau de méthylation de l'ADN extrait des parties aériennes (feuilles) a été évalué à deux points cinétiques :

- 24 jours après semis (JAS) : ce temps cinétique correspond à la fin de l'application de chaque contrainte abiotique et permet d'évaluer l'impact d'une contrainte abiotique de sept jours sur le niveau de méthylation de la région.

Tableau III. 6. : Niveaux de méthylation de la région localisée sur la fin du chromosome 5 (A) et au niveau du chromosome 2 (B) pour chaque condition de culture. Standard = STD, élévation de température = HEAT, sécheresse = DROUGHT et engorgement = FLOOD. Les niveaux de méthylation de ces régions ont été évalués dans de l'ADN extrait de feuilles pour les trois lignées Col-0, Bur-0 et l'epiRIL 495 à 24 et 31 JAS. Rouge : peu/pas méthylé, jaune = moyennement méthylé et vert = très fortement méthylé.

A	Condition	STD		HEAT		DROUGHT		FLOOD		
	Jours Après Semis	24	31	24	31	24	31	24	31	
AT5G47260										
	Col-0	Red	Red	Green	Green	Yellow	Green	Yellow	Green	
	epiRIL495	Red	NA	Green	NA	Red	Yellow	Green	Red	
	Bur-0	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	
AT5G47280										
	Col-0	Green	Green	Green	Green	Yellow	Green	Green	Green	
	epiRIL495	Green	NA	Green	NA	Green	Green	Green	Green	
	Bur-0	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	Red	
MM863										
	Col-0	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	Green	
	epiRIL495	Green	NA	Green	NA	Green	Green	Green	Green	
	Bur-0	Red	Red	Red	Red	Green	Green	Green	Green	
B	MM171									
	Col-0	Green	Red	Yellow	Red	Yellow	Green	Green	Green	
	epiRIL495	Green	NA	Yellow	NA	Green	Green	Green	Green	
	Bur-0	Red	Red	Red	Red	Yellow	Red	Yellow	Green	

- 31 jours après semis (JAS) : ce temps cinétique correspond à une période post-contrainte et donc à une période potentielle de récupération post-stress, permettant ainsi d'évaluer si un retour à des conditions classiques de culture peut impacter le niveau de méthylation des régions choisies.

3.1.4. Mesure et analyse du niveau de méthylation

Nous avons évalué le niveau de méthylation de chaque région *via* la méthode Chop qPCR, en utilisant l'enzyme de restriction McrBC (cf. chapitre 2 matériels et méthodes, paragraphe II.4). La McrBC se fixe et clive les régions fortement méthylées. Cependant, les régions présentant une méthylation intermédiaire n'étant pas systématiquement clivées par la McrBC (Holemon *et al.*, 2007; Petell *et al.*, 2017), cette méthode ne permet pas de quantifier précisément le taux de méthylation des régions. Nous avons donc décidé de traiter les résultats de façon qualitative et avons défini pour cela de manière arbitraire les seuils de taux de méthylation suivants : un taux de méthylation inférieur à 40% sera considéré comme un faible niveau de méthylation, un taux de méthylation entre 40 et 60 % sera considéré comme un niveau moyen de méthylation et un taux de méthylation supérieur à 60% sera considéré comme un fort niveau de méthylation. Ces résultats, préliminaires, sont présentés par région génomique.

3.2. Résultats

3.2.1. Impact des conditions abiotiques sur le niveau de méthylation de l'épimarqueur MM863 et des gènes causaux du QTL *Pb-At 5.2* (chromosome 5)

En condition STANDARD (**Tableau III.6.A**) et comme attendu, Col-0 et l'épiRIL495 présentent une hyperméthylation du gène *AT5G47280* et de l'épimarqueur MM863. En revanche, le gène *AT5G47260* est peu méthylé chez les deux génotypes. Bur-0 présente de manière attendue une faible méthylation au niveau des gènes *AT5G47260*, *AT5G47280* et contrairement à ce qui était attendu, une hypométhylation de l'épimarqueur MM863. En condition HEAT, seul le niveau de méthylation du gène *AT5G47260* est augmenté chez Col-0 et l'épiRIL495.

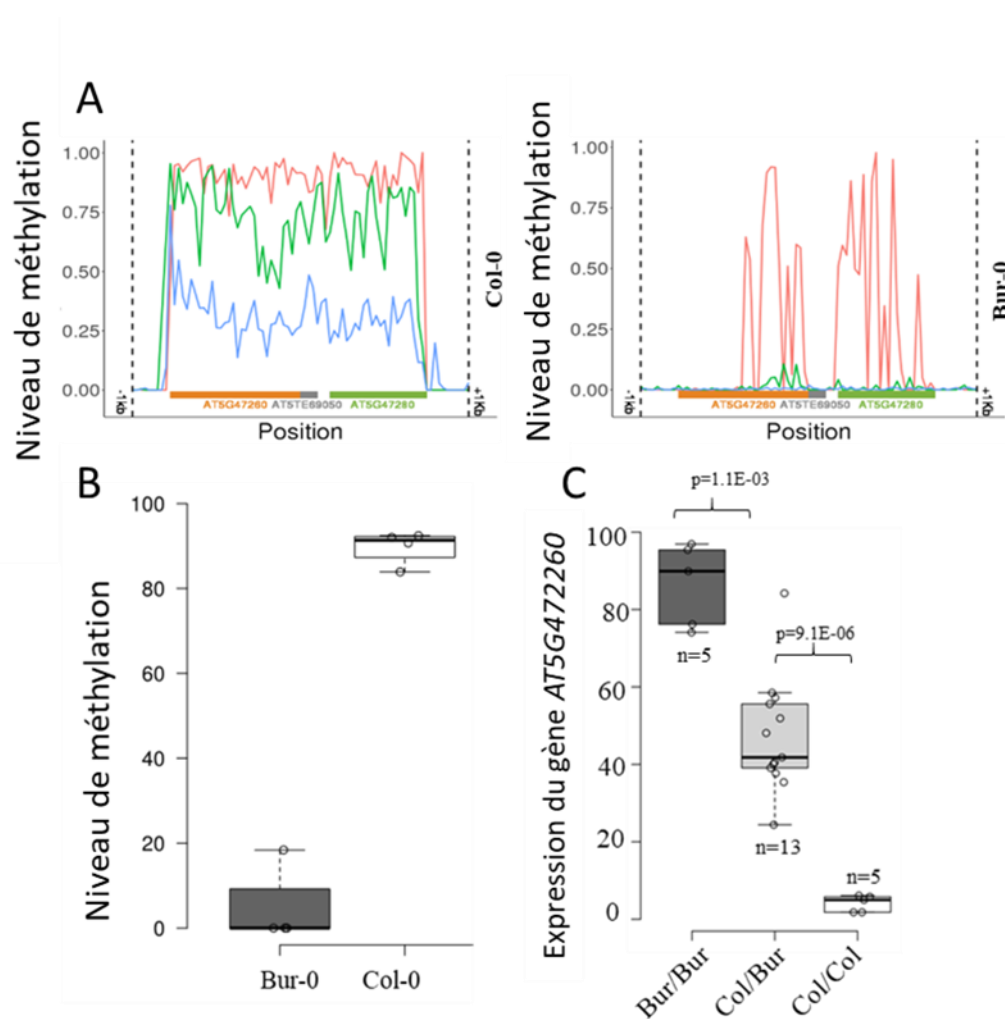


Figure III. 10. : Caractérisation de l'épimutation associée au QTL *Pb-At 5.2* à 21 jours après inoculation. A) Profils de méthylation au niveau des gènes *AT5G47260* et *AT5G47280*, pour les accessions Col-0 et Bur-0, déduits des données de bisulfite précédemment rapportées dans Kawakatsu et al. (2016) (évaluée dans les feuilles). Le niveau de méthylation moyen a été calculé dans des fenêtres de 100 pb non chevauchantes commençant 1 kb avant le site TSS de *AT5G47260* et s'arrêtant 1 kb après le site TSE de *AT5G47280*. En rouge : méthylation dans le contexte CG. En vert : méthylation dans le contexte CHG. En bleu : méthylation dans le contexte CHH. B) Niveaux de méthylation du gène *AT5G47260* pour Col-0 et Bur-0 obtenus par Chop-qPCR à partir d'ADN extrait de racines, C) Expression du gène *AT5G47260* dans les racines d'individus homozygotes pour l'épiallèle de type Bur-0 (Bur-0/Bur-0) ou Col-0 (Col-0/Col-0) ou hétérozygotes (Col-0/Bur-0). Figure adaptée de Liégard et al. (2019b).

Cette augmentation n'est cependant pas associée à une modification de la résistance à la hernie puisque l'indice GALA bien que plus faible en condition HEAT qu'en condition STANDARD chez Col-0 (GALA-HEAT = 122.10 et GALA-STD=163.93) est légèrement plus élevé chez l'épiRIL495 (GALA-HEAT = 114.46 et GALA-STD=109.54). Les conditions DROUGHT et FLOOD conduisent à une méthylation plus faible chez l'épiRIL495 que chez Col-0 au niveau d'*AT5G47260* et n'impactent pas le niveau de méthylation de *AT5G47280* ni de MM863. DROUGHT et FLOOD entraînent une augmentation de la méthylation de MM863 chez le génotype Bur-0. L'hyperméthylation de l'épimarqueur MM863 chez Bur-0 en condition DROUGHT s'accompagne d'une plus grande résistance de ce génotype (GALA=69.19) qu'en condition STANDARD (GALA=115.58), tandis qu'en condition FLOOD, il n'y a pas de modulation de la réponse de la plante par rapport à la condition STANDARD (GALA=116.64), suggérant que le niveau de méthylation de l'épimarqueur MM863 n'est pas associé à un phénotype de résistance chez Bur-0.

3.2.2. Impact des conditions abiotiques sur le niveau d'expression des gènes

AT5G47260 et *AT5G47280*

Des travaux précédents ont montré que le niveau de méthylation au niveau des gènes causaux au QTL *Pb-At 5.2* était anti-corrélé avec leur niveau d'expression. Ainsi, lorsque les deux gènes *AT5G47260* et *AT5G47280* sont hyperméthylés, ils ne sont pas exprimés, et inversement (Liégard *et al.*, 2019b) (**Fig. III. 10.**). Pour conforter les résultats mis en évidence au niveau de la méthylation, nous avons extrait l'ARN des feuilles de Col-0 et Bur-0, afin d'étudier l'expression des gènes *AT5G47260* et *AT5G47280* (**Fig. III. 11.**). Tout d'abord, et de manière cohérente avec les travaux réalisés précédemment, nous avons observé une expression relative importante d'*AT5G47260* et d'*AT5G47280* chez le génotype Bur-0 et peu ou pas d'expression chez Col-0, quelque soient les conditions de culture. Chez Bur-0 et à 24 JAS, le niveau d'expression d'*AT5G47260* est impacté positivement par FLOOD comparé à la condition DROUGHT (Wilcoxon test, $p=0.029$). A 31 JAS, chez Col-0, l'expression relative d'*AT5G47260* est significativement plus importante en STANDARD (expression relative = 0.10 +/- 0.04) qu'en DROUGHT (expression relative = 0.01 +/- 0.02, $p=0.029$) et qu'en FLOOD (expression relative = 0.01 +/- 0.01, $p=0.029$) mais reste significativement plus faible que l'expression relative observée chez Bur-0 (expression relative = 3.08 +/- 2.55, $p=0.029$).

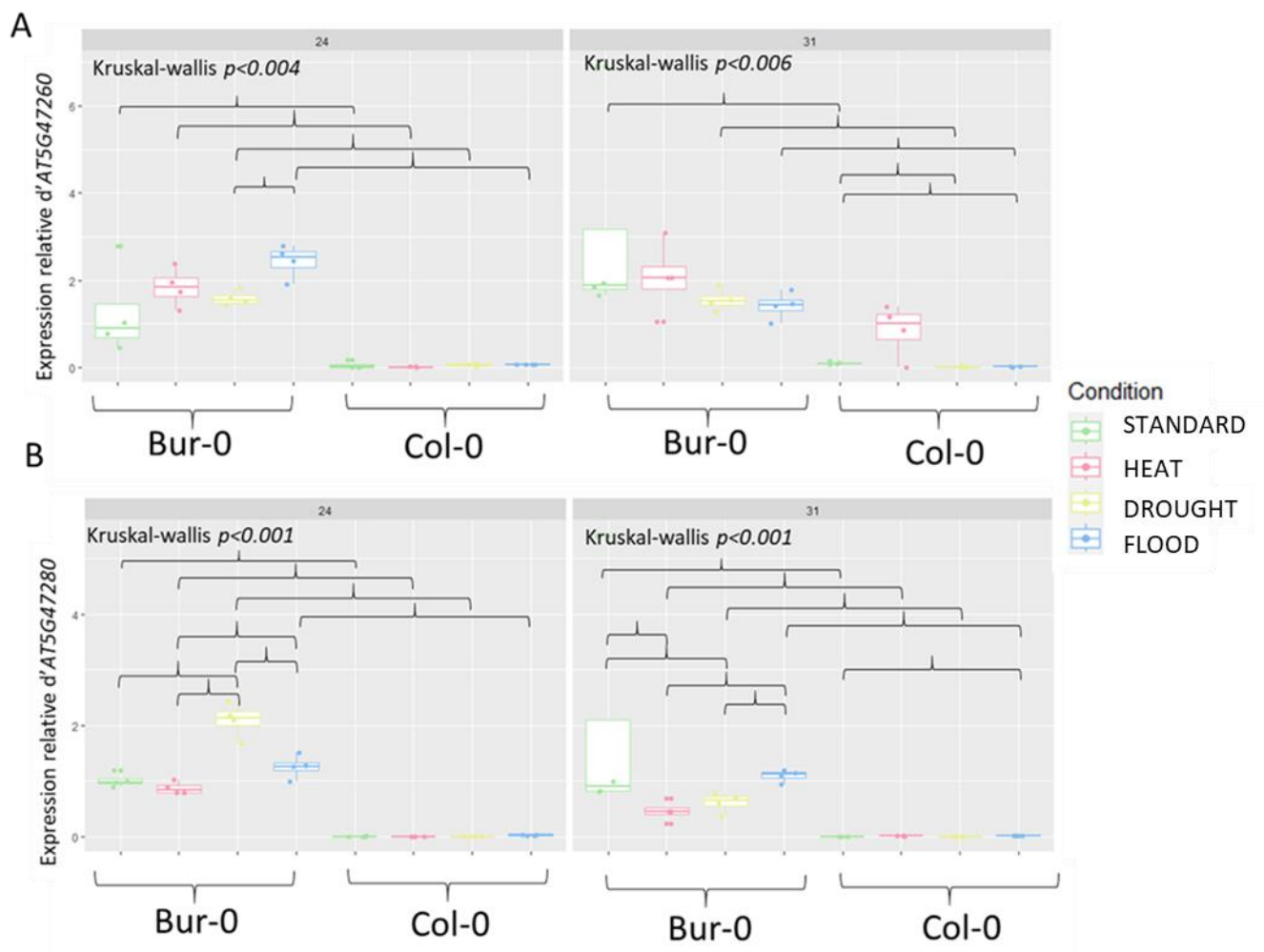


Figure III. 11. : Expression relative des gènes *AT5G47260* et *AT5G47280*. L'expression relative est donnée à 24 jours après semis (boxplots à gauche) et 31 jours après semis (boxplots à droite) pour (A) *AT5G47260* et (B) *AT5G47280*. L'expression des gènes a été quantifiée par RT-qPCR, les données ont été normalisées par rapport au Cp moyen de l'expression de 2 gènes de ménage (*PP2AA2* et *PP2AA3*) et calibrées par rapport à Bur-0 à 24 JAS, selon la méthode de Pfaffl (2001). Les lignes centrales représentent les médianes ; les limites des cases indiquent les 25e et 75e centiles tels que déterminés par le logiciel R, chaque point correspond à l'expression du gène dans un échantillon (pool de l'ARN de 6 plantes constituant un bloc). En vert l'expression en condition STANDARD, en rose en condition HEAT, en bleu en condition FLOOD et en jaune en condition DROUGHT. Des traits indiquent les échantillons présentant des différences significatives selon le test de Wilcoxon ($p < 0.01$).

L'expression relative d'*AT5G47280* est significativement plus importante à 24 JAS chez Bur-0 en FLOOD (expression relative = 1.26 +/- 0.21) par rapport à HEAT (expression relative = 0.87 +/- 0.11, $p < 0.05$) et en DROUGHT (expression relative = 2.10 +/- 0.32), par rapport à STANDARD (expression relative = 1.01 +/- 0.13, $p < 0.05$), HEAT (expression relative = 0.87 +/- 0.11, $p < 0.05$), et FLOOD (expression relative = 1.26 +/- 0.21, $p < 0.05$). A 31 JAS et chez Bur-0, l'expression d'*AT5G47280* est plus importante en STANDARD (expression relative = 2.01 +/- 2.27) par rapport à HEAT (expression relative = 0.46 +/- 0.19, $p = 0.05$) et DROUGHT (expression relative = 0.61 +/- 0.18, $p = 0.05$) et en STANDARD par rapport à FLOOD ($p < 0.05$) chez Col-0.

Ainsi, comme précédemment observé dans la littérature (Kawakatsu *et al.*, 2016a; Liégard *et al.*, 2019b), Bur-0 présente un faible niveau de méthylation au niveau des deux gènes *AT5G47260* et *AT5G47280*, corrélé à leur forte expression en condition STANDARD (**Tableau III.6.** et **Fig. III .11**). Cette forte expression est conservée chez Bur-0 lors de l'application de contraintes abiotiques HEAT, DROUGHT et FLOOD, les conditions abiotiques DROUGHT et FLOOD semblant induire une augmentation de l'expression de ces deux gènes. Chez Col-0, *AT5G47260* et *AT5G47280* sont très faiblement exprimés dans la plupart des conditions et temps cinétiques étudiés. Ces résultats sont contradictoires pour la condition STANDARD et pour *AT5G47260* avec l'analyse du niveau de méthylation décrite ci-dessus mais sont cohérents avec la littérature (Kawakatsu *et al.*, 2016a; Liégard *et al.*, 2019b). Ce faible niveau d'expression est conservé lors de l'application de contraintes abiotiques DROUGHT et FLOOD chez Col-0, seule la condition HEAT semble induire l'expression du gène *AT5G47260* à 31 JAS.

3.2.3. Impact des conditions abiotiques sur le niveau de méthylation de l'épimarqueur MM171 au niveau du QTL^{epi} GALA-Ch2-Standard sur le chromosome 2

En condition STANDARD (**Tableau III.6.B**) et comme attendu (**Fig. III.7**), l'épimarqueur MM171 est hyperméthylé chez Col-0 et l'épiRIL495 à 24 JAS et hypométhylé chez Bur-0. Cependant, ce marqueur devient hypométhylé chez Col-0 à 31 JAS. En condition HEAT, un faible niveau de méthylation a été observé au niveau de MM171 chez les trois génotypes quel que soit le temp cinétique, sans qu'aucun impact cohérent de la condition HEAT sur le phénotype GALA ne soit observé chez Col-0 (diminution de GALA) et epiRIL495 (augmentation de GALA) par rapport à la condition STANDARD.

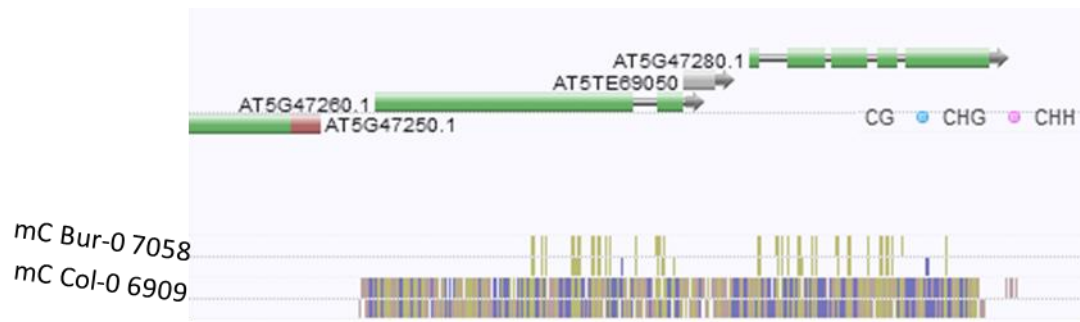


Figure III.12. : Niveaux de méthylation pour les contextes CG, CHG et CHH des gènes *AT5G47260* et *AT5G47280* dans des feuilles de plantes cultivées en conditions classiques. Données issues du projet « 1001 genomes » (Kwakatsu *et al.*, 2016b).

Les contraintes hydriques (DROUGHT et FLOOD) n'impactent pas le niveau de méthylation de l'épimarqueur MM171 chez Col-0 et l'épiRIL495 par rapport à STANDARD. Au niveau de Bur-0, MM171 devient méthylé à 31 JAS en condition FLOOD, sans qu'aucun impact sur le phénotype GALA ne soit observé (GALA similaire en conditions STANDARD et FLOOD).

3.3. Discussion et perspectives

Dans cette partie, nous avons évalué le niveau de méthylation des gènes *AT5G47260* et *AT5G47280* dans trois génotypes : Col-0, epiRIL495 et Bur-0 afin d'établir si ces régions génomiques sont stables au niveau de la méthylation quelque soient les conditions de culture ou s'ils font partie des régions génomiques présentant des variations épigénétiques adaptatives (Heard & Martienssen, 2014). Afin de valider les données de méthylation acquises par McrBC sur les gènes *AT5G47260* et *AT5G47280*, nous avons également évalué leurs niveaux d'expression chez Col-0 et Bur-0.

Cependant, les résultats de niveaux de méthylation obtenus ici par la méthode de Chop-qPCR sont incohérents avec la littérature pour certaines régions. Alors que les résultats obtenus pour le gène *AT5G47280* sont cohérents avec les résultats précédemment obtenus au sein du laboratoire et les données de « 1001 genomes » (Liégard et al., 2019b ; Kawakatsu et al., 2016), les résultats obtenus pour le gène *AT5G47260* ne le sont pas. Nous observons un niveau de méthylation du gène *AT5G47260* faible pour Col-0 en condition STANDARD alors que Liégard et al. (2019) ont démontré que le taux de méthylation de ce gène était supérieur à 75 % dans les mêmes conditions de culture. Cette différence pourrait s'expliquer par le choix de l'organe étudié, Liégard *et al.*, (2019b) ayant travaillé sur racines et nous sur feuilles. Cependant, les données de méthylation issues du programme « 1001 genomes » (Kawakatsu *et al.*, 2016a) (**Fig. III. 12.**), acquises sur feuilles, montrent une hyperméthylation de ce gène pour Col-0, réfutant ainsi cette hypothèse. L'hypothèse d'une mauvaise digestion éventuelle de l'ADN des échantillons est écartée parce que le niveau du gène *AT547280*, qui a été évalué sur les mêmes échantillons que ceux qui ont permis l'étude du niveau de méthylation de *AT5G47260*, est cohérent avec les résultats obtenus précédemment. Enfin, dernière hypothèse la plus probable, la Chop-PCR réalisée dans cette étude n'a permis d'évaluer le niveau de méthylation que d'une petite partie du gène *AT5G47260* (175pb sur un gène de plus de 3kb) et n'est peut-être pas le reflet de la majorité du gène.



Figure III.13.: Localisation des amorces définies pour l'étude du niveau de méthylation des différentes régions génomiques évaluées. Localisation des amorces de Chop-qPCR au niveau des gènes *AT5G47260* (A), *AT5G47280* (B) et des épimarqueurs MM171 (C) et MM863 (D). Pour A : la région en rose correspond au gène *AT5G47260* et pour B : la région en bordeaux correspond au gène *AT5G47280*. Pour C et D : la barre en grise correspond à la région d'hypo- / d'hyper-méthylation selon le génotype. Les petites barres en rose correspondent aux amorces utilisées pour la Chop-qPCR et les barres en rouge au fragment amplifié lors de la Chop-qPCR pour chacune des régions génomiques. Les doubles barres noires correspondent à la séquence génomique de chaque région évaluée.

Cette dernière hypothèse est étayée par le fait que les données d'expression acquises dans cette étude sont cohérentes avec les résultats antérieurs du laboratoire avec une expression relative du gène *AT5G47260* très faible voire nulle chez Col-0 par rapport à Bur-0. Le niveau de méthylation de la portion du gène étudiée ici par Chop-PCR ne serait ainsi pas anti-corrélé au niveau d'expression du gène (**Fig. III. 13.**). Ces résultats, acquis en conditions STANDARD et de contraintes abiotiques sont préliminaires et des analyses supplémentaires sont donc nécessaires afin de déterminer avec certitude le niveau de méthylation et d'expression de l'ensemble de cette région dans les différentes conditions de culture et dans les différents tissus. Une absence de corrélation entre le niveau de méthylation et le niveau d'expression du gène est également possible, comme cela été souligné lors de l'étude de Furci *et al.* (2019). Cependant, dans le cas du QTL *Pb-At 5.2*, les résultats précédents obtenus au sein du laboratoire semblent soutenir une corrélation négative entre la méthylation de la région et le niveau d'expression des gènes (Liégard *et al.*, 2019b) (**Fig. III.10.**).

Malgré ces limites techniques et certaines incohérences, le niveau de méthylation de ces deux gènes ne semble pas bouger en fonction des conditions abiotiques et ne serait donc pas la cause de l'apparition/disparition du QTL *Pb-At 5.2* (Gravot *et al.*, 2016a). Il est également envisageable que ces deux gènes, *AT5G47260* et *AT5G47280*, ne soient pas les gènes causaux des trois QTL^{epi} détectés en DROUGHT et FLOOD à la fin du chromosome 5.

Nous avons également évalué le niveau de méthylation de 2 des 126 épimarqueurs (MM863 et MM171) dans les différentes conditions de culture et une variation de leur niveau de méthylation a été observée en réponse à certaines contraintes abiotiques chez Col-0, l'épiRIL495 et Bur-0. Cependant, lors de cette étude, nous n'avons pas ajouté de lignée epiRIL présentant un épiallèle hypométhylé au niveau des épimarqueurs MM171 et MM863. Plusieurs lignées pourraient ainsi être ajoutées dont huit epiRIL présentant une hypométhylation dérivée du parent *ddm1-2* au niveau des marqueurs MM171 et MM863 (epiR114, epiR122, epiRII216, epiRIL229, epiRIL232, epiRIL363, epiRIL438 et epiRIL98).

Chez Bur-0, l'épimarqueur MM863 présente, de manière incohérente avec les données de la littérature (Kawakatsu *et al.*, 2016a), un niveau de méthylation faible dans la condition STANDARD. Cet épimarqueur présente également une hypométhylation en condition HEAT et une hyperméthylation en DROUGHT et FLOOD. Chez Col-0 et l'épiRIL495, l'épimarqueur MM863 est hyperméthylé en STANDARD comme attendu et reste stable dans toutes les conditions abiotiques testées.

Chez Col-0 et l'épiRIL495, l'épimarqueur MM171, hyperméthylé en STANDARD, semble passer à l'état hypométhylé suite à l'application de la contrainte HEAT. La modulation du niveau de méthylation de certains épimarqueurs par une condition de culture pourrait dans certains cas expliquer la non-détection de certains QTL^{epi} dans cette condition de culture, si cette modulation du niveau de méthylation affecte également le gène causal (**Fig. III.5.**). La non-détection du QTL^{epi} GALA-Ch2-CLASS sous la condition HEAT pourrait ainsi être potentiellement due à la modulation de la méthylation du MM171 si celle-ci affecte également le gène causal sous ce QTL^{epi}. Cependant, cela n'explique pas l'absence de détection de ce QTL^{epi} dans les contraintes abiotiques DROUGHT et FLOOD, pour lesquelles le niveau de méthylation de MM171 reste élevé. Ainsi, dans le cas des deux épimarqueurs étudiés, le niveau de méthylation des épimarqueurs ne semble pas impacter la perte ou le gain de détection d'un QTL^{epi} selon les conditions abiotiques. Cependant, cette étude n'ayant été menée que sur 2 des 126 épimarqueurs de la carte épigénétique, il reste possible qu'une modification du niveau de méthylation au niveau des 124 autres épimarqueurs impacte également le niveau de méthylation du(es) gène(s) causal(aux) par exemple par des phénomènes appelés de « spreading » (Ahmed *et al.*, 2011) ou par des réversions du niveau de méthylation de régions de grande taille (incluant épimarqueur et locus causal du QTL^{epi}) observées lors de la création de la population epiRIL (Cortijo, 2012; Colome-Tatche *et al.*, 2012).

Dans ces travaux, nous avons montré que le niveau de méthylation au niveau de l'épimarqueur MM863 était stable chez Col-0 et l'épiRIL495 (Colome-Tatche *et al.*, 2012). En revanche, le niveau de méthylation de cet épimarqueur est instable chez Bur-0 en fonction des conditions abiotiques (hypométhylation en STANDARD et HEAT et hypométhylation en DROUGHT et FLOOD). Il serait ainsi possible que le fond génétique (type Col-0 ou type Bur-0) conditionne la stabilité des épimarqueurs. Cependant, nous manquons de données pour confirmer ou réfuter cette hypothèse et l'évaluation des autres épimarqueurs identifiés dans la population epiRIL chez Col-0 et Bur-0 pourrait permettre de comprendre davantage le rôle du fond génétique dans la stabilité des épimarqueurs.

A l'issue de cette étude, même si des modifications du niveau de méthylation ont été observées notamment au niveau des épimarqueurs MM171 et MM863 dans des conditions de culture contraintes, de nombreuses incertitudes demeurent du fait de limitations techniques (Chop-PCR) mais également de leur dépendance au fond génétique (Bur-0 et Col-0 ; présence de 74 variants génétiques dans la population epiRIL et interactions épistatiques entre les régions du génome contrôlées par des variations de méthylation dou de séquences).

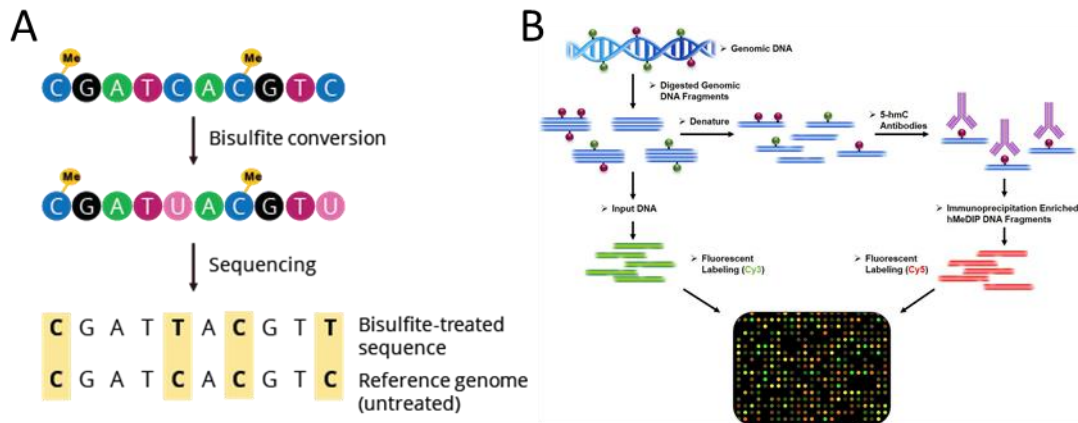


Figure III.14. : Aperçu des différentes méthodes permettant la quantification du niveau de méthylation de régions génomiques. A) Principe de la conversion au bisulfite de l'ADN. Le traitement au bisulfite entraîne une désamination des cytosines non méthylées en uracile (U). L'étape suivante de réplication de l'ADN via un séquençage ou une étape d'amplification de l'ADN par PCR entraîne la réplication des uraciles en thymines (T). Une comparaison des régions séquencées issues d'ADN traité au bisulfite et d'ADN non traité au bisulfite permet l'identification des cytosines méthylées. B) Principe du Me-DIP CHIP. Cette méthode commence par une digestion de l'ADN en fragments suivie d'une dénaturation de l'ADN. Ensuite, l'utilisation d'anticorps anti 5-hmC (anti cytosine méthylée), permet la capture de l'ADN présentant un enrichissement en cytosines méthylées. La comparaison des séquences présentant des cytosines méthylées capturées par les anticorps anti 5-hmC à celles non traitées permet d'identifier les régions du génome fortement méthylées. Les séquences enrichies en cytosines méthylées sont liées à une sonde fluorescente rouge et les séquences non enrichies en cytosines méthylées sont liées à une sonde fluorescente verte. Cependant, cette méthode, contrairement à (A), n'est pas en mesure de donner le niveau de méthylation de chaque cytosine. Figure Adaptée de nbis-workshop-epigenomics.2022 et www.creativebiomart.net.

D'autres méthodes d'évaluation de la méthylation de l'ADN pourraient être envisagées afin de préciser les résultats obtenus par la méthode McrBC-qPCR. Le séquençage au bisulfite (Li *et al.*, 2019a; Omony *et al.*, 2020) permettrait de connaître le niveau de méthylation de chaque cytosine des régions différentiellement méthylées utilisées en tant qu'épimarqueurs ou des gènes candidats dans les différentes conditions de culture. Le séquençage au bisulfite repose sur la capacité du bisulfite à désaminer les cytosines non méthylées en uracile (U) qui sont ensuite transcrites lors d'une réaction PCR (Polymerase Chain Reaction) en thymine (T). Un alignement des séquences d'ADN d'un même échantillon converti ou non au bisulfite permet alors d'identifier les cytosines méthylées à la base près (**Fig. III. 14.A**). Ces conversions au bisulfite peuvent se faire sur des régions ciblées en les couplant avec des approches de PCR et de séquençage. Il est également possible d'étudier des régions génomiques plus importantes. La méthode *Whole Genome Bisulfite Sequencing* (WGBS), ou séquençage du génome complet au bisulfite, permettrait ainsi de séquencer le méthylome de Col-0 et *ddm1-2* (ou d'une epiRIL présentant une majorité d'épiallèles déméthylés afin de se rapprocher au plus près de *ddm1-2* : par exemple les epiRIL114, 208 et 232 présentent une hypométhylation au niveau de 91, 91 et 97 des 126 épimarqueurs respectivement) sous différentes contraintes abiotiques telles que celles que nous avons expérimentées et ainsi évaluer l'impact de ces contraintes sur la méthylation de l'ensemble du génome et notamment sur les 126 épimarqueurs identifiés précédemment par Colome-Tatche *et al.* (2012). La méthode MeDIP-chip, utilisée pour créer la carte épigénétique de la population epiRIL (Colome-Tatche *et al.*, 2012), pourrait également permettre d'évaluer l'impact des conditions abiotiques sur la méthylation des épimarqueurs. Cette méthode, moins couteuse que le WGBS mais qui ne permet pas de quantifier le niveau de méthylation de chaque cytosine, ne dépend pas de la conversion au bisulfite et repose sur l'enrichissement par immunoprécipitation des cytosines méthylées (Cortijo *et al.*, 2014b) (**Fig. III.14. B**).

Par ailleurs, plusieurs approches pourraient être mises en place pour identifier les gènes causaux aux QTL^{epi} localisés à la fin du chromosome 5. Dans un premier temps, une approche de cartographie fine au niveau de ces QTL^{epi} pourrait permettre de réduire leurs intervalles de confiance. Pour cela, il s'agit d'identifier les lignées recombinantes dans ces régions au sein des 123 lignées utilisées dans cette étude voire si nécessaire dans les 382 autres lignées epiRIL que nous n'avons pas utilisées et de densifier les intervalles de confiance en épimarqueurs.

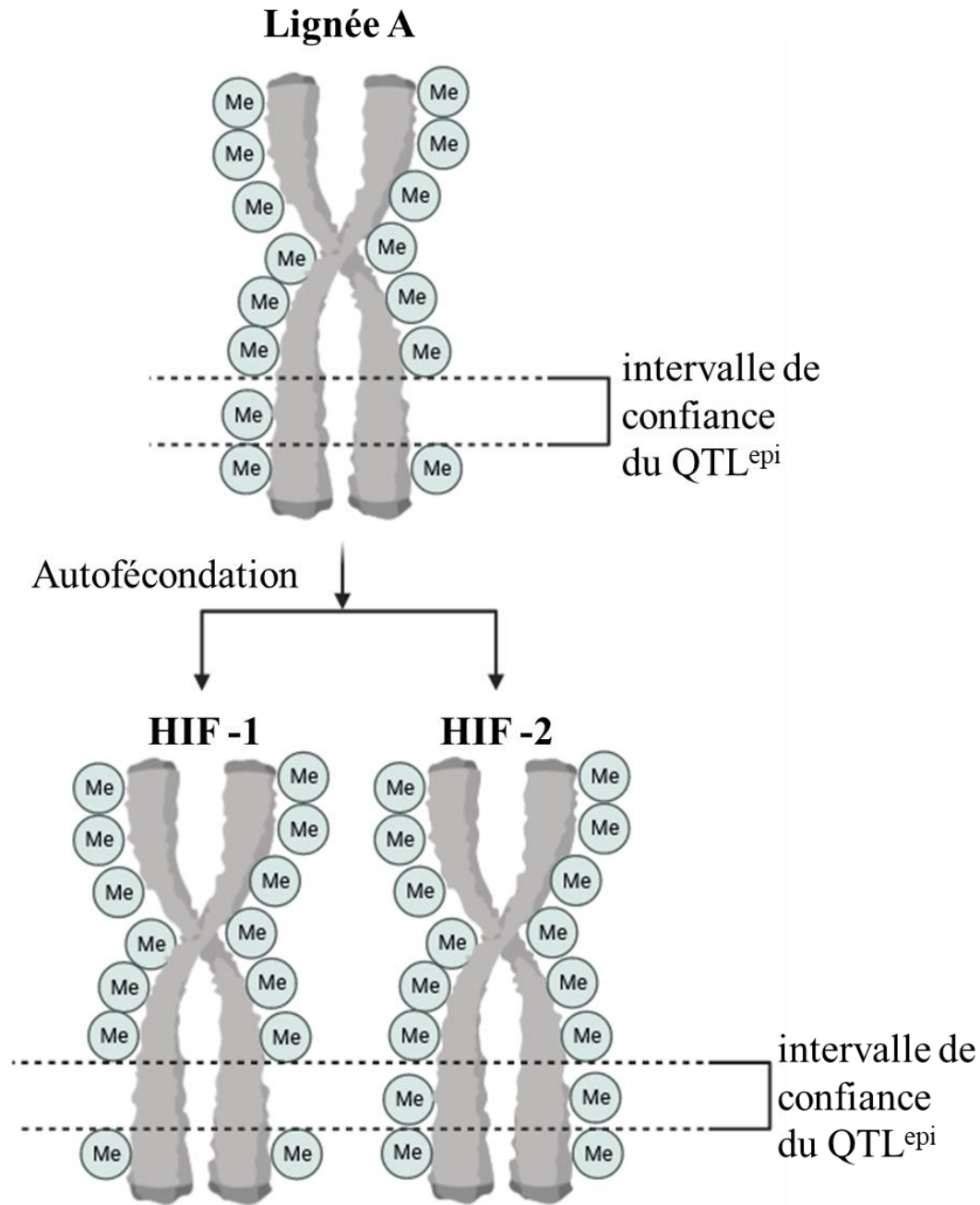


Figure III.15. : Principe de création des lignées Heterogeneous Inbred Family (HIF). La lignée A présente une hétérozygotie au niveau de l'intervalle de confiance d'un QTL^{epi} d'intérêt et une homozygotie du reste du génome et de l'épigénome. L'autofécondation de la lignée A conduit à la production de lignées ségrégant au niveau de cette région génomique. La lignée HIF-1 présente l'épiallèle homozygote hypométhylé au niveau de l'intervalle de confiance du QTL^{epi} d'intérêt et la lignée HIF-2 présente l'épiallèle homozygote hyperméthylé au niveau de l'intervalle de confiance du QTL^{epi} d'intérêt.

Afin d'évaluer l'effet de ces QTL^{epi} en s'affranchissant des variants génétiques et des interactions épistatiques avec le reste du génome et/ou de l'épigénome, il pourrait être envisagé de produire des *Heterogenous Inbred Family* : HIF (**Fig. III.15**) pour les QTL^{epi} les plus intéressants. Pour créer ces lignées HIF, il est nécessaire d'identifier une lignée epiRIL qui est homozygote sur quasiment tout son génome et/ou épigénome mais présente une hétérozygotie au niveau de la région d'intérêt (en génération F5, 6.25% d'hétérozygotie épigénétique résiduelle en théorie) contenant l'intervalle de confiance d'un QTL^{epi}. Cette lignée sera autofécondée et conduira à des plantes présentant une homozygotie de l'épiallèle hypométhylé ou une homozygotie de l'épiallèle hyperméthylé. Ces couples de lignées seront ainsi homozygotes sur la totalité de leur génome et/ou épigénome sauf au niveau de la région contenant l'intervalle de confiance de QTL^{epi} d'intérêt. Ces lignées HIF pourront ainsi être utilisées pour 1) identifier par des approches de transcriptomique ou de métabolique les mécanismes et voies de réponses contrôlés par le QTL^{epi} d'intérêt et évaluer l'impact des conditions abiotiques sur le niveau de méthylation de cette région génomique en s'affranchissant de l'effet fond génétique. Des lignées HIF sont déjà disponibles pour le QTL *PbAt 5.2* (**Figure III. 10.**). Ces lignées, qui présentent un fond génétique identique, combinaison des génomes de Bur-0 et de Col-0, hormis dans la région du QTL *Pb-At 5.2* pour laquelle la lignée 10499 présente les (épi)allèles de Bur-0 et la lignée 13499 présente les (épi)allèles de Col-0, pourraient ainsi être utilisées afin d'évaluer le niveau de méthylation notamment des épimarqueurs en fonction des conditions abiotiques.

4. Impact de contraintes abiotiques combinées sur l'architecture épigénétique de la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie

Les plantes subissent rarement des contraintes abiotiques isolées et l'intensité et la fréquence de ces combinaisons de stress abiotiques sont souvent amplifiées par le changement climatique actuel (Mareri *et al.*, 2022; IPCC, 2023). L'étude de l'effet de conditions environnementales abiotiques combinées sur les plantes est complexe, et plusieurs travaux soulignent que cet effet ne peut pas être prédit en se basant uniquement sur l'étude des effets de chaque stress abiotique appliqué individuellement (Villalba-Bermell *et al.*, 2021; Zandalinas & Mittler, 2022). Dans l'article soumis à *Frontiers in Plant Science*, nous avons démontré que les différentes conditions abiotiques appliquées individuellement avaient un effet significatif mais différent sur le développement des epiRIL et sur leur réponse à l'infection par *P. brassicae*.

Tableau III. 7. : Résultats de la gamme d'hôtes différentiels de Some et al. (1996) répétée deux fois en condition STANDARD, une fois en contraintes combinées DROUGHTxHEAT et une fois en contraintes combinées FLOODxHEAT. Les géotypes de la gamme d'hôtes sont classés selon leurs symptômes racinaires en suivant les classes détaillées par Manzanares-Dauleux et al. (2000). Le nombre de plantes dans chaque classe permet de calculer l'indice pathologique (DI) décrit précédemment au chapitre II. Un géotype présentant un indice pathologique supérieur à 60 est considéré comme sensible. Un géotype présentant un indice pathologique inférieur à 25 est considéré comme résistant à la hernie. Un géotype présentant un indice pathologique compris entre 25 et 60 présente une résistance partielle.

Conditions abiotiques STANDARD							
Gamme Hôtes	0	1	2	2+	3	Nombre total de plantes par géotype	DI
ECD5			3	3		6	63
ECD6	2	1				3	8
Ecd10		3	1			4	31
Brutor	4		1	1		6	21
CB151	1					1	0
C7	3					3	0
C10	6					6	0
Mendel	6					6	0

Conditions abiotiques STANDARD							
Gamme Hôtes	0	1	2	2+	3	Nombre total de plantes par géotype	DI
ECD5			4		1	5	60
ECD6	1		1			2	25
Ecd10	4	3				7	11
Brutor	4		2			6	17
CB151	3					3	0
C7	5					5	0
C10	6					6	0
Mendel	6					6	0

Contraintes abiotiques DROUGHTxHEAT							
Gamme Hôtes	0	1	2	2+	3	Nombre total de plantes par géotype	DI
ECD5				5		5	75
ECD6	1	1	2			4	31
Ecd10	1	2	2			5	30
Brutor	1					1	0
CB151	4					4	0
C7	6					6	0
C10	6					6	0
Mendel	2					2	0

Contraintes abiotiques FLOODxHEAT							
Gamme Hôtes	0	1	2	2+	3	Nombre total de plantes par géotype	DI
ECD5			1	2	3	6	83
ECD6	1	2				3	17
Ecd10	3	2		1		6	21
Brutor	5					5	0
CB151	2					2	0
C7	3	1				4	6
C10	6					6	0
Mendel	6					6	0

En effet, en condition HEAT les plantes sont plus grandes, avec de plus grosses galles mais possèdent un système racinaire encore fonctionnel avec un DI et un GALA réduit par rapport à la condition STANDARD. Les conditions DROUGHT et FLOOD conduisent à des plantes plus petites présentant de plus petites galles qu'en condition STANDARD. En condition DROUGHT, les symptômes de la hernie (DI et GALA) sont réduits alors que dans FLOOD les symptômes sont légèrement plus importants qu'en condition STANDARD. Quel est l'impact de la combinaison de contraintes abiotiques ponctuelles telles qu'une hausse modérée de la température et la modification du statut hydrique du sol (une sécheresse ou un engorgement) sur l'interaction *A. thaliana* - *P. brassicae* ? L'architecture épigénétique contrôlant la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie est-elle modulée par la combinaison des contraintes abiotiques ?

4.1. Impact des conditions combinées sur la réponse des parents et de la population epiRIL à la hernie

Afin d'évaluer l'impact de la combinaison de contraintes abiotiques ponctuelles sur le pathosystème *A. thaliana* - *P. brassicae*, la réponse de la population epiRIL précédemment utilisée a été caractérisée vis-à-vis de l'isolat eH de *P. brassicae* dans les 2 combinaisons de contraintes abiotiques suivantes : la combinaison sécheresse et hausse de température de 5°C, appelée par la suite DROUGHTxHEAT et la combinaison engorgement et hausse de température de 5°C, appelée par la suite FLOODxHEAT. Ces contraintes ont été appliquées de manière simultanée 7 jours après l'inoculation et pour une durée de 7 jours. Seule une répétition biologique comprenant deux blocs et 6 plantes par lignée et par bloc a été évaluée vis-à-vis de l'infection par l'isolat eH pour chacune des deux combinaisons de contraintes. Sept jours après la fin de l'application des deux contraintes, les plantes ont été phénotypées au travers des traits suivants : longueur de la plus longue feuille des plantes inoculées (Lfi), l'indice pathologique (DI), la surface des galles (GA) et l'indice GALA. Les variables GA et DI, qui évaluent respectivement la taille de la galle et la gravité de la maladie, ont permis d'évaluer les symptômes de la hernie et la fonctionnalité du système racinaire. De plus, comme les epiRIL ont montré une croissance foliaire différente en condition STANDARD et, pour une même epiRIL, des différences de croissance entre les conditions abiotiques, l'indice GALA, qui considère la croissance foliaire (Lfi) standardisée par la taille des galles (GA), a été calculé pour comparer les symptômes entre les epiRIL au sein d'une même condition et entre les epiRIL dans les différentes conditions abiotiques.

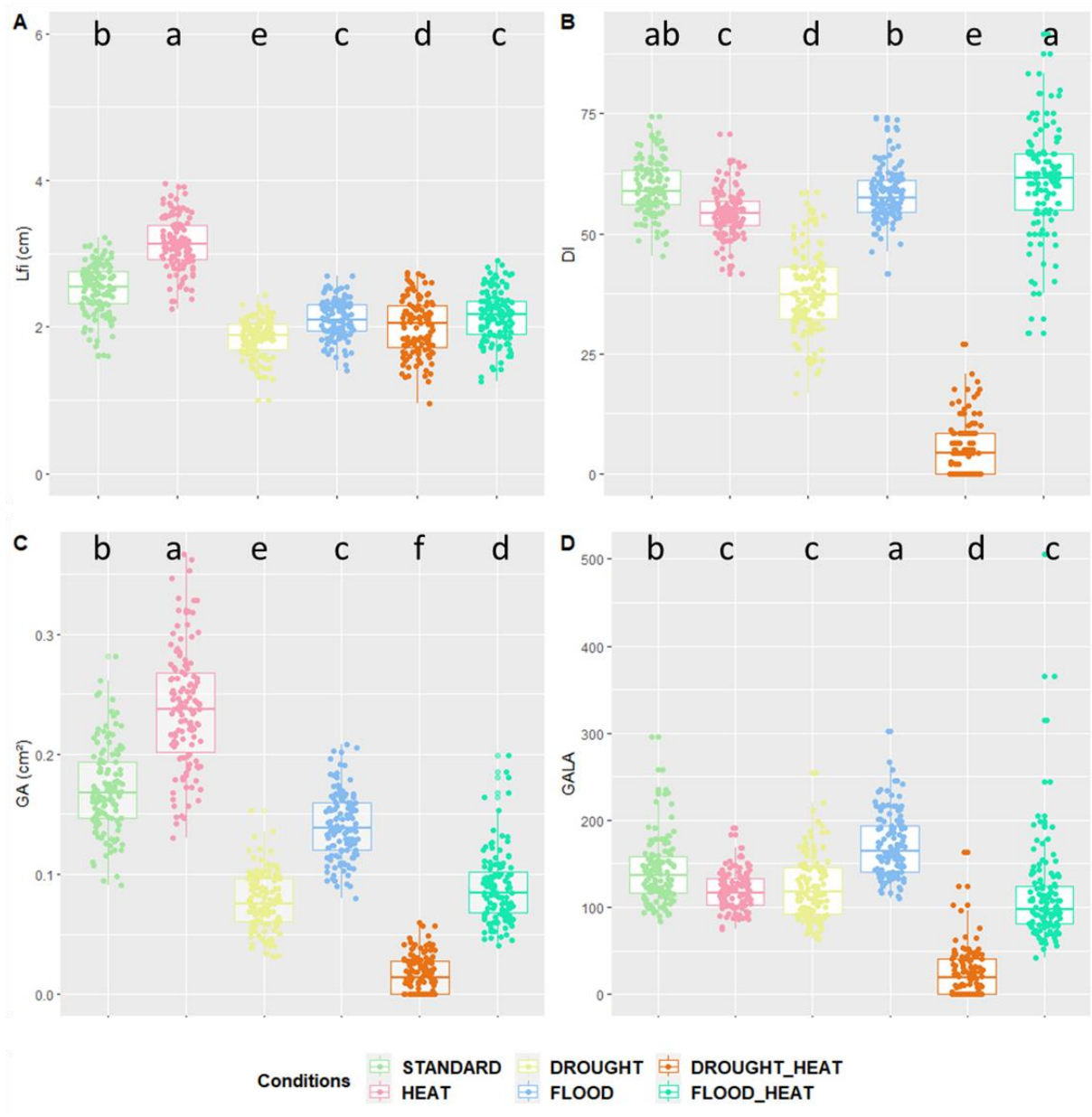


Figure III. 16. : Impact des contraintes abiotiques combinées sur différents traits phénotypiques. A) longueur de la plus grande feuille des plantes inoculées (Lfi, cm), B) Indice pathologique (DI), C) surface des galles (GA, cm²) et D) et indice GALA. Pour chaque trait, les lettres représentent les conditions significativement différentes d'après le test de Kruskal-Wallis, p -value < 0,05.

La réussite de l'infection et la conformité du pathotype de l'isolat eH utilisé ont été confirmées en évaluant le comportement de la gamme d'hôtes différentiels en conditions classiques de culture (STANDARD) (**Tableau III.7.**). La gamme d'hôtes différentiels a été répétée quatre fois lors de l'expérimentation : deux répétitions ont été réalisées dans les conditions de culture STANDARD, une répétition a été placée en conditions contraintes combinées DROUGHTxHEAT et une répétition a été placée en conditions de contraintes combinées FLOODxHEAT. En condition STANDARD ainsi qu'en conditions de contraintes combinées, ECD5, le témoin sensible universel, présente un indice pathologique supérieur ou égal à 60, validant ainsi l'infection. Toutefois, nous n'avons pas pu valider le pathotype P1 de l'isolat utilisé. En effet en condition STANDARD, les génotypes ECD6, ECD10 et Brutor sont peu infectés ($DI < 30$ dans les deux répétitions). En condition DROUGHTxHEAT, ECD6 et ECD10 présentent des indices pathologiques légèrement supérieurs ($DI > 30$) mais Brutor ne présente pas de symptômes. Dans la condition FLOODxHEAT, ECD6 et ECD10 présentent un indice pathologique inférieur à 20. Ces résultats peuvent s'expliquer par des difficultés de germination et de croissance pour certains génotypes comme Brutor. Ces résultats nécessiteront d'être confirmés à l'avenir avec au moins une autre répétition biologique.

4.1.1. Impact de la condition combinée DROUGHTxHEAT sur la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie des crucifères

Sous la condition abiotique combinée DROUGHTxHEAT, Col-0 présente une longueur de feuille moyenne de 2.7 cm, un indice pathologique (DI) moyen de 8.34, une surface moyenne des galles de 0.03 cm² et un indice GALA moyen de 21.02. *ddm1-2* présente une longueur moyenne des feuilles de 1.98 cm, un indice pathologique moyen de 41.04, une surface des galles et un indice GALA moyen de 0.03 et 36.65, respectivement. Pour la population epiRIL, les valeurs de Lfi sont comprises entre 0.952 et 2.75 cm, les valeurs de DI entre 0 et 27.08 ; les valeurs de GA entre 0 et 0.06 cm² et les valeurs de GALA entre 0 et 163.22 (**Fig. III.16.**). Par rapport à STANDARD (**Fig. III.17.**), la combinaison de contraintes DROUGHTxHEAT a peu d'impact sur la taille des feuilles de Col-0 et de la population epiRIL et conduit à une forte réduction de l'indice pathologique, de la surface des galles et de la surface des galles standardisée par la surface des feuilles (réduction de 85% pour DI, de 88% pour GA, et de 87% pour GALA chez Col-0 et réduction de 91% pour DI, de 90% pour GA, et de 83% pour GALA au sein de la population epiRIL).

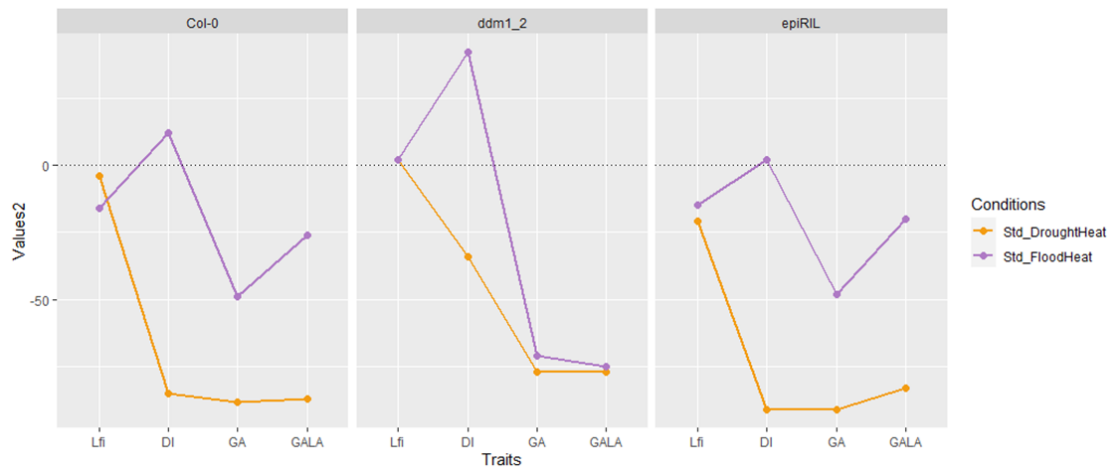


Figure III.17. : Impact de chaque condition abiotique sur A) Col-0, B) *ddm1-2* et C) la population epiRIL par rapport à leur comportement en condition STANDARD. L'impact de chaque condition sur la taille des feuilles des plantes inoculées (Lfi), l'indice pathologique (DI), la surface des feuilles (GA) et la surface des galles standardisées par la surface des feuilles (GALA) par rapport à la condition STD correspond à la valeur absolue de la différence entre la condition STANDARD (STD) et chaque contrainte abiotique. Ainsi, si l'effet est positif, la valeur du trait est plus grande dans la condition abiotique que dans la condition STANDARD et inversement. Des valeurs proches de 0 (ligne en pointillés) correspondent à des traits similaires entre la condition STANDARD et la condition abiotique. Il est possible de retrouver cinq comparaisons avec STANDARD : HEAT, DROUGHT, FLOOD, DROUGHTxHEAT et FLOODxHEAT.

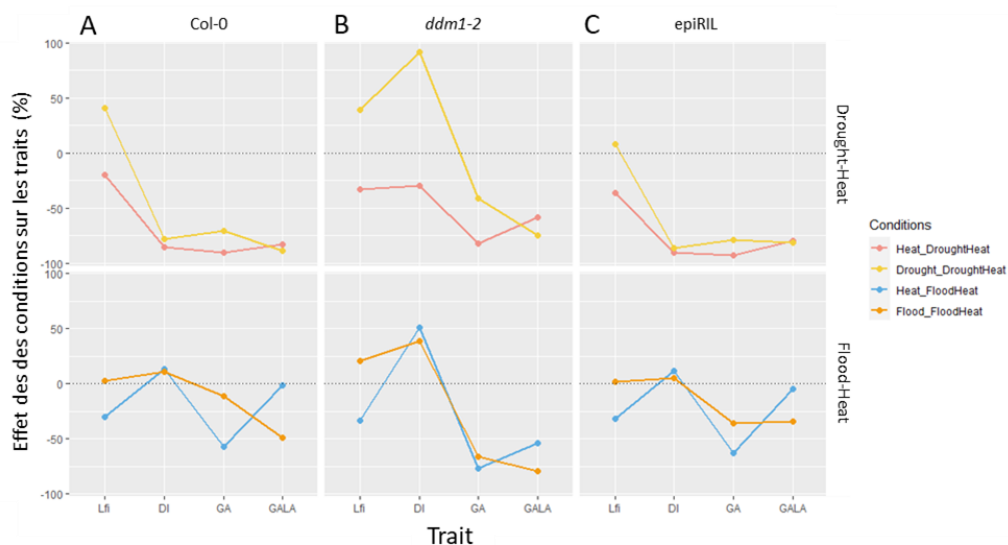


Figure III.18. : Impact des contraintes abiotiques combinées sur A) Col-0, B) *ddm1-2* et C) la population epiRIL par rapport à l'application des contraintes seules. L'impact de chaque combinaison de contraintes sur la taille des feuilles des plantes inoculées (Lfi), l'indice pathologique (DI), la surface des feuilles (GA) et la surface des galles standardisées par la surface des feuilles (GALA) par rapport à la condition abiotique seule correspond à la valeur absolue de la différence entre les contraintes seules et chaque combinaison de contraintes. Ainsi, si l'effet est positif, la valeur du trait est plus grande dans la condition combinée que dans la condition seule et inversement. Des valeurs proches de 0 (ligne en pointillés) correspondent à des traits similaires entre la condition abiotique seule et la combinaison de contraintes. Quatre comparaisons sont présentées: HEAT vs DROUGHTxHEAT, DROUGHT vs DROUGHTxHEAT, HEAT vs FLOODxHEAT et FLOOD vs FLOODxHEAT.

Pour *ddm1-2*, la combinaison DROUGHTxHEAT n'a pas davantage impacté la taille des feuilles par rapport à la condition STANDARD tandis que DI, la surface des galles et l'indice GALA sont diminués de 34%, 77% et 77% respectivement.

En condition DROUGHTxHEAT et comparée à DROUGHT (**Fig. III.18.**), Col-0 présente des feuilles plus grandes (+ 41 %) et une taille des galles, un indice pathologique et un indice GALA plus faibles (réduction de 71, 78 et 89%). La population epiRIL ne montre pas d'impact de DROUGHTxHEAT sur Lfi comparé à DROUGHT comme chez Col-0 mais présente une réduction de DI, GA et GALA similaire à celles observées chez Col-0. Comparée à la condition HEAT, les plantes cultivées (Col-0 et les epiRIL) en DROUGHTxHEAT présentent des valeurs phénotypiques plus faibles quel que soit le trait (réduction entre 20% pour Lfi et 90% pour GA chez Col-0 et entre 36.3% pour Lfi et 93.2% pour GA au sein de la population epiRIL). *ddm1-2*, sous la condition DROUGHTxHEAT, présente des feuilles et un DI plus grands (de 39 et 92%, respectivement) et une surface de galles et une surface de galles standardisée par la taille des feuilles plus faibles (réduction de 41 et 75%) par rapport à DROUGHT. Par rapport à HEAT, *ddm1-2* présente sous la condition DROUGHTxHEAT une diminution de Lfi, DI, GA et GALA.

En résumé, la condition combinée DROUGHTxHEAT entraîne une forte réduction des symptômes (indice pathologique, surface des galles et indice GALA) chez Col-0, la population epiRIL et *ddm1-2* et conduit à un impact plus important que les contraintes appliquées seules : la contrainte combinée de HEAT et DROUGHT entraînant un effet plus négatif sur les différents traits que HEAT et DROUGHT séparément.

4.1.2. Impact de la condition combinée FLOODxHEAT sur la réponse d'*Ara-bidopsis* à la hernie des crucifères

Sous la condition abiotique combinée FLOODxHEAT, Col-0 présente une longueur de feuille moyenne de 2.35 cm, un indice pathologique (DI) moyen de 62.5, une surface moyenne des galles de 0.13 cm² et un indice GALA moyen de 120.75. *ddm1-2* présente une longueur moyenne des feuilles de 1.98 cm, un indice pathologique moyen de 88.1, une surface des galles et un indice GALA moyen de 0.03 et 40.32, respectivement. Pour la population epiRIL, Lfi est compris entre 1.26 et 2.91 cm, DI entre 29.17 et 91.67, GA entre 0.041 et 0.199 cm² et GALA entre 41.45 et 504.87 (**Fig. III.16.**).

Comparée à la condition STANDARD (**Fig. III.17.**), en conditions de contraintes combinées FLOODxHEAT, Col-0 présente une faible modulation de la taille des feuilles et de l'indice pathologique, une réduction de 49% de la surface des galles et de 26% de l'indice GALA. De manière similaire, il y a peu d'impact de la condition FLOODxHEAT sur la réponse de la population epiRIL au niveau de Lfi, DI, et GALA. Seul GA est réduit de 47% par rapport à la condition STANDARD. Pour *ddm1-2*, la condition FLOODxHEAT n'impacte pas davantage la taille des feuilles comparée à la condition STANDARD mais conduit à une augmentation de 42% de l'indice pathologique et à une forte réduction de GA et GALA (réduction de 71 et 75 %, respectivement).

Comparé à FLOOD (**Fig. III.18.**), FLOODxHEAT a peu d'impact sur Lfi et DI pour Col-0 et la population epiRIL mais conduit à une diminution en moyenne de 43% de GALA. Comparé à HEAT, FLOODxHEAT n'a pas d'impact sur DI et sur GALA au niveau de l'écotype Col-0 et de la population epiRIL mais conduit à une réduction de Lfi (30% et 31%, chez Col-0 et la population epiRIL, respectivement) et de GA (57% et 62%, chez Col-0 et la population epiRIL, respectivement). Chez *ddm1-2*, l'application de FLOODxHEAT par rapport à FLOOD conduit à des feuilles et un DI légèrement plus importants tandis qu'il est possible d'observer une réduction de la surface des galles et de la surface des galles standardisées par la surface des feuilles plus importante (réduction de 66 et 79%, respectivement). En comparant la condition FLOODxHEAT à HEAT, le génotype *ddm1-2* présente de plus petites feuilles, galles et GALA (réduction entre 33 et 77%) et un indice pathologique plus fort de 51%.

En résumé, la condition FLOODxHEAT conduit à des symptômes (GA et GALA) moins importants que dans les conditions STANDARD chez Col-0, *ddm1-2* et la population epiRIL et un indice pathologique plus important chez *ddm1-2*. Par rapport à FLOOD et HEAT, FLOODxHEAT entraîne une réduction de la taille des galles (GA) ou de GALA, respectivement.

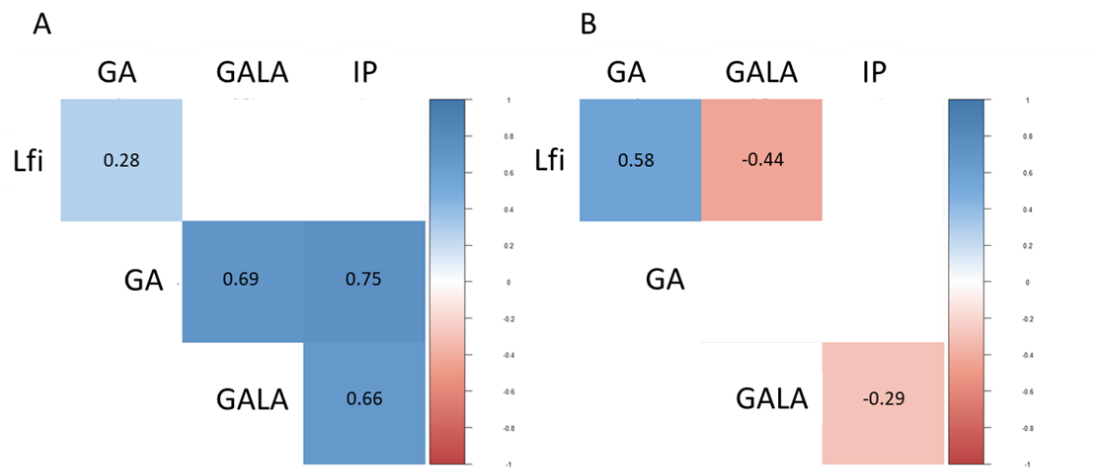


Figure III. 19. : Corrélations entre les traits dans les conditions de contraintes combinées A) DROUGHTxHEAT et B) FLOODxHEAT. Seules les corrélations significatives avec une valeur $p < 0.05$ sont présentées.

4.2. Corrélation entre les traits et interactions entre les contraintes abiotiques

Dans les conditions abiotiques appliquées individuellement, nous avons mis en évidence une forte corrélation positive entre la taille des feuilles et la surface des galles. Sous des contraintes abiotiques combinées, cette corrélation positive est retrouvée (Pearson $r = 0.28$ en DROUGHTxHEAT et $r = 0.58$ en FLOODxHEAT) suggérant que le développement des galles n'est pas indépendant de la taille des feuilles et que les caractères Lfi et GA sont potentiellement contrôlés par des facteurs épigénétiques communs, quelles que soient les conditions de culture (**Fig. III. 19.**). L'existence d'une corrélation positive ou négative entre les variables peut dépendre des conditions abiotiques, comme l'illustre la corrélation entre GALA et DI, positive dans le cas de DROUGHTxHEAT (Pearson $r = 0.69$) et négative dans le cas de FLOODxHEAT (Pearson $r = -0.29$).

Il y a une synergie négative entre la sécheresse et l'augmentation modérée de la température pour les traits DI, GA et GALA, puisque l'effet des conditions abiotiques combinées sur chacun de ces traits est plus négatif que l'additivité prédite (**Tableau III. 8.**). Pour le trait Lfi, l'effet de DROUGHTxHEAT est très proche de celui de DROUGHT, il semblerait ainsi que la contrainte DROUGHT soit dominante par rapport à la contrainte HEAT. Pour FLOODxHEAT, il y a une synergie négative entre les deux contraintes pour les traits GA et GALA, tandis qu'il y a, pour DI, une synergie positive (un effet des conditions combinées plus positif que l'effet additif et plus grand que l'effet de la condition ayant l'effet le plus positif, ici FLOOD). Pour Lfi, l'effet de FLOODxHEAT est très proche à celle de FLOOD, il semblerait ainsi que la contrainte FLOOD soit dominante par rapport à la contrainte HEAT. De manière globale, ces résultats suggèrent une synergie négative forte entre DROUGHT et HEAT et des interactions dépendantes des traits pour FLOODxHEAT.

4.3. Impact des conditions abiotiques combinées sur l'architecture épigénétique de la réponse à la hernie

Dans la partie 2 de ce chapitre, nous avons montré pour la première fois que des changements ponctuels des conditions abiotiques appliquées seules modulaient l'architecture du contrôle épigénétique de la réponse à la hernie des crucifères avec la détection de QTL^{epi} spécifiques à certaines conditions abiotiques.

Tableau III. 8. : Effets et interactions entre les stress combinés (A) DROUGHTxHEAT et (B) FLOODxHEAT. Effet négatif (rouge) et positif (vert) des différentes conditions (HEAT, DROUGHT, FLOOD, DROUGHTxHEAT et FLOODxHEAT) par rapport aux conditions de culture STANDARD sur les valeurs des traits Lfi, DI, GA et GALA.

A	Lfi	DI	GA	GALA
Effet de HEAT	25%	-9%	39%	-15%
Effet de DROUGHT	-26%	-36%	-54%	-11%
<i>Effet additif calculé attendu</i>	-1%	-45%	-15%	-26%
Effet de DROUGHTxHEAT	-20.54%	-91.03%	-90.53%	-83.01%
Interaction entre DROUGHT et HEAT	Dominance DROUGHT	S-	S-	S-
B	Lfi	DI	GA	GALA
Effet de HEAT	25%	-9%	39%	-15%
Effet de FLOOD	-16%	0	-18%	22%
<i>Effet additif calculé attendu</i>	9%	-9%	21%	7%
Effet de FLOODxHEAT	-14.80%	2.43%	-47.80%	-19.96%
Interaction entre FLOOD et HEAT	Dominance FLOOD	S+	S-	S-

L'effet additif calculé est une prédiction issue de l'addition de l'effet de chaque contrainte abiotique appliquée seule. Par exemple pour Lfi, *l'effet additif calculé* est égal à la somme des effets de HEAT (25%) et de DROUGHT (-26%). La comparaison de *l'effet additif calculé* avec l'effet de chaque condition permet la détermination de l'interaction entre les deux contraintes considérées. Ainsi, **S-** signifie une synergie négative, c'est-à-dire que l'effet des conditions combinées est plus négatif que l'effet additif. **S+** signifie un effet plus positif que l'effet additif et plus grand que l'effet de la condition ayant l'effet le plus positif.

Nous avons dans cette partie évalué l'impact des contraintes abiotiques cette fois ci combinées sur l'architecture du contrôle épigénétique de la résistance d'*A. thaliana* à la hernie. Nous avons mis en évidence un effet de l'épigénotype sur le trait Lfi, quelle que soit la combinaison de contraintes abiotiques testée (**Tableau III.9.**). Les valeurs d'héritabilité au sens large obtenues sont modérées à élevées (**Tableau III.9.**), ce qui indique que la majeure partie de la variation phénotypique observée est expliquée par l'épigénotype (**Tableau III.9.**). Pour les deux combinaisons de contraintes abiotiques, quatre des huit traits présentent une distribution bimodale (en DROUGHTxHEAT : Lfi, DI, GA et GALA) alors que les autres présentent une distribution continue, suggérant un contrôle respectivement oligo-épigénétique et poly-épigénétique des phénotypes (**Fig. III. 20.**).

Nous avons détecté cinq QTL^{epi} contrôlant la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie lors de l'application de contraintes abiotiques combinées sur les chromosomes 1 et 4 (**Tableau III.10.**). Parmi ces 5 QTL^{epi}, *DroughtHeat-Lfi-Ch1* n'est pas un QTL^{epi} *bona fide* puisque l'effet du variant génétique *SNP_2167514*, présent au sein de son intervalle de confiance, s'est révélé plus fort que l'effet du marqueur épigénétique au pic, MM147. Parmi les 4 QTL^{epi}, les QTL^{epi} FloodHeat-GA-Ch4a et FloodHeat-GA-Ch4b localisés au niveau des marqueurs MM551 et MM552 sont probablement un seul et même QTL^{epi}. Certains QTL^{epi} ne sont détectés que dans les conditions de stress abiotiques combinées comme par exemple sur le chromosome 4 pour FloodHeat-GA-Ch1a/b tandis que d'autres colocalisent avec des QTL^{epi} précédemment détectés en conditions de contraintes seules, notamment sur le chromosome 1 avec FloodHeat-Lfi-Ch1 colocalisant avec Lfi-Ch1a-Standard, Lfi-Ch1b-Standard et Lfi-Ch1-Heat ou sur le chromosome 4 avec DroughtHeat-Lfi-Ch4 qui colocalise avec le QTL^{epi} Lfi-Ch4-Heat. Les QTL^{epi} détectés dans la majorité des contraintes abiotiques seules (par exemple les QTL Lfi-Ch2-Standard, Lfi-Ch2-Drought et Lfi-Ch2-Flood colocalisant sur le chromosome 2 détectés en conditions STANDARD, DROUGHT et FLOOD pour la taille des feuilles) ne sont pas détectés dans les conditions abiotiques combinées (**Fig. III. 21.**). Cependant, il est difficile de conclure sur la spécificité de ces QTL^{epi} du fait de la puissance statistique restreinte de cette détection de QTL^{epi} (123 epiRIL et 126 épimarqueurs pour une seule répétition biologique).

Tableau III. 9. : Effets expérimentaux (effet bloc) et épigénétiques pour chaque trait évalué dans les conditions de contraintes combinées.

Conditions	Traits	Effet Bloc	Effet épigénotype	H^2
DROUGHTxHEAT	Lfi	5.88E-10	0.013	0.6
	DI	0.205	0.251	0.53
	GA	3.44E-05	0.607	0.49
	GALA	1.48E-06	0.457	0.5
FLOODxHEAT	Lfi	2.00E-16	0.00152	0.63
	DI	9.55E-02	0.0537	0.57
	GA	2.03E-03	0.36218	0.52
	GALA	8.22E-10	0.755	0.47

Ils ont été calculés comme suit : $Y_{ijk} = \mu + EG_i + B_k + e_{ijk}$ où μ est la moyenne générale, EG_i est l'effet épigénotype de la lignée i , B_k est l'effet bloc au sein de la répétition et e_{ijk} la variance résiduelle. Les valeurs significatives à p -value < 0,05 sont indiquées en gris, ANOVA.

L'héritabilité au sens large (H^2) a été calculée à partir des résultats de l'ANOVA comme suit : $H^2 = \frac{Ge}{Ge+Gr}$ avec Ge la variance estimée de l'effet épigénétique, et Gr l'effet estimé résiduel.

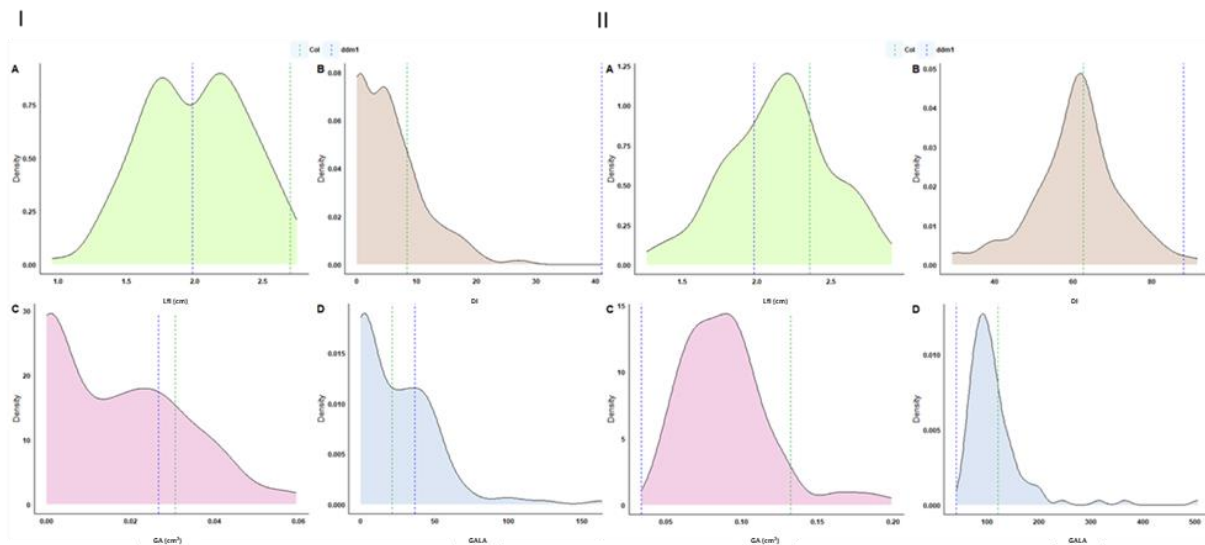


Figure III. 20. : Distributions des traits liés au développement de la plante et à l'infection par la hernie en conditions de contraintes combinées I) DROUGHTxHEAT et II) FLOODxHEAT avec A) Lfi, B) DI, C) GA et D) GALA. La proportion de la population epiRIL présentant chaque valeur de trait est présentée dans l'axe des ordonnées.

4.4. L'architecture du contrôle épigénétique de la plasticité phénotypique lors de l'application de contraintes combinées

Nous avons précédemment évalué pour chacun des caractères la plasticité phénotypique - c'est-à-dire la capacité d'un épigénotype à moduler son phénotype en fonction de l'environnement - de la population epiRIL entre les conditions STANDARD et les trois contraintes abiotiques appliquées seules : HEAT, DROUGHT et FLOOD. La plasticité a été estimée par la différence entre la valeur de chaque caractère dans la condition STANDARD et celle obtenue dans une autre condition abiotique. Nous avons donc évalué la plasticité de la population epiRIL lors de l'application des contraintes abiotiques combinées : DROUGHTxHEAT et FLOODxHEAT.

Tout comme précédemment, la plasticité des génotypes parentaux Col-0 et *ddm1-2* dépend des conditions abiotiques et des traits. En effet, en prenant en compte tous les deltaTraits (deltaLfi, deltaDI, deltaGA et deltaGALA), la plasticité de Col-0 en condition DROUGHTxHEAT (moyenne des deltas relatifs absolus 66.1 +/- 41.5 en STANDARD-DROUGHTxHEAT) est plus importante que la plasticité de *ddm1-2* (moyenne des deltas relatifs absolus 46.5 +/- 38.5 en STANDARD-DROUGHTxHEAT). En STANDARD-FLOODxHEAT, *ddm1-2* (moyenne des deltas relatifs absolus 25.5 +/- 57.5 en STANDARD-FLOODxHEAT) et Col-0 (moyenne des deltas relatifs absolus 20.0 +/- 25.3 en STANDARD-FLOODxHEAT) présentent une plasticité similaire.

Chez la population epiRIL et dans les conditions DROUGHTxHEAT et FLOODxHEAT (**Fig. III. 22.**), le trait Lfi est plastique avec un delta de 0.52 et 0.38 cm, respectivement. La plasticité de Lfi en condition DROUGHTxHEAT est significativement plus grande que la plasticité observée pour FLOODxHEAT (Test de Kruskal-Wallis, p -value <0.001). La plasticité de Lfi en DROUGHTxHEAT est différente significativement de celle de HEAT (0.52 et -0.63 cm, respectivement, Test de Kruskal-Wallis, p -value <0.001) et plus faible que celle de DROUGHT (0.66 cm, Test de Kruskal-Wallis, p -value <0.001). La plasticité de Lfi pour FLOODxHEAT est similaire à celle de FLOOD (Test de Kruskal-Wallis, p -value <0.001). L'indice pathologique est plus plastique dans les conditions DROUGHTxHEAT (delta de 54.2) que dans la condition DROUGHT (21.4) (Test de Kruskal-Wallis, p -value <0.001). Dans les conditions FLOODxHEAT, l'indice pathologique (DI) est peu plastique (-1.38) et proche du deltaDI observé en condition FLOOD (1.33) et HEAT (5.29).

Tableau III. 10. : QTL^{epi} contrôlant la réponse de la population epiRIL à la hernie détectés en conditions DROUGHTxHEAT et FLOODxHEAT. Sont présentés en colonne : les conditions, les traits liés à la maladie, le nom des QTL^{epi}, l'épimarqueur MM le plus proche du pic du QTL^{epi}, le chromosome où est localisé le QTL^{epi}, la position en cM du pic du QTL^{epi} (PoscM), l'intervalle de confiance (CI), le pourcentage de la variance phénotypique expliquée (Var, R², %) et l'allèle associé à la plus grande valeur pour le caractère. Les QTL^{epi} en italique ne sont pas des QTL^{epi} *bona fide* mais ont pour origine des variations nucléotidiques.

Conditions	Disease Related Traits	QTL ^{epi} Names	MM	Chr	Pos (cM)	Lod	CI (cM)	Var (R ² , %)	Allele associated with higher values	Genetical variants
DroughtHeat	Lfi	<i>DroughtHeat-Lfi-Ch1</i>	MM147	1	61.198	2.638	0-82	8.262	WT	SNP_21675141
DroughtHeat	Lfi	DroughtHeat-Lfi-Ch4	MM587	4	6	2.843	0-20	8.937	WT	NA
FloodHeat	Lfi	FloodHeat-Lfi-Ch1	MM91	1	38	3.44	28-74	12.09	WT	NA
FloodHeat	GA	FloodHeat-GA-Ch4	MM551	4	2	6.306	1.73-2.29	20.58	WT	NA
FloodHeat	GA	FloodHeat-GA-Ch4	MM552	4	2.29	5.828	2-2.84	18.84	WT	NA

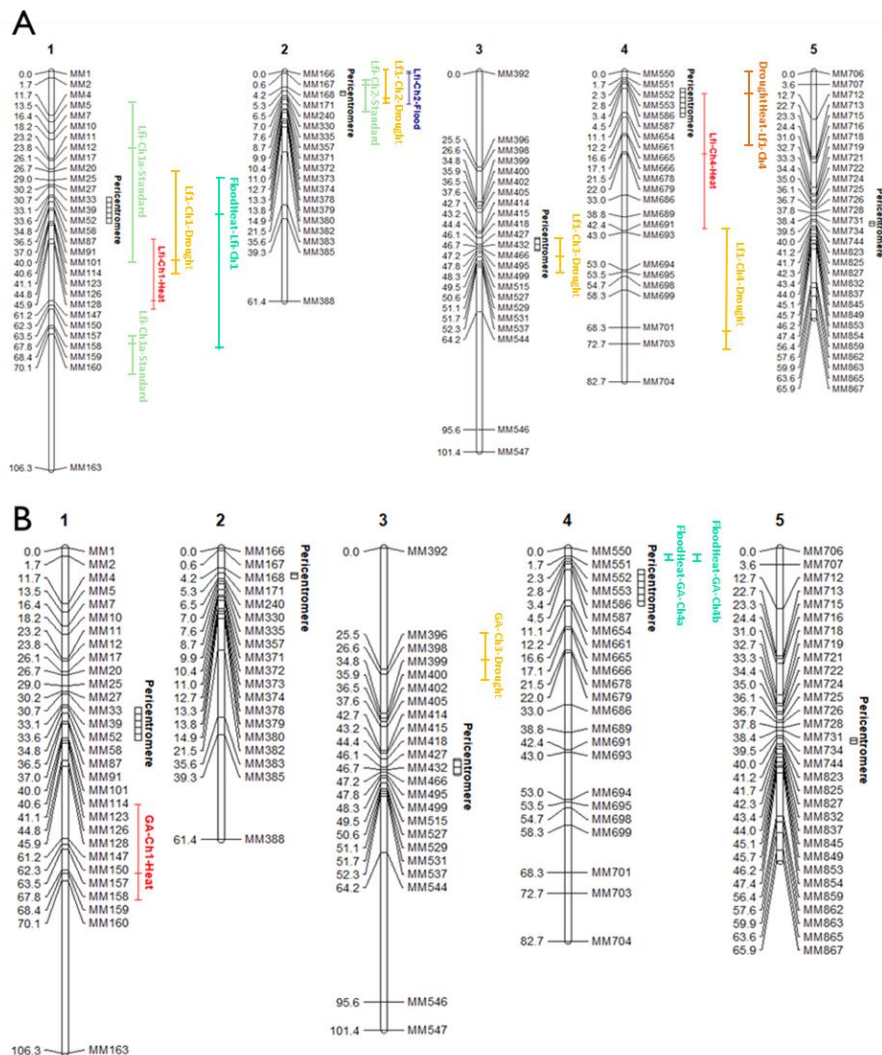


Figure III.21. : Localisation des QTL^{epi} sur la carte épigénétique de la population epiRIL (Colome-Tatche *et al.*, 2012) en A) pour le trait Lfi et en B) pour le trait GA. En vert clair, les QTL^{epi} détectés pour STANDARD, en rouge pour HEAT, en jaune pour DROUGHT, en bleu foncé pour FLOOD, en orange pour DROUGHTxHEAT et en bleu clair pour FLOODxHEAT.

Pour GA, l'application de DROUGHTxHEAT et FLOODxHEAT conduit à des plasticités plus importantes que lors de l'application de stress seuls (delta moyen pour Std-Drought = 0.0931 cm², pour Std-Drought-Heat = 0.154 cm², pour Std-Flood = 0.0308 cm² et pour Std-Flood-Heat = 0.0814 cm², Std-Heat = -0.0671 cm², Test de Kruskal-Wallis, *p*-value <0.001). Sous la condition DROUGHTxHEAT, GALA est plus plastique (117) que lors de l'application des stress abiotiques seuls HEAT et DROUGHT (21.4 et 16.4, respectivement, Test de Kruskal-Wallis, *p*-value <0.001). Les contraintes combinées FLOODxHEAT conduisent à une plasticité de GALA statistiquement non différente (28.0) de celle observée dans les conditions FLOOD (-31.1) et HEAT (21.4) (Test de Kruskal-Wallis, *p*-value <0.001).

Pour trouver les lignées les plus stables phénotypiquement (deltaTrait proche de 0) ou les plus plastiques (forte valeur absolue de deltaTrait), une analyse en composantes principales (ACP) et un regroupement par *k*-moyens ont été réalisés en utilisant les données deltaTraits calculées précédemment dans le cas de l'application des contraintes seules (STANDARD-HEAT, STANDARD-DROUGHT et STANDARD-FLOOD) ainsi que les valeurs obtenues lors de l'application des contraintes combinées (STANDARD-DROUGHTxHEAT et STANDARD-FLOODxHEAT) et pour les traits deltaLfi, deltaDI, deltaGA et deltaGALA. Toutes les epiRIL ont été conservées dans l'analyse. Le cercle des corrélations des traits entre chaque condition est présenté en **Fig. III. 23.A**. Comme précédemment, les deltaTraits sont corrélés entre les conditions abiotiques. De plus, deltaLfi et deltaGA sont positivement corrélés entre eux et négativement corrélés avec deltaDI. La composante principale 1 (PC1) expliquant 25% de la variabilité est majoritairement expliquée par deltaGA, deltaDI et deltaLfi. La composante principale 2 (PC2) expliquant 20.3% est majoritairement expliquée par deltaGALA et deltaLfi. Les 123 epiRIL sont réparties en 3 clusters (**Fig. III. 23.B**). Les epiRIL dans le cluster 1 sont les plus plastiques pour le trait Lfi tandis que les lignées dans le cluster 3 sont plus plastiques pour le trait GALA. Le cluster 2 regroupe les plantes les moins plastiques quels que soient les traits.

La distribution continue des deltatraits suggère un contrôle polyépigénétique de la plasticité phénotypique de la réponse à la hernie en conditions de contraintes abiotiques combinées (**Fig. III. 24.**). Deux QTL^{epi} à effet modéré ont été détectés, dont un d'origine génétique puisque l'effet du variant génétique *SNP_7944780* est plus fort que celui de l'épimarqueur MM686. Seul ce QTL^{epi}, explique 12.65% de la variabilité de deltaGA en condition DROUGHTxHEAT et est localisé sur le chromosome 2. Ce QTL^{epi} colocalise avec le QTL^{epi} GALA-Ch2-Standard et le QTL^{epi} deltaGALA_StdHeat_Ch2. Aucun QTL^{epi} n'a été détecté pour les deltaTraits obtenus en FLOODxHEAT (**Tableau III.11.**).

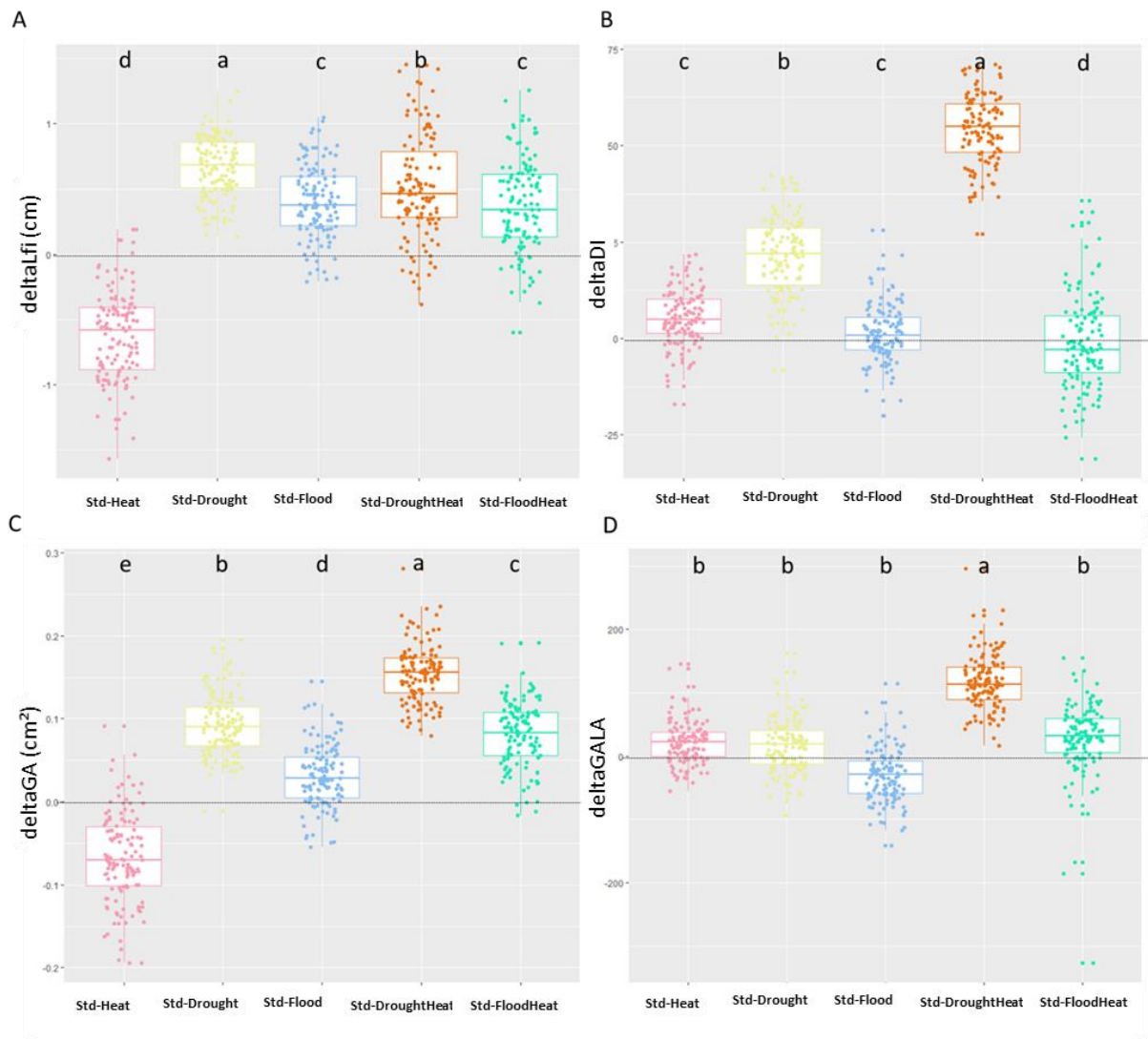


Figure III. 22. : Plasticité phénotypique calculée comme la différence entre la valeur de chaque caractère dans la condition STANDARD et celle évaluée dans l'une des cinq autres conditions HEAT, DROUGHT, FLOOD, DROUGHTxHEAT ou FLOODxHEAT. Les différences apparaissent en rose entre les conditions STANDARD et HEAT, en jaune entre STANDARD et DROUGHT, en bleu entre STANDARD et FLOOD, en orange entre STANDARD et DROUGHTxHEAT et en cyan entre STANDARD et FLOODxHEAT pour les variables A) deltaLfi, B) deltaDI, C) deltaGA et D) deltaGALA. Les différences significatives pour chaque delta-trait entre les conditions sont indiquées par des lettres différentes obtenues par un test de Kruskal-Wallis, p-value < 0,05.

4.5. Discussion et perspectives

Ces résultats restent préliminaires et sont à interpréter avec précaution puisqu'une seule répétition dans des conditions d'infection par l'isolat eH a pu être réalisée, limitant les analyses et impactant la puissance de détection des QTL^{epi}. De plus, la population epiRIL n'ayant pas été phénotypée dans ces conditions de contraintes abiotiques combinées mais sans inoculation par l'agent pathogène, il est impossible de discerner l'effet du stress biotique de celui des contraintes abiotiques dans la réponse de la population epiRIL.

Dans notre étude, l'interaction de la sécheresse et d'une élévation de la température conduit à une réduction très importante des symptômes tels que l'indice pathologique, la taille des galles ou la taille des galles standardisées par la taille des feuilles, sans pour autant que la taille des feuilles ne soit fortement modulée. Nous avons également montré qu'il existait pour une majorité des traits phénotypiques une synergie négative entre les contraintes DROUGHT et HEAT mais que pour le trait Lfi, il semblait y avoir une dominance de la contrainte abiotique DROUGHT. Il est difficile d'évaluer si ces résultats sont cohérents avec ceux de la littérature puisque les différentes études rapportent des résultats contrastés. En effet, lorsque Rizhsky *et al.* (2004) démontraient un effet dominant de la contrainte sécheresse par rapport à une élévation de température chez *A. thaliana*, Sewelam *et al.* (2020) rapportaient une dominance de l'élévation de la température sur la sécheresse.

L'évaluation de l'impact de contraintes abiotiques combinées avec un stress biotique est très rare dans la littérature mais deux études rapportent actuellement des résultats opposés aux nôtres : ainsi, *A. thaliana* est plus sensible à l'infection *P. syringae* et *Botrytis cinerea* (Sewelam *et al.*, 2021) ainsi qu'au virus de la mosaïque du navet (TuMV) (Prasch & Sonnewald, 2013b) lors d'une combinaison de sécheresse et d'élévation de la température. Dans notre cas, ces deux conditions (DROUGHT et HEAT) appliquées de manière combinée semblent avoir un effet positif sur la résistance d'*Arabidopsis* à la hernie des crucifères. Cependant, les conditions abiotiques impactent certes la plante mais aussi l'agent pathogène et leur interaction (Elad & Pertot, 2014), et il est ainsi possible que la diminution des symptômes en conditions DROUGHTxHEAT résulte d'une diminution de la capacité d'infection de *P. brassicae* dans ces conditions. En effet, le déficit hydrique appliqué a sans doute un effet négatif sur la capacité d'infection des spores de repos de l'isolat eH puisque les zoospores primaires issues des spores de repos ont besoin d'eau pour se déplacer dans le substrat et infecter correctement les poils absorbants (Dixon, 2009b).

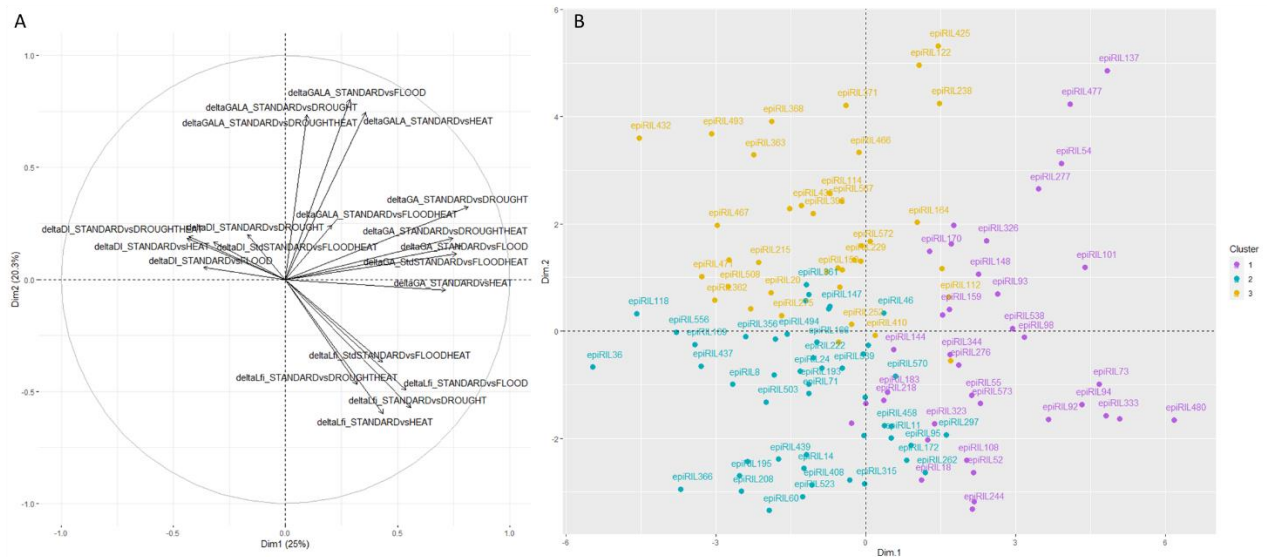


Figure III. 23. : ACP et clusterisation des traits liés à la plasticité en conditions de contraintes combinées. A) Analyse en composantes principales présentant la distribution de deltaLfi, deltaIP, deltaGA et deltaGALA pour les comparaisons entre STANDARD et HEAT, STANDARD et DROUGHT, STANDARD et FLOOD, STANDARD et DROUGHTxHEAT et STANDARD et FLOODxHEAT et B) regroupement en *k*-moyens pour les comparaisons précitées et toutes les epiRIL (cluster 1 en violet, cluster 2 en cyan et cluster 3 en jaune).

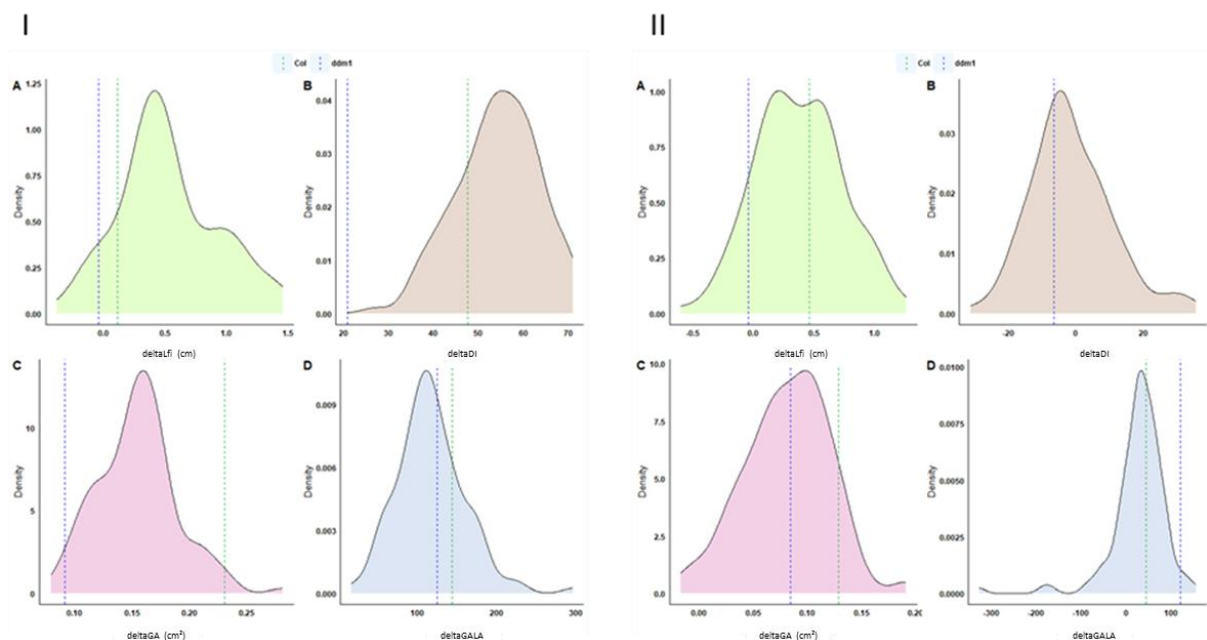


Figure III. 24. : Distribution des deltatraits liés au développement de la plante et à l'infection par la hernie en conditions de contraintes combinées. I) DROUGHTxHEAT et II) FLOODxHEAT avec A) deltaLfi, B) deltaDI, C) deltaGA et D) deltaGALA. La proportion de la population epiRIL présentant chaque valeur de trait est présentée sur l'axe des ordonnées.

Ainsi, la condition DROUGHTxHEAT donne l'impression que les plantes sont plus résistantes alors qu'elles n'ont peut-être pas été infectées à la même hauteur que des plantes cultivées en conditions STANDARD. La réalisation de coupes histologiques (Liu *et al.*, 2020b) et le suivi cinétique par PCR quantitative (amplification de l'ADN de *P. brassicae*) ou par cytométrie en flux (comptage des spores) (Aigu *et al.*, 2018) pourraient alors être envisagés afin d'évaluer l'impact d'un déficit hydrique sur la capacité d'infection des zoospores primaires.

La condition FLOODxHEAT conduit à une réduction légère des symptômes (GA/GALA) par rapport aux conditions abiotiques appliquées seuls (STANDARD, HEAT et FLOOD). Nous avons également montré qu'il existait entre FLOOD et HEAT et pour trois traits phénotypiques une synergie, négative pour GA et GALA et positive pour DI. Il semble également y avoir une dominance de FLOOD pour la condition Lfi. Chez le coton, une élévation de la température conduit à plus grande sensibilité du coton à un stress hypoxique (engorgement des racines) (Qian *et al.*, 2018) mais les interactions entre ces deux stress ne sont pas évaluées. Par ailleurs, aucune étude ne rapporte actuellement l'effet de ces deux conditions abiotiques sur l'interaction plante-agent pathogène.

Les comparaisons entre les études sur les interactions entre stress et sur leurs effets sur l'issue de l'infection des plantes par un agent pathogène sont complexes. Ces études démontrent cependant que l'interaction entre deux stress abiotiques dépend de la nature de ces stress, des traits phénotypiques et parfois des génotypes et que l'impact des stress combinés n'est pas égal à la somme des effets de chaque contrainte appliquée seule (Rizhsky *et al.*, 2004b; Barah *et al.*, 2016; Raja *et al.*, 2020; Sewelam *et al.*, 2020).

Dans cette étude, nous avons enfin observé que la plasticité des traits étudiés dépend à la fois des traits et des conditions abiotiques, mais est globalement plus importante lors de l'application de contraintes combinées. Nous avons identifié quatre QTL^{epi} contrôlant deux traits phénotypiques (Lfi et GA), dont deux sont spécifiques des conditions abiotiques combinées appliquées. Un seul QTL^{epi} contrôlant la plasticité du trait GALA dans la condition DROUGHTxHEAT a été détecté. Comme lors de l'application de contraintes abiotiques appliquées seules, certains QTL^{epi} (deux sur quatre) ont été détectés de manière spécifique lors de l'application d'une combinaison de contraintes (FLOODxHEAT).

Tableau III.11. : QTL^{epi} détectés pour la plasticité des traits de réponse à la hernie lors de l'application de contraintes abiotiques combinées. Sont présentés dans les colonnes : les conditions de culture, les traits liés à la maladie, le nom des QTL^{epi}, l'épimarqueur MM le plus proche du pic du QTL^{epi}, le chromosome où est localisé le QTL^{epi}, la position en cM du pic du QTL^{epi} (PoscM), l'intervalle de confiance (CI), le pourcentage de la variance phénotypique expliquée (Var, R², %) et l'allèle associé à une plus grande valeur du caractère. Les QTL^{epi} en italique ne sont pas des QTL^{epi} *bona fide* mais ont pour origine des variations nucléotidiques.

Conditions	Disease Related Traits	QTL ^{epi} Names	MM	Chr	Pos (cM)	Lod	CI (cM)	Var (R ² , %)	Allele associated with higher values	Genetical variants
<i>StdvsDroughtHeat</i>	<i>deltaGA</i>	<i>DroughtHeat-deltaGA-Ch4</i>	<i>MM686</i>	<i>4</i>	<i>32</i>	<i>3.088</i>	<i>8-58</i>	<i>10.92</i>	<i>WT</i>	<i>SNP_7944780</i>
StdvsDroughtHeat	deltaGALA	DroughtHeat-deltaGALA-Ch2	MM167	2	2	3.61	0-6.47	12.65	<i>ddm1-2</i>	NA

Si la spécificité de la détection de certains QTL^{epi} peut également être liée au manque de puissance de notre analyse de liaison, notamment à cause de l'unique répétition biologique, du faible nombre d'epiRIL (123 lignées) et du faible nombre d'épimarqueurs (126 MM), il est également possible que les conditions abiotiques aient un effet sur le niveau de méthylation de ces épimarqueurs et/ou gènes causaux et modulent ainsi les réponses en aval de ces QTL^{epi} (cf III.3.).

Ces résultats préliminaires sont intéressants et méritent d'être validés et approfondis afin de comprendre l'impact des conditions abiotiques combinées sur les facteurs épigénétiques de la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie des crucifères.

5. Conclusion partielle

Le travail présenté dans ce chapitre de thèse apporte des éléments sur l'impact des contraintes abiotiques seules ou combinées sur les facteurs épigénétiques contrôlant la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie des crucifères. Le phénotypage de la population epiRIL sous différentes contraintes abiotiques avec et sans inoculation par l'isolat eH de *P. brassicae* a ainsi permis de mettre en évidence que :

- Les conditions abiotiques ont un impact significatif sur le développement des epiRIL et sur leur réponse à l'isolat eH de *P. brassicae* :
 - Une élévation de la température de 5°C conduit à des plantes et des galles plus grandes et un indice pathologique ainsi qu'une surface des galles standardisée par la taille des feuilles plus faibles.
 - Un déficit hydrique conduit à des plantes et des galles plus petites, ainsi qu'à une réduction de l'indice pathologique et de la surface des galles standardisées par la taille des feuilles.
 - Un excès hydrique conduit à des plantes et des galles plus petites, un indice pathologique équivalent à celui observé dans la condition standard et une augmentation de la surface des galles standardisées par la taille des feuilles.

- L'impact sur les plantes des conditions abiotiques combinées diffère de celui des conditions appliquées individuellement :
 - DROUGHTxHEAT entraîne une plus forte réduction de l'indice pathologique, de la surface des galles et de la taille des galles standardisées par la taille des feuilles que DROUGHT et HEAT individuellement. DROUGHT domine la condition HEAT pour le trait Lfi mais pour DI, GA et GALA ces contraintes abiotiques présentent une synergie négative.
 - FLOODxHEAT entraîne une taille des feuilles et des galles réduites et peu de variations de l'indice pathologique. L'effet de FLOOD sur Lfi domine par rapport à celui de HEAT ; il y a une synergie positive entre les deux conditions pour DI et une synergie négative pour GA et GALA.
- Il existe un contrôle épigénétique de la réponse d'*A. thaliana* pour chaque condition abiotique :
 - 8 QTL^{epi} additifs contrôlent la réponse d'*Arabidopsis* sous la condition STANDARD et sont localisés sur les chromosomes 1, 2, 4 et 5.
 - 8 QTL^{epi} additifs contrôlent la réponse d'*Arabidopsis* sous la condition HEAT et sont localisés sur les chromosomes 1, 3, 4 et 5.
 - 10 QTL^{epi} additifs contrôlent la réponse d'*Arabidopsis* sous la condition DROUGHT et sont localisés sur les cinq chromosomes.
 - 5 QTL^{epi} additifs contrôlent la réponse d'*Arabidopsis* sous la condition FLOOD et sont localisés sur les chromosomes 1, 2, 3 et 5.
 - 1 QTL^{epi} contrôle la réponse d'*Arabidopsis* sous la condition DROUGHTxHEAT et localisé sur le chromosome 4.
 - 3 QTL^{epi} additifs contrôlent la réponse d'*Arabidopsis* sous la condition FLOODxHEAT et sur les chromosomes 1 et 4.
- Les conditions abiotiques impactent la détection et/ou l'effet des facteurs épigénétiques contrôlant la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie.
 - 15 QTL^{epi} sur 35 sont spécifiques d'une condition abiotique, dont :
 - 4 spécifiques à la condition STANDARD
 - 4 spécifiques à la condition HEAT
 - 5 spécifiques à la condition DROUGHT
 - 2 spécifiques à la condition FLOODxHEAT

- 20 QTL^{epi} sur 35 sont communs à au moins deux conditions abiotiques, dont :
 - 4 QTL^{epi} détectés en condition STANDARD sont détectés également en HEAT (2), DROUGHT (2), FLOOD (4) et FLOODxHEAT (1),
 - 4 QTL^{epi} détectés en condition HEAT sont détectés également en condition STANDARD (2), DROUGHT (2), FLOOD (2), FLOODxHEAT (1) et DROUGHTxHEAT (1).
 - 5 QTL^{epi} détectés en condition DROUGHT sont détectés également en condition STANDARD (1), HEAT (2), FLOOD (3) et FLOODxHEAT (1),
 - 5 QTL^{epi} détectés en condition FLOOD sont détectés également en condition STANDARD (3), HEAT (1), et DROUGHT (3),
 - 1 QTL^{epi} détecté en condition DROUGHTxHEAT est détecté également en HEAT,
 - 1 QTL^{epi} détecté en condition FLOODxHEAT est détecté également en STANDARD, HEAT et DROUGHT.
- Nous avons également démontré que la plasticité de la population epiRIL dépend à la fois des traits et des conditions abiotiques, mais qu'elle est globalement plus importante lors de l'application de contraintes combinées. Par ailleurs, cette plasticité est en partie contrôlée par des facteurs épigénétiques puisque 11 QTL^{epi} ont été détecté sur plusieurs deltatraits dont :
 - 2 QTL^{epi} détectés pour le trait deltaLfni en DROUGHT,
 - 1 QTL^{epi} détecté pour le trait deltaDI en HEAT,
 - 8 QTL^{epi} détectés pour le trait deltaGALA dont 3 en HEAT, 4 en DROUGHT et 1 en DROUGHTxHEAT.

Lors de cette première partie, nous avons ainsi pu observer que l'application de différentes conditions abiotiques conduisait à la détection de nouveaux QTL^{epi} ou à l'absence de détection de QTL^{epi} détectés en condition STANDARD. Nous avons alors essayé de comprendre pourquoi et avons initié une étude nous ayant permis de montrer que :

- Certains épimarqueurs présentent des variations de méthylation en fonction des conditions de culture.
- Le fond génétique joue un rôle dans la variation du niveau de méthylation suite à la modification des conditions de culture. Le niveau de méthylation de l'épimarqueur MM863 varie chez Bur-0 entre les conditions (hypométhylé en conditions STANDARD et HEAT et hyperméthylé en conditions DROUGHT et FLOOD), alors qu'aucune variation n'est détectée sur le niveau de méthylation de l'épimarqueur MM863 chez Col-0 et l'epiRIL495, suggérant un rôle du fonds génétique dans la stabilité des épimarqueurs.
- Cependant, ces variations de méthylation en réponse aux contraintes abiotiques au niveau des épimarqueurs n'ont pas d'impact direct sur la détection de QTL^{epi}. La détection de QTL^{epi} n'est impactée que si ces variations de méthylation concernent également le gène causal d'un QTL à proximité d'un épimarqueur, par exemple par phénomène de spreading (Quadrona & Colot, 2016) ou par réversion de méthylation impactant de grandes régions (Cortijo, 2012).
- Nous avons observé une hypométhylation et une expression des gènes *AT5G47260* et *AT5G47280* chez Bur-0. Chez Col-0, le gène *AT5G47280* a été caractérisé par une forte méthylation et peu voire pas d'expression. Les résultats obtenus pour le gène *AT5G47260* sont plutôt incohérents avec la bibliographie. Cependant, quels que soit les gènes ou les génotypes, nous n'avons pas trouvé d'effet des conditions sur leur niveau de méthylation.

Les données obtenues ne concernent cependant que très peu de régions génomiques (deux marqueurs, MM171 et MM863, et les gènes *AT5G47260* et *AT5G47280*). Afin d'évaluer si les autres épimarqueurs de la population epiRIL présentent des modifications de leur niveau de méthylation et, dans l'hypothèse où il existe des phénomènes de « spreading » de la méthylation d'un épimarqueur vers un gène causal, il serait nécessaire d'évaluer le niveau de méthylation des autres épimarqueurs de la population epiRIL dans les différentes contraintes abiotiques testées.

Certains QTL^{epi} d'intérêt ressortent dans notre étude, notamment ceux localisés au niveau de la fin du chromosome 5, loin des régions péri-centromérique riches en éléments transposables et incluant le QTL *AT-Pb 5.2* dans leurs intervalles de confiance.

Une approche de cartographie fine – à travers l'identification de lignées recombinantes et la densification de la région en épimarqueurs – et l'identification des gènes causaux pourra permettre d'évaluer directement l'impact des conditions abiotiques sur leur niveau de méthylation, leur expression et les voies dans lesquelles ils sont impliqués. Le(s) gène(s) causal(aux) pourra être validé(s) par la création de mutants KO par CRISPR-Cas9. L'utilisation d'une approche de CRISPR-deadCas9, permettant la déméthylation ciblée de région génomique, pourra également participer à la validation fonctionnelle de ces éléments causaux.

Une autre stratégie serait, pour les QTL^{epi} les plus intéressants, la création de Heterogenous inbred families (HIF), couples de lignées présentant un fond génétique/épigénétique commun mais différant au niveau de la région du QTL^{epi} (**Fig. III.15.**), afin de permettre, à travers des approches de transcriptomique et de métabolique, d'identifier les voies métaboliques ou de signalisation impliquées dans réponse à la hernie, contrôlées par chacun de ces QTL^{epi}.

Une étude complémentaire visant à étudier l'impact au niveau transcriptomique des contraintes abiotiques seules ou combinées pourrait également permettre de mieux comprendre la réponse d'*A. thaliana* à la maladie sous différentes conditions environnementales. L'utilisation lors de cette expérimentation des deux génotypes Col-0 et Bur-0, dont les réponses à l'isolat eH de la hernie ont déjà été bien caractérisées au sein du laboratoire, pourrait également permettre de mieux comprendre l'impact des conditions abiotiques sur les réponses de sensibilité (Col-0) et de résistance partielle (Bur-0).

CHAPITRE IV : Implication des miARN dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à la hernie

CHAPITRE IV : Implication des miARN dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à la hernie

1. Introduction

Le déterminisme de la réponse d'*A. thaliana* à la hernie des crucifères est complexe et dépend à la fois de facteurs génétiques (Fuchs, 1996; Jubault *et al.*, 2008b) et de facteurs épigénétiques, sous le contrôle d'épimutations naturelles (Liégard *et al.*, 2019b) et induites (Liégard *et al.*, 2019a). Chez *A. thaliana*, l'infection par *P. brassicae* conduit à une modification des tissus racinaires et notamment une hyperplasie (division cellulaire accrue) et une hypertrophie (élargissement des cellules) des cellules du cortex lors de l'infection secondaire (Kobelt *et al.*, 2000; Dixon, 2009a). Ces modifications morphologiques des racines s'accompagnent entre autres d'un bouleversement hormonal, à travers notamment l'accumulation d'auxine et de cytokines (Siemens *et al.*, 2006; Jubault *et al.*, 2013; Irani *et al.*, 2018), d'une modification des parois cellulaires *via* la répression des voies de biosynthèse des parois cellulaires (Zhang *et al.*, 2016a), d'une induction de nombreux gènes codant des expansines (Siemens *et al.*, 2006; Jubault *et al.*, 2013; Irani *et al.*, 2018) et d'une régulation du métabolisme des lipides (Irani *et al.*, 2018).

Cette reprogrammation cellulaire de la plante, qui permet notamment à l'agent pathogène d'acquérir les nutriments de l'hôte, pourrait impliquer l'action des microARN (miRNA), petits ARN non codants de 20 à 22 nt. Les miARN sont connus pour réguler de nombreux processus développementaux et physiologiques (Jin *et al.*, 2013) et sont impliqués dans la réponse des plantes aux agents pathogènes (Yang *et al.*, 2021a), ce qui en fait des candidats pertinents pour la régulation de la réponse des plantes à la hernie. Effectivement, certains miARN ont déjà été identifiés dans la réponse des *Brassica* à la hernie (Verma *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2016, 2023; Paul *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2022; Cai *et al.*, 2023) mais n'ont jusqu'à présent pas été étudiés chez *Arabidopsis*. L'étude des miARN impliqués dans l'interaction *A. thaliana* -*P. brassicae* nous permettra d'une part de valider la conservation chez les Brassicacées des mécanismes de défense et de résistance de la plante en réponse à cette maladie.

D'autre part, les nombreuses ressources acquises et disponibles chez cette espèce modèle (ressources génétiques, génomiques, transcriptomiques, métaboliques ainsi que la connaissance des processus physiologiques et de réponse de résistance à la hernie) nous permettront d'identifier de potentiels nouveaux miARN et d'aller plus loin dans leur validation fonctionnelle.

Au cours de ce chapitre de thèse, nous nous sommes attachés à répondre aux questions suivantes :

- Quels sont les miARN dérégulés dans la réponse de sensibilité et de résistance partielle d'*A. thaliana* à la hernie ? Ces miARN sont-ils communs ou spécifiques aux deux réponses ?
- Quels sont les miARN communs aux réponses d'*A. thaliana* et à celles d'autres *Brassicaceae* à la hernie ?
- Quelles sont les cibles potentielles des miARN différenciellement exprimés avec l'infection ? Leur expression est-elle anti-corrélée à l'expression des miARN lors de l'infection ?
- Les couples miARN /gènes cibles sont-ils impliqués dans des processus physiologiques ou des voies de défense déjà identifiés (prolifération cellulaire, paroi cellulaire, métabolisme spécialisé, voies de défense dépendantes de JA ou SA) ou dans de nouvelles voies ?

Ces travaux ont été initiés en amont de ma thèse. Des racines de géotypes sensible (Col-0) et partiellement résistant (Bur-0), inoculés et non inoculés ont été prélevées à 7 jours après inoculation, lors de la phase de transition de la phase d'infection primaire vers l'infection secondaire et à 14 jours, lors de la phase d'infection secondaire et de la formation des galles. Le séquençage Illumina du transcriptome et des miARN a été réalisé sur ces échantillons. Durant ma thèse, j'ai réalisé les analyses bio-informatiques et identifié les gènes et miARN différenciellement exprimés après infection chez Col-0 et Bur-0. Ces résultats sont présentés sous la forme d'un article en cours de préparation (paragraphe 2) et pour lequel des expérimentations qui sont encore en cours sont présentées dans le paragraphe 3.

2. Identification of *Arabidopsis* miRNAs involved in susceptible and partial resistance responses to clubroot

Identification of miRNAs involved in the susceptible and partial resistance responses to clubroot in *Arabidopsis*

Mathilde Petitpas¹, Jocelyne Lemoine¹, Christine Lariagon¹, Maria J. Manzanares-Dauleux¹,
Mélanie Jubault¹

¹ IGEPP, Institut Agro Rennes-Angers – INRAE – Université de Rennes, F-35000 Rennes, France

Running title: miRNA involved in *Arabidopsis* responses to clubroot

ABSTRACT : In *Arabidopsis*, clubroot disease, caused by the obligate parasite *Plasmodiophora brassicae*, induces structural and physiological changes such as major hormonal balance changes (auxin, cytokinins, jasmonic or salicylic acids), loosening of cell wall, diversion of carbon resources to the pathogen and accumulation of lipids. Although these changes have been well characterised during *Arabidopsis* infection, we have little insight into the regulating factors involved in such changes. Here, we investigated the role of miRNA, in both *A. thaliana* partial resistance and susceptibility responses towards *P. brassicae*, as well as their target genes and their associated physiological pathways. Through Illumina sequencing, differentially expressed genes and miRNA were identified in infected and non-inoculated roots in the susceptible and partially resistant ecotypes Col-0 and Bur-0, respectively, at 7 and 14 days-post-inoculation (dpi). While no miRNA was detected as differentially expressed at 7 dpi, twenty-one and five miRNA were identified as differentially expressed upon *P. brassicae* infection in Col-0 and Bur-0 respectively at 14 dpi and belonged to fourteen miRNA families. Using psRNATarget, 283 genes were predicted to be targeted by miRNA in Col-0 and 49 in Bur-0. Six out of fourteen families of miRNA were already identified in the response of *Brassica* species to clubroot. Five miRNA families (*MIR319*, *MIR396*, *MIR165/166*, *MIR2936* and *MIR169*) target genes are implied in metabolic and structural pathways already known to be modulated during *P. brassicae* infection such as the photosynthetic pathway, energy production or pathogen perception. Furthermore, five families of miRNA were detected for the first time in the interaction *Brassicaceae* - *P. brassicae*: *MIR5642*, *MIR2936*, *MIR869*, *MIR866* and *MIR8176*. Among these five families, *MIR2936* targeted genes enriched in cell wall biosynthesis suggesting a role of this miRNA in the formation of galls.

2.1. Introduction

Plasmodiophora brassicae is a protist, soil-borne obligate parasite of *Brassicaceae*, causing clubroot disease. *P. brassicae* infection leads to the disruption of nutrient and water circulation, leading to yield loss and potential plant death (Dixon, 2009a). Clubroot is a worldwide major disease of *Brassica* crops such as *B. napus*, *B. oleracea* and *B. rapa* (Dixon, 2009a). Primary zoospores released upon resting spore germination infect plant root hairs (primary infection) leading to the formation of plasmodes and the production of secondary zoospores. Secondary zoospores infect cortical cells of root tissue (secondary infection) and lead to gall formation through both hyperplasia (cell division) and hypertrophy (cell enlargement). In *Arabidopsis thaliana*, which is also a host plant for *P. brassicae*, the infection cycle is completed within three weeks (Koch *et al.*, 1991; Alix *et al.*, 2007), with the primary phase of infection occurring during the first seven days and the secondary phase of infection occurring from seven to 20 days after inoculation (Kobelt *et al.*, 2000; Dixon, 2009b; Kageyama & Asano, 2009).

Partially resistant and susceptible ecotypes of *A. thaliana* have been identified (Alix *et al.*, 2007) and the genetic architecture of the resistance and susceptibility responses was shown to be under the control of both genetic and natural and induced epigenetic factors (Fuchs, 1996; Jubault *et al.*, 2008b; Liégard *et al.*, 2019a,b). Furthermore, transcriptomic and metabolic approaches led to the identification of several structural and physiological changes induced by the infection. In the susceptible ecotype Col-0, studies showed changes in the hormonal balances mainly with the accumulation of auxin and jasmonic acid and the reduction of cytokinin contents (Jubault *et al.*, 2013; Lemarié *et al.*, 2015a; Ludwig-Müller *et al.*, 1999; Malinowski *et al.*, 2016; Siemens *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2017). In addition, host tissue restructuring observed in the roots of the susceptible genotypes was characterized by the induction of cell enlargement and cell division process as well as the loosening of cell wall with the overexpression of several expansin genes (Siemens *et al.*, 2006; Jubault *et al.*, 2013; Irani *et al.*, 2018; Olszak *et al.*, 2019). As an obligate parasite of plants, *P. brassicae* is also capable of diverting the plant carbon reserves and the infection leads to the induction of the fermentation process, the degradation of starch, an increase in sugar transport as well as the accumulation of lipids (Jubault *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018b; Irani *et al.*, 2018). In the partially resistant ecotype Bur-0, the response to the isolate eH was characterised by the accumulation of salicylic acid (SA) and camalexin (Lemarié *et al.*, 2015b,a) (Jubault *et al.*, 2008b).

The cell reprogramming observed in this plant-pathogen interaction could involve the intervention of microRNAs (miRNA). MiRNAs are single-stranded non-coding RNA (ncRNAs) of 20 to 22 nt in plants encoded by *MICRORNA (MIR)* genes often organised in multigenic families. *MIR* genes are transcribed by RNA polymerase II that produces stem-loop precursors of hundreds of nucleotides (pre-miRNA). These precursors are then processed by the RNase III DICER LIKE 1 (*DCL1*) before being loaded into the ARGONAUTE-1 protein (*AGO1*) that forms, together with other proteins, an active RNA-induced silencing complex (*RISC*). *RISC* is guided by the mature miRNA to a mRNA by sequence complementarity resulting in the silencing of the corresponding gene by mRNA degradation or translation inhibition (Yu *et al.*, 2017a). MiRNAs are active regulators of genes involved in numerous biological mechanisms such as plant development (Jin *et al.*, 2013) and plant response to abiotic (Koroban *et al.*, 2016) and biotic stresses (Yang *et al.*, 2021a) which make them relevant candidates for understanding the response of plants to clubroot. Indeed, miRNA were shown to be involved in the regulation of *B. rapa*, *B. napus* and *B. juncea* response to *P. brassicae* (Verma *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2016, 2023; Paul *et al.*, 2021; Liao *et al.*, 2023; Cai *et al.*, 2023) but, to date, no studies have been carried out to functionally validate their implication and mode of action.

Studying and validating their role in the model species *Arabidopsis* could thus allow to examine miRNA roles in greater depth and shed light on the physiological processes affected by *P. brassicae* infection. The aim of this study was to identify miRNAs involved in the susceptible and partial resistance responses of *A. thaliana* to *P. brassicae*, as well as their potential targets. To this purpose, Illumina sequencing was carried out in order to identify both differentially expressed genes and miRNA in the susceptible ecotype Col-0 and the partially resistant ecotype Bur-0, seven days post-inoculation (dpi) during the beginning of the secondary phase of infection and at fourteen dpi at the end of the secondary phase of infection when galls are visible.

2.2. Materials and Methods

2.2.1. *Plasmodiophora brassicae*

Clubroot tests were carried out with the eH isolate of *P. brassicae* (Fahling *et al.*, 2003) belonging to the P1 pathotype (Some *et al.*, 1996). The host differential set established by Some *et al.* (1996) was used as a control of the pathotype P1 and the universal clubroot susceptible *B. rapa* ssp. *pekinensis* cv 'Granaat' ECD5 was used as a control of the proper inoculation. The inoculum was prepared according to Manzanares-Dauleux *et al.* (2000) and one millilitre of a solution of 1×10^7 spores/mL was applied to the base of the seedlings ten days post sowing.

2.2.2. Plant material

Arabidopsis ecotypes Burren (accession number 172AV thereafter referred to as Bur-0) and Columbia (accession number 186AV thereafter referred to as Col-0) were obtained from the Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (<https://arabidopsis.info/>). Col-0 and Bur-0 are susceptible and partially resistant, respectively, to isolate eH of *P. brassicae* (Alix *et al.*, 2007).

2.2.3. Experimental design

Arabidopsis seeds were placed 48h on wet blotting paper at 4°C in the dark to synchronise germination before being individually sown in 4-cm diameter pots containing soil composed of 2/3 compost and 1/3 vermiculite. Environmental conditions were controlled during pathological tests, with 16-h light at 22°C and 8-h dark at 19°C. Seedlings were inoculated ten days post sowing (stage 1.04, Boyes *et al.*, 2001). Clubroot resistance tests were carried out in three randomized blocks. Inoculated and non-inoculated plants were harvested at 7 days post inoculation (dpi) (30 plants) and 14 dpi (18 plants). Clubroot symptoms were assessed three weeks (21 dpi) post-inoculation: plants were dug up, rinsed with clear water and their response to clubroot was evaluated using the scale described by Manzanares-Dauleux *et al.* (2000) : 0, no visible swelling; 1, very slight swelling usually confined to lateral roots; 2, moderate swelling on lateral roots and taproot; 2+, severe clubs on all roots, but some roots remain and 3, no root left, only one big gall.

Disease index (DI) was calculated as follows: $DI = (n_1 \times 25 + n_2 \times 50 + n_{2+} \times 75 + n_3 \times 100)/N$ where n_i is the number of plants in the symptom class i and N the total number of plants tested, a line displaying a DI of zero is completely resistant and does not develop any clubroot symptom while a line with a DI of 100 is highly susceptible (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000b).

2.2.4. mRNA and miRNA isolation and sequencing

For each time-point, total mRNA and miRNA extractions were carried out on frozen and lyophilized roots using the mirVana™ miRNA Isolation Kit (Invitrogen AM1560, Carlsbad, CA, US) according to the manufacturer's instructions. Quality of RNA was assessed using the RNA 6000 assay kit and the Small RNA assay kit from Agilent (Waldbroon, Germany) for mRNA and miRNA respectively. Samples with RNA integrity number (RIN) superior or equal to seven were used for sequencing. Construction of cDNA sequencing libraries and the sequencing were performed by the NGS platform of Marie Curie Institute of Paris. Sequencing was carried out using HiSeq2500 technology with 100 bp paired-end for mRNA and 50bp single-end for miRNA.

2.2.5. Bioinformatic mRNA and miRNA analyses

Trimmed reads from Col-0 and Bur-0 were mapped against the *Arabidopsis* Col-0 reference genome (TAIR10, GTF Annotation Mar2020) using *RNASat* for reads from mRNA sequencing (Dobin *et al.*, 2013) and against the *Arabidopsis* reference genome (TAIR10, GTF Annotation Mar2020) and the known mature miRbase of *A. thaliana* miRNA (Griffiths-Jones, 2006; Kozomara & Griffiths-Jones, 2014) using *miRDeep2* mapper for reads from miRNA sequencing (Friedländer *et al.*, 2012). Mapping revealed the presence in some samples of numerous reads belonging to the *Arabidopsis* latent virus-1 (Verhoeven *et al.*, 2023), an asymptomatic virus which resulted in a reduced number of expected reads with means reads on three repetitions of 6 177 537 and 19 305 379 reads mapped at 7 and 14 dpi, respectively, for Col-0 and 4 360 324 and 15 764 836 reads mapped at 7 and 14 dpi, respectively for Bur-0.

Reads of mRNA were counted using *featurecounts* (Liao *et al.*, 2014) and reads of miRNA were counted using *miRDeep2* quantifier (Friedländer *et al.*, 2012). Differential expression analyses were carried out using Askor pipeline on R (R Core Team, 2022).

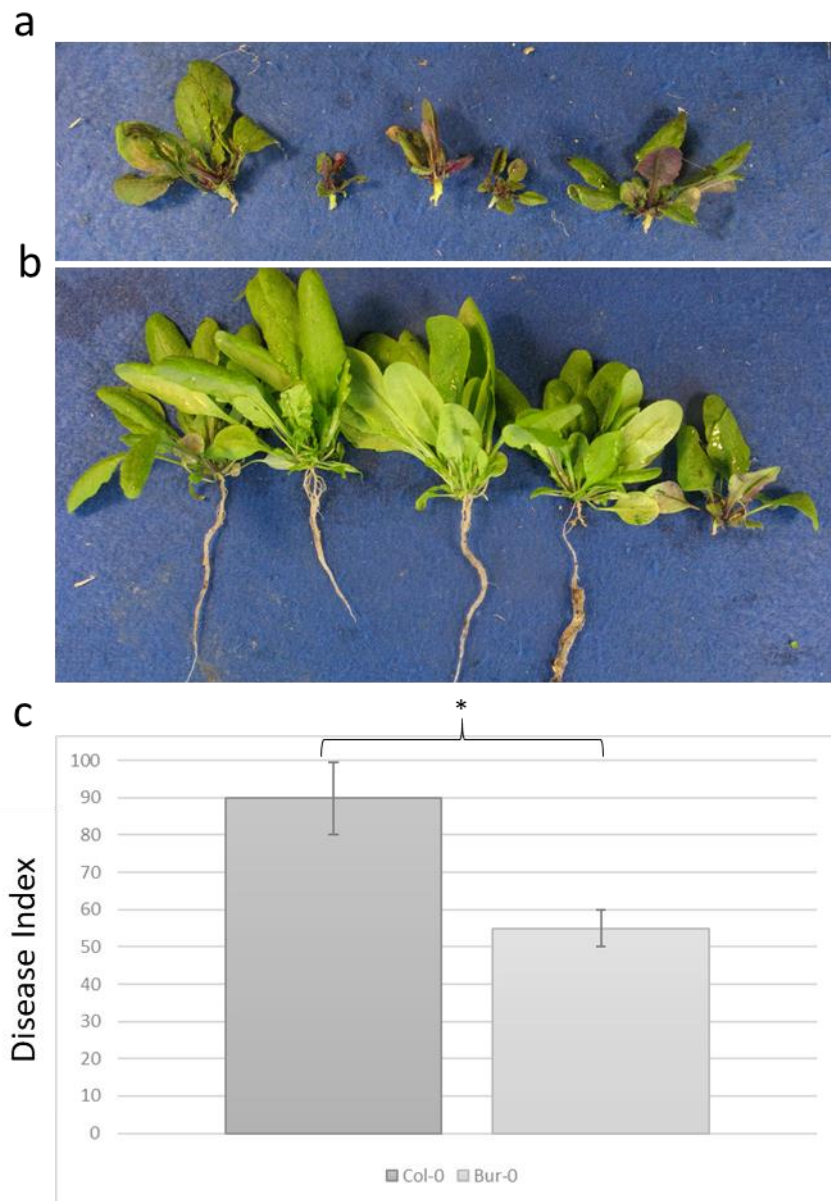


Figure IV. 1.: Plants infected by *Plasmodiophora brassicae* isolate eH at 21 days post inoculation. a) the susceptible ecotype Col-0 b) the partially resistant ecotype Bur-0 and c) Disease Index for Col-0 (dark grey) and Bur-0 (slight grey) three weeks post inoculation for three biological replicates with at least five plants per replicate. Wilcoxon Test, $p < 0.05$.

Differentially mRNA (DEG) and miRNA (miDE) identified with a false discovery rate (FDR) of 5% (adjusted $P < 0.05$; Benjamini–Hochberg adjustment) and for which fold change was at least 2 were retrieved. Functional gene enrichment analysis was carried out using g:Profiler software (Raudvere *et al.*, 2019) using all known gene parameters (meaning both annotated and not annotated genes) and other default parameters (g:SCS<0.05). Prediction of miRNA targets was performed using psRNATarget (<https://www.zhaolab.org/psRNATarget/home>) with default parameters and previously detected DEG (Dai *et al.*, 2018).

2.3. Results

2.3.1. Transcriptome of *Arabidopsis* ecotypes susceptible and partially resistant to *P. brassicae*

As previously described (Alix *et al.*, 2007; Jubault *et al.*, 2008b), Col-0 and Bur-0 showed different phenotypes towards the isolate eH. Indeed, Col-0 was susceptible to clubroot with a DI ranging from 80 to 90. Col-0 infected with *P. brassicae* displayed typical galls replacing the entire primary and secondary root systems, with small rosettes and anthocyanated leaves. In contrast, Bur-0 was partially resistant with a DI below 60. Galls were smaller than in Col-0 and mostly located on the secondary root system. Bur-0 infected plants still had a functional root system and showed large and green rosettes (**Fig. IV. 1.**).

Transcriptomic data from inoculated and non-inoculated plants sampled at 7- and 14-days post inoculation showed variations between inoculated and non-inoculated roots at 14 dpi but very few differences were found for the samples at 7 dpi (**Fig. IV.2a**). Only five genes were indeed differentially expressed (DEG) by the infection at 7 dpi, with 4 DEG for Col-0 and 1 DEG for Bur-0. At 14 dpi, 2501 genes were differentially regulated in Col-0 with 1236 and 1265 up- and downregulated, respectively. For Bur-0 fewer genes were differentially regulated with a total of 561 DEG including 383 upregulated and 178 downregulated at 14 dpi (**Fig. IV. 2c to f.**). Furthermore, among the overall 3287 genes found differentially expressed, 371 genes were found in common between Col-0 and Bur-0, with 16 displaying different expression patterns between the two ecotypes.

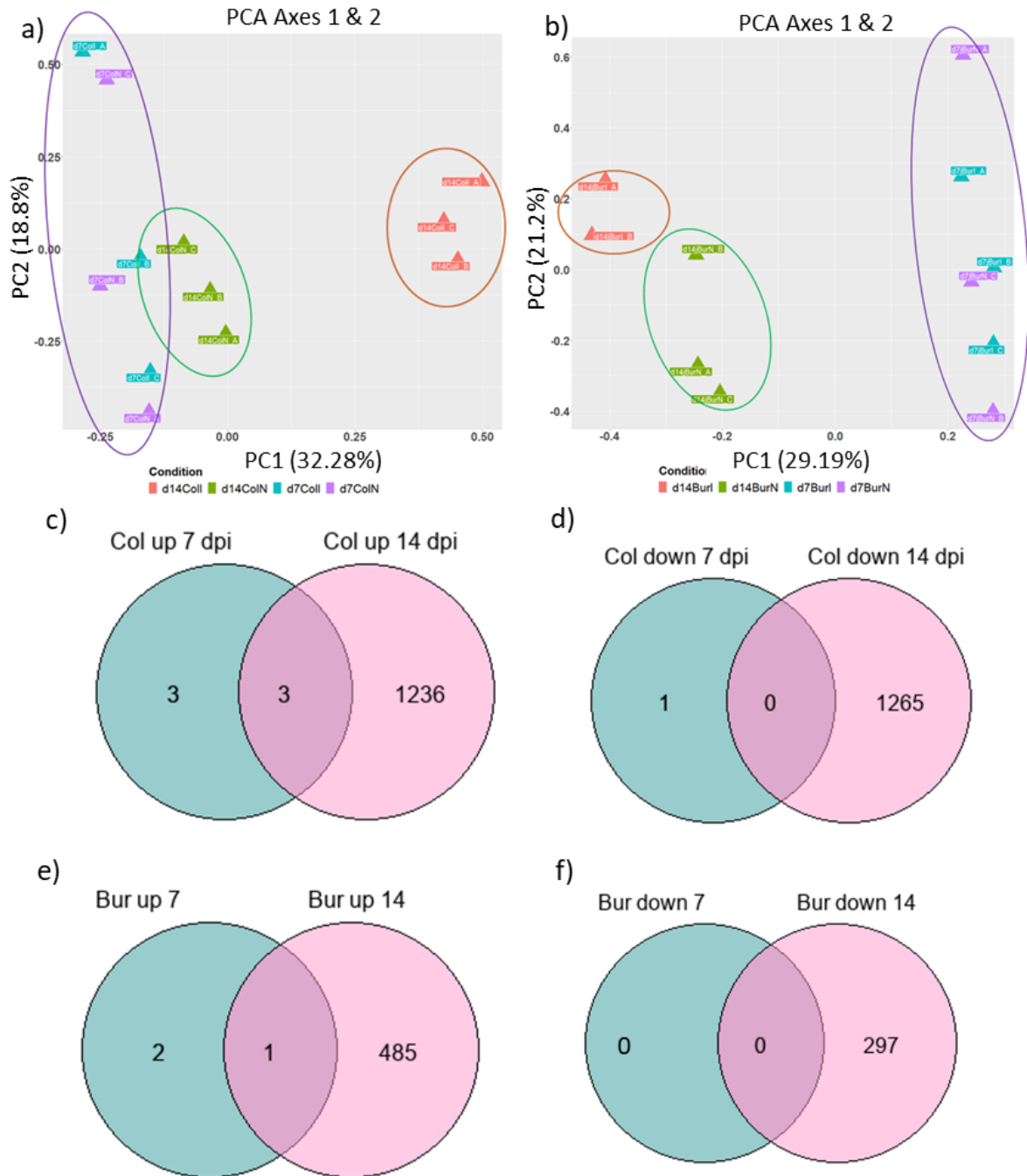


Figure IV. 2.: Transcriptomic variations identified for Col-0 and Bur-0 between clubroot-infected and non-inoculated roots. (a, b) Principal Component Analysis plots displaying variations between clubroot-infected and non-inoculated root transcriptomes for Col-0 (a) and Bur-0 (b). Three biological replicates were analysed for all samples except for inoculated roots of Bur-0 at 14 dpi (only 2 samples were analysed). Samples of inoculated roots are displayed in cyan and orange for 7 and 14 dpi respectively. Samples of uninoculated roots are displayed in purple and green for 7 and 14dpi respectively c-f) Venn diagrams showing the total number of significantly Differentially Expressed Genes (DEGs) (FDR<0.05, fold change >2) at 7- and 14-days post inoculation (dpi) in infected roots compared to non-inoculated roots. DEGs upregulated c) and downregulated d) in Col-0. DEGs upregulated e) and downregulated f) in Bur-0.

Functional enrichment analysis was achieved using the g:profiler tool (**Supp. Data.**). No enrichment was found for genes differentially regulated at 7 dpi. Genes downregulated in Col-0 at 14-dpi were mainly enriched in genes involved in cell wall biosynthesis and specialized metabolite process (**Fig. IV. 3.A**). Genes upregulated in Col-0 are enriched in genes involved in photosynthesis process and response to stimulus (**Fig. IV. 3.B**). In Bur-0 (**Fig IV.4.A & B.**), genes downregulated were enriched in genes involved in transporter activity, nitrate assimilation and cell wall biogenesis while upregulated genes are mainly enriched in genes involved in plant response to abiotic and biotic pressures.

Genes differentially regulated in Col-0 and Bur-0 at 14 dpi were more deeply investigated using the Mapman metabolism overview (**Fig. IV.5.**). At 14 dpi in Col-0 (**Fig. IV.5.a.**), the photosynthetic pathway was induced with the infection through the induction of genes coding for photosystems I and II (*PPD1:AT4G15510*, *CURT1B:AT2G46820*), or cytochromes (*AT5G36120*, *CKR1:AT5G03280* or *AT2G26500*). Other processes involved in energy production were upregulated such as the fermentation process with the upregulation of *PDC1 (AT4G33070)*, *PDC2 (AT5G54960)* and the alcohol dehydrogenase 1 *ADH1 (AT1G77120)* or the Calvin cycle, with the expression of one subunit of the photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*AT3G26650*) or the chloroplastic enzyme *AT3G55800*. Genes involved in sucrose degradation, in particular fructokinases *AT3G54090 (FLN1)* and *AT4G10260 (FRK4)*, and starch degradation (*PHS1:AT3G29320*, *PHS2:AT3G46970*) were upregulated. Upon clubroot infection, genes involved in trehalose biosynthesis were upregulated (*TPS4:AT4G27550*, *TPPJ:AT5G65140*). Lipid accumulation was also impacted by infection, as the isolate eH induced the expression of genes involved in phospholipid biosynthesis (*AT3G23510*) and the repression of genes involved in fatty acid biosynthesis (*AT1G49430*, *KCS2:AT1G04220*). The catabolism of lipids was mainly downregulated (*PLIP1:AT3G61680*, *AT1G73920*, *AT1G52700*, *UBC1:AT1G1440*). Cell wall biogenesis and reorganisation were also impacted upon *P. brassicae* infection with notably the degradation of cell walls through the induction of pectinases (*PGX3:AT1G48100*, *AT1G10640*) and the pectine methyltransferases (*PME12:AT2G26440*) and the repression of the pectine methyltransferase inhibitor (*PMEI-PME54:AT5G20860*). Other proteins involved in cell wall organisation were found to be repressed such as cell wall precursor (*AT5G34850*), glycosylated proteins (*AT3G06360*) or suberine (*AT3G11430*). Ten genes encoding expansins were also induced during Col-0 infection such as *EXPA6 (AT2G28950)*, *EXPA1 (AT1G69530)*, *EXPA10 (AT1G26770)*, *EXPA15 (AT2G03090)* and *EXPA2 (AT5G05290)*.



Figure IV. 3.: Functional classification based on gene ontology of differentially expressed genes in Col-0 at 14 dpi between infected and non-inoculated roots. A) Down-regulated and B) up-regulated genes in infected tissues. Enrichment analyses were achieved using g:profiler. The tenth most significant GO terms were kept. Gene Ratio is the percentage of gene attributed to each GO.

Genes involved in cell cycle process were upregulated (*AT2G46450*, *AT5G54250*, *CYCA1:AT1G77390*, *AT1G12330*). The accumulation of secondary metabolites was modulated through the regulation of several genes: the infection led to the repression of isoprenoid production (*AT1G48800*), the induction of anthocyan biosynthesis (*AT5G39050*, *AT4G22880*) and the repression of glucosinolate catabolism (*NSP2:AT2G33070*). Gene coding a camalexin synthase (*PAD3*, *AT3G26830*) was upregulated in Col-0. Two nitrilases (*NIT1:AT3G44310*, *NIT2:AT3G44310*) and two myrosinase binding proteins (*MPB1: AT1G52040*, *F-ATMBP: AT1G52030*) were also found to be upregulated during the infection. Several genes coding receptor like kinases, involved in plant infection recognition, were downregulated in Col-0, such as genes coding for leucine rich repeat (LRR) or WAK receptor such as the cell wall associated kinase 1 (*WAK1:AT1G21250*) or *WAK2* (*AT1G21270*). Downregulation of NPR1-interacting protein, NIMIN1 (*AT1G02450*), involved in SA signalling was observed as well as the upregulation of genes involved in JA signalling, such as the betaglucosidase *BGI* (*AT1G52400*) or *JAR1* (*AT1G19640*), notably involved in the conversion of jasmonate to methyl-jasmonate. Furthermore, six out of nine Jacalin-related genes, involved in JA signalling, were upregulated. *ARGAH2*, a gene coding for an arginase (*AT4G08870*) was also found as upregulated during Col-0 infection. A majority of genes (10 out of 12) encoding low affinity nitrate transporters (*NRT1*) were downregulated during the infection. Finally, several genes encoding for proteins involved in epigenetic mechanisms, such as *AT1G13790* coding for a DNA methylation factor *FDMA* (*AT1G13790*) and four genes coding for histone modification proteins were upregulated (*AT5G61107*, *AHK1:AT2G17820*, *HDA14:AT4G33470* and *AT1G53250*).

In Bur-0, similar pathways and physiological processes were impacted upon the infection (**Fig. IV.5.b**). Genes coding for photosystems I and II (*PPD1:AT4G15510*, *CURT1B:AT2G46820*) were downregulated. The induction of *AT3G15840* encoding for *PIFI*, an essential component of the chloroplasts, suggested an induction of chloroplastic respiration. Within the fermentation process, the alcohol dehydrogenase 1 *ADH1* (*AT1G77120*) was upregulated but *PDC1* and *PDC2* were not modulated. Cell wall degradation enzymes such as the beta glucosidase 7 (*BGLU7: AT3G62740*), the glycosyl hydrolase (*GH9B5:AT1G19940*) or the pectin lyase *AT4G01890*, were downregulated. Furthermore, two cell wall precursors were differentially regulated with *AT1G31070* which is essential for glycolipid and glycoprotein synthesis as downregulated and the *UDP-GALACTOSE EPIMERASE* (*UGE3*, *AT1G63180*) as upregulated.

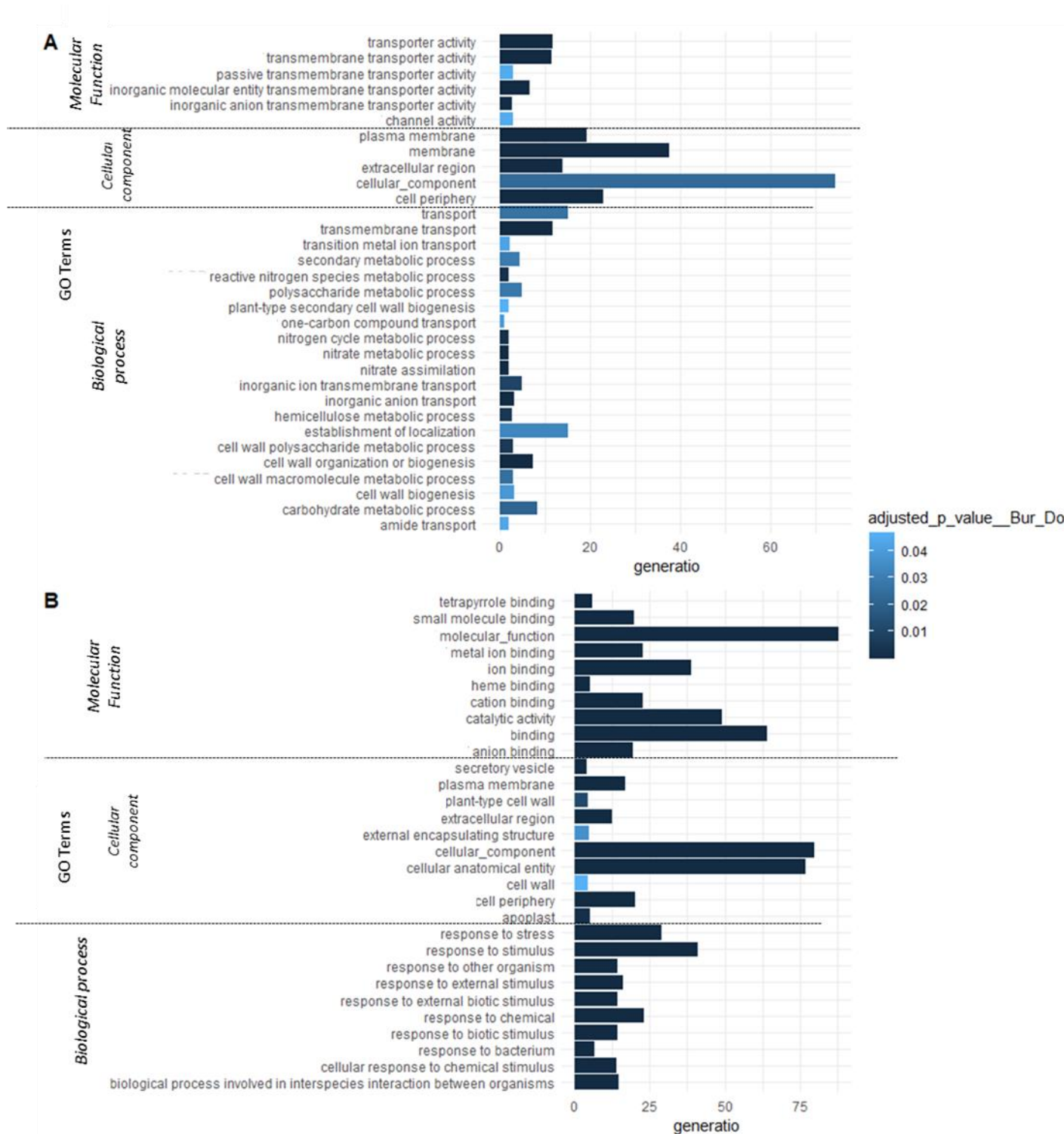


Figure IV.4.: Functional classification based on gene ontology of differentially expressed genes in Bur-0 at 14 dpi between infected and non-inoculated roots. A) Down-regulated and B) up-regulated genes in infected tissues. Enrichment analyses were achieved using g:profiler. All GO terms were kept for A) and only the tenth most significant GO terms were kept for B). Gene Ratio is the percentage of gene attributed to each GO.

In Bur-0, molecules related to expansins were induced such as the *PLANT NATRIURETIC PEPTIDE A* (*AT2G18660*) and only the expansins *EXPA4* (*AT2G39700*) and *EXPA1* (*AT1G69530*) were upregulated during the infection. In Bur-0, genes involved in auxin biosynthesis, such as nitrilase (*NIT2:AT3G44300*) and myrosinase (*AT1G54020*) were found to be upregulated as in Col-0. Finally, in Bur-0 the infection led to the upregulation of twelve receptors like kinase belonging to the DUF26 type as well as some LRR related to glycoprotein, WAK and lectin receptor. *ARGAH2* (*AT4G08870*) was also found upregulated during Bur-0 infection. One gene coding a histone deacetylase was upregulated (*AT5G61070*). *PAD3*, a gene coding for a camalexin synthase (*AT3G26830*) was upregulated in Bur-0 at a higher level than in Col-0 (logFC = 1.62 versus logFC = 1.45 in Col-0).

Sixteen genes were of particular interest because they were all upregulated in Bur-0 while being downregulated in Col-0. Among them, four genes encode for germin-like proteins (*AT5G39110*, *AT5G39120*, *AT5G39150* and *AT1G18970*), involved in developmental processes during tissue culture (Che *et al.*, 2006) and in the improvement of phosphate nutrition (Müller *et al.*, 2007), and one putative laccase, probably involved in cell differentiation or glucosinolate biosynthetic process (*AT1G18140*). Several genes related to plant defence were upregulated in Bur-0: three transmembrane proteins, including two RLK such as a DUF247-like receptor (*AT3G60470*), *WALK8* (*AT1G16260*) and *AT1G15630* as well as one calcium dependent protein kinase (*CPK22*, *AT1G04710*) and one jacalin-related lectin (*AT5G49850*).

2.3.2. Identification of miRNA differentially expressed upon infection by *P. brassicae* in partially resistant and susceptible ecotypes and their targets

Illumina sequencing of miRNA in inoculated and non-inoculated roots of the partially resistant Bur-0 and the susceptible Col-0 ecotypes at 7 dpi and 14 dpi was carried out and principal component analysis (PCA) was conducted on the miRNA data. miRNA expression variations could be observed between inoculated and non-inoculated roots at 14 dpi but no inoculation effect was found at 7 dpi (**Fig. IV.6.a and b.**). No differentially expressed miRNA (miDE) was detected at 7 dpi for either ecotype. Twenty-one miDE were detected for Col-0 with 13 and 8 being up- and downregulated, respectively (**Fig. IV.6.c. and 7.a.**). Upregulated miRNA belonged to 5 miRNA families: *MIR156* (miR156a,c and miR157a,b,c), *MIR159* (miR319a,b,c), *MIR2936*, *MIR5642* and *MIR8176*.

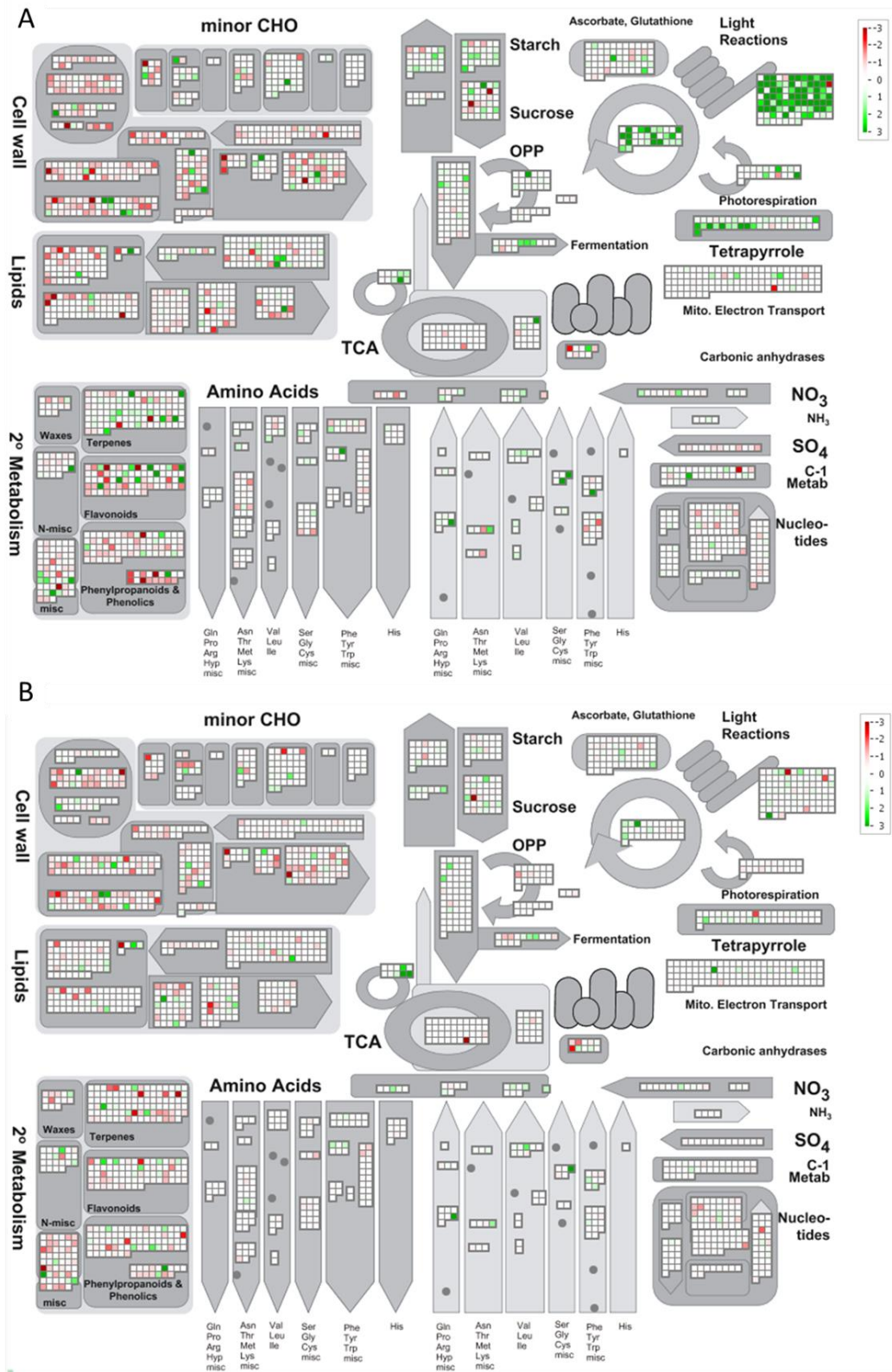


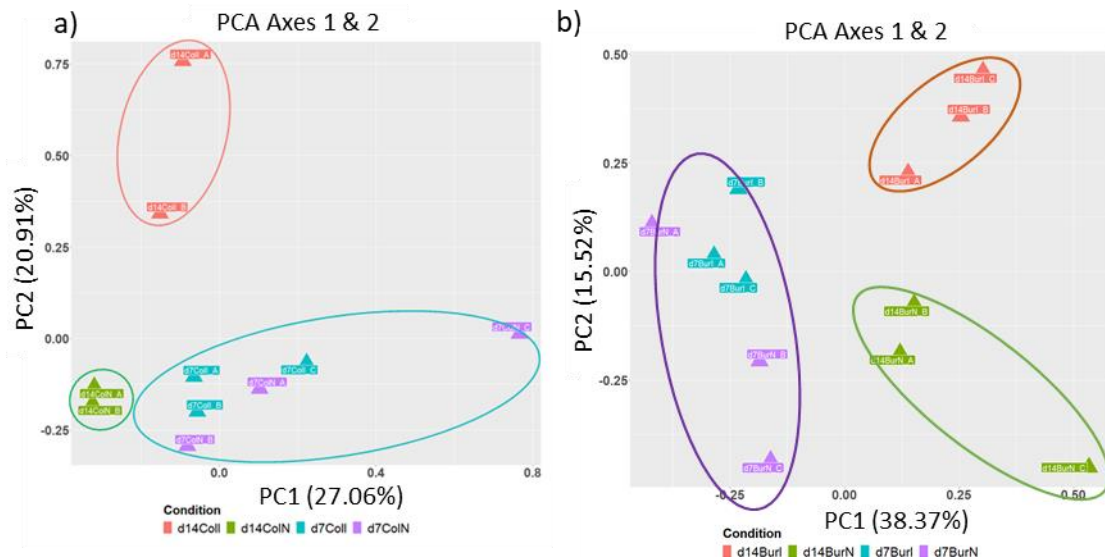
Figure IV.5.: Overview of the transcriptional changes in general metabolism processes between infected roots and non-inoculated roots at 14 dpi for Col-0 (A) and Bur-0 (B). Genes induced by the infection are represented in green and genes repressed by the infection are displayed in red.

Downregulated miRNA belonged to 5 families: *MIR164*, *MIR166*, *MIR159*, *MIR396*, *MIR831* and *MIR869*. For the partially resistant ecotype Bur-0, 2 miRNAs were upregulated at 14 dpi and belonged to *MIR159* (miR319c) and *MIR866* families. Three miRNA were downregulated at 14 dpi and belonged to *MIR169*, *MIR390* and *MIR5658* families (**Fig. IV. 6.c. and 7.b.**). In Col-0, the relative expression ranged from $\logFC=3.39$ for miR157c to $\logFC = -1.71$ for miR831. For Bur-0, relative expression ranged from $\logFC = 2.08$ for miR866 to $\logFC= -4.85$ for miR5658. Furthermore, only one miRNA was identified in common between the two ecotypes, miR319b belonging to *MIR159*, which was more strongly induced in response to infection in Col-0 ($\logFC=2.11$) than in Bur-0 ($\logFC = 1.13$).

The putative targets of these miRNAs were predicted using the online tool psRNATarget (Dai *et al.*, 2018) in the set of genes identified in this study as differentially expressed upon infection. In Col-0, a total of 972 interactions between miRNA and mRNA were identified for which 48.25 % displayed anticorrelated expression pattern between miRNA and their gene target. In Bur-0, 94 interactions were predicted, for which 61.70% displayed anticorrelated expression pattern between miRNA and their gene target (**Table IV. 1.**).

To investigate the biological function of the genes predicted to be regulated by miRNA in infected tissues, a functional enrichment test using G:profiler was performed on the lists of target genes displaying a consistent expression with their associated miRNA (Raudvere *et al.*, 2019). Significant enrichment results were retrieved for the down- and upregulated genes in Col-0 and only for the downregulated genes in Bur-0, as too few upregulated genes were identified in Bur-0 (**Table IV. 2.**). The 145 upregulated genes putatively targeted by 8 miRNAs in Col-0 were particularly enriched in genes involved in photosynthesis process and in response to stress. The 138 genes downregulated in Col-0 and putatively targeted by 13 miRNAs were enriched in genes involved in positive control of cell wall organisation or in biogenesis and xylem development. The 43 genes downregulated by 3 miRNAs in Bur-0 infected tissues, were enriched in genes involved in sugar metabolism (**Table IV.2.**).

Then, in order to assess the putative function of miRNAs identified in our study, functional enrichment analysis was achieved using each gene list regulated by one miRNA family. In Col-0, *MIR2936* targets were enriched in genes involved in biogenesis and organisation of cell wall. *MIR165/166* targets are involved in light reaction, photosynthesis and light harvesting.



c)

Time	Up or Down in infected	Numbers of miRNA DE in Col-0	Numbers of miRNA DE in Bur-0
14 dpi	Up	13	2
	Down	8	3

Figure IV.6.: miRNA expression variations identified between Col-0 and Bur-0 clubroot-infected and non-inoculated roots. (a, b) Principal Component Analysis plots displaying miRNA variations between clubroot-infected and non-inoculated roots for Col-0 (a) and Bur-0 (b). Samples of inoculated roots are displayed in blue and red for 7 and 14dpi respectively. Samples of uninoculated roots are displayed in purple and green for 7 and 14dpi respectively. c) Table displaying the number of microRNA differentially expressed (FDR<0.05, fold change >2) in roots of Col-0 and Bur-0 after infection by *P. brassicae*.

In Col-0, downregulated genes targeted by *MIR156/MIR157* family were involved in biosynthesis of nucleotide sugars, amino sugar and nucleotide sugar metabolism. Furthermore, several miRNAs appeared to be involved in plant disease resistance: targets of *MIR396*, upregulated in Col-0, were enriched in genes involved in NAD nucleotidase activity, mainly entailing TIR-LRR resistance genes; targets of *MIR169*, upregulated in Bur-0, were enriched in genes involved in chitosan binding, “cell surface recognition” and “response/detection to/of peptidoglycan” (**Tables IV. 3 and 4**). Enrichment analyses were complemented by manual evaluation of the role of specific miRNA-targeted genes. The gene *CUC1 (AT3G15170)*, known target of miR164 (Baker *et al.*, 2005; Cucinotta *et al.*, 2018) and the known targets of miR319, *TCP3* and *TCP4 (AT1G53230, AT3G15030)* (Koyama *et al.*, 2017) were downregulated in Col-0. A focus was then made onto miRNA-targeted genes involved in hormonal balances, pathogens perception and the resulting signal transduction. In Col-0, three upregulated genes predicted to be targeted by *MIR164 (RDK1:AT4G34220)*, *MIR396 (RPP4:AT4G16860)* or *MIR831 (RPP13:AT3G46530)* families, encoded receptor like kinases or disease resistance proteins. Two downregulated targets of *MIR156/MIR157* family encoded for disease resistance proteins (*WAKL8:AT1G16260, AT1G69550*). Putative targets of *MIR319* family are calmodulin-binding protein involved in plant immunity (*CBP60F:AT4G31000*) (Truman *et al.*, 2013), as well as TIR-NBS-LRR (*AT1G69550*) and LRR-RLK (*AT4G29450*). An ortholog of the AUXIN RESPONSIVE FACTOR 3 (*ARF3, AT2G33860*), involved in auxin signalling, is a predicted target of both *MIR164* and *MIR831* families. Two downregulated targets of *MIR156/MIR157* family encoded cytokinin dehydrogenase (*CKX6:AT3G63440*), notably involved in cytokinin degradation or calcium transport (*ACA9:AT3G21180*). In the partially resistant ecotype, Bur-0, two upregulated targets of *MIR5658* family encoded for cysteine-rich RLK (*CRK41:AT4G00970*) and one calmodulin-like calcium binding protein (*CML47:AT3G47480*), involved in plant signalling during plant infection. Three genes targeted by *MIR390* family encoded for disease receptors such as the Serine-Threonine kinase like receptor (*AT4G18253*), the leucine rich-repeat receptor (*AT5G07180*) and a cysteine-rich receptor like kinase (*CRK41:AT4G00970*). One receptor like serine-threonine protein kinase (*AT1G78530*) was downregulated by the *MIR866* family.

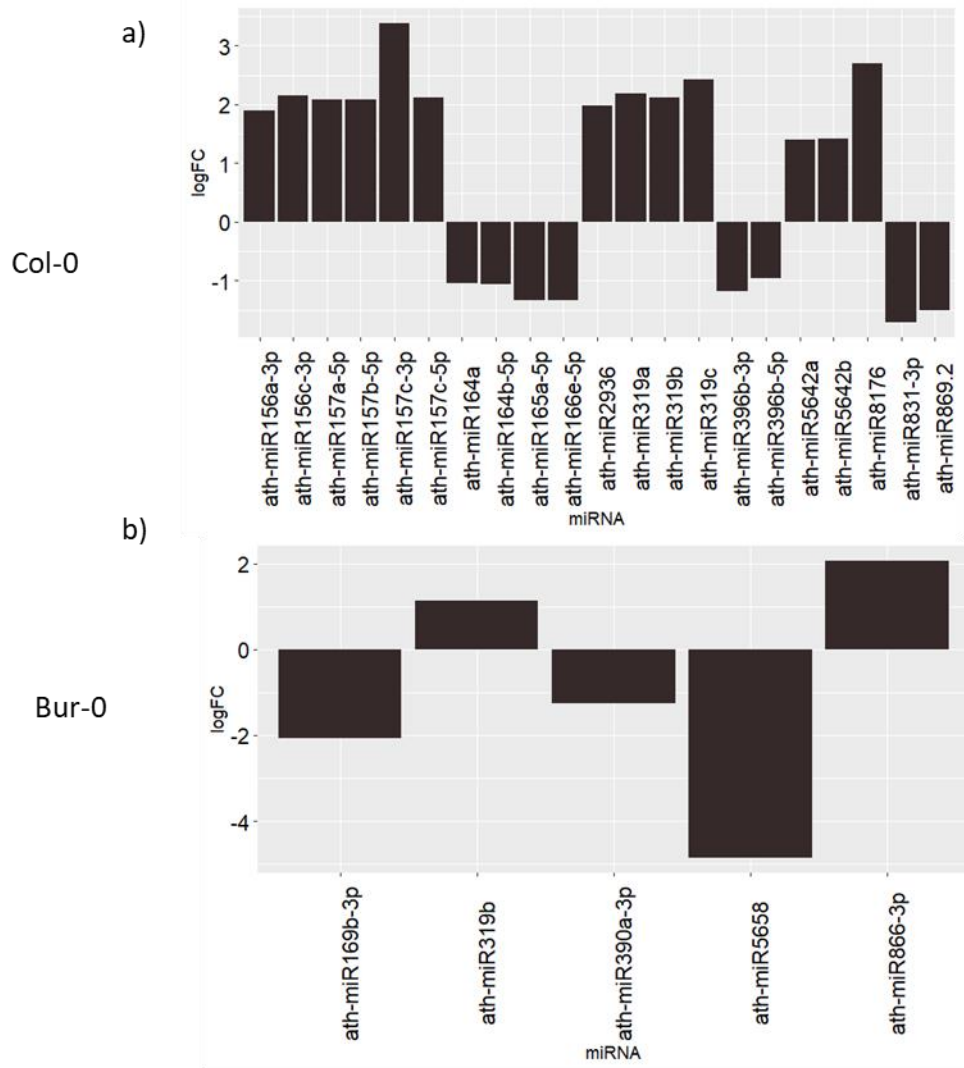


Figure IV.7.: Expression levels of *P. brassicae* responsive mature miRNA for a) Col-0 and b) Bur-0. Identification of miRNA is based on MirBase database (Kozomara & Griffiths-Jones, 2014)

2.4. Discussion

The aim of this work was to identify miRNAs involved in *Arabidopsis* response to infection by the isolate eH of *P. brassicae*. Transcriptomic analysis in Col-0 led to the identification of several structural and physiological pathways known to be impacted by clubroot infection such as the production of sugar and energy through the fermentation process and the Calvin cycle, the degradation of cell wall and the expression of several expansins and the modulation of lipid metabolism. In the partially resistant ecotype Bur-0, sugar production was more weakly induced than in Col-0 and twelve receptors involved in plant resistance against pathogens were upregulated. MiR-ome sequencing led, overall to the identification of fourteen miRNA families with only one miRNA, miR319, induced in both ecotypes. Genes targeted by miRNAs were enriched in the photosynthesis pathway, response to stress and cell wall degradation in Col-0 and in plant perception in Bur-0.

Among the fourteen miRNA families identified in this study, six were previously identified as involved in the interaction between *B. rapa*, *B. juncea* or *B. napus* with *P. brassicae* : *MIR156*, *MIR165/166*, *MIR319*, *MIR164*, *MIR169* (Verma *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2016, 2023; Li *et al.*, 2021b; Cai *et al.*, 2023); three others families – *MIR390*, *MIR831* and *MIR5658* – were involved in the response of plants to the infection of fungi (*Colletotrichum gloeosporioides* and *Alternaria alternate*), bacteria (*Pseudomonas syringae* and *Ralstonia solanacearum*) and nematodes (*Meloidogyne incognita*, *M. javanica*, *H. glycines* and *H. schachtii*) (Zhang *et al.*, 2011a; Li *et al.*, 2012; Cabrera *et al.*, 2016b; Medina *et al.*, 2017; Qin *et al.*, 2021; Shi *et al.*, 2022; Kapadia *et al.*, 2023) and three families – *MIR5642*, *MIR2936*, *MIR869* – were previously described as involved in the plant response to cold, drought and submergence stresses (Moldovan *et al.*, 2010; Aslam *et al.*, 2020; Loreti *et al.*, 2020; Arjmand *et al.*, 2023). *MIR8176* and *MIR866*, whose functions are still unknown, were detected for the first time in response to clubroot.

The presence of an asymptomatic *Arabidopsis* virus in our samples led to a depth loss within transcriptomic data for all samples explaining the low mapping efficiency (< 60%). In previous studies on *Arabidopsis*, latent virus 1 does not induced any visible symptoms nor transcriptomic changes (Verhoeven *et al.*, 2023), which is consistent with our data and comfort us in interpreting the data. In this work, few differentially regulated genes were identified at the end of the primary phase of infection on the contrary to the secondary infection phase.

Table IV.1.: Number of interactions detected between differentially expressed miRNA and mRNA in both ecotypes Col-0 and Bur-0. All interactions, mRNA upregulated/miRNA downregulated, mRNA downregulated/miRNA upregulated are given. The number of targeted genes is also given.

	Col-0	Bur-0
All interactions	972	94
mRNA upregulated/miRNA downregulated	229 (8 miRNA targeting 145 genes)	6 (2 miRNA targeting 6 genes)
mRNA downregulated/miRNA upregulated	240 (13 miRNA targeting 138 genes)	52 (3 miRNA targeting 43 genes)

These results are consistent with previous results in literature suggesting that during the early phase of infection, the plant host does not seem to react to the infection by *P. brassicae* (Jubault *et al.*, 2013; Irani *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2021b; Aigu *et al.*, 2022). Transcriptome analyses highlighted physiological processes previously identified in the interaction between *P. brassicae* and *Arabidopsis*.

Some physiological processes were specifically found to be impacted during the infection of the susceptible ecotype Col-0. Indeed, lipid metabolism was impacted with both down- and up-regulated genes involved in the phospholipid synthesis and the fatty acid biosynthesis and elongation while lipases and lipid degradation encoding genes were mostly downregulated. **This could suggest an accumulation of lipids within the infected tissues and is coherent with the presence of lipids droplets in *P. brassicae* spores described by Irani *et al.* (2018).** Interestingly, the downregulation in Col-0 of low affinity nitrate transporter (*NTR1*) suggests a role of nitrogen assimilation and concentration in plant response to *P. brassicae*. This role has been investigated in *B. napus* with a higher level of resistance observed in *B. napus* grown under nitrogen deficiency. The induction of genes involved in JA signalling, such as the betaglucohydrolase *BG1* (*AT1G52400*) or *JAR1* (*AT1G19640*), is consistent with previous works that demonstrated that Col-0 susceptible response was mediated by the accumulation of JA (Lemarié *et al.*, 2015a). Susceptible response of Col-0 to clubroot infection also led to the modulation of specialised metabolites such as the repression of isoprenoids and the induction of anthocyanins. The upregulation of the fermentation process, including the induction of *PDC1* and *PDC2* was restricted to Col-0 and supports previous results suggesting **an oxygen competition between the plant and the pathogen, leading to a hypoxic response in the host plant.**

Others physiological processes were impacted in both the susceptible and the partially resistant responses to clubroot. Indeed, infection of the susceptible ecotype Col-0 was characterised **by an increase of energy production through the upregulation of photosynthesis reactions**, Calvin cycle and fermentation process or starch and sucrose degradation supporting a diversion of carbon metabolism by the pathogen (Brodmann *et al.*, 2002; Siemens *et al.*, 2006; Jubault *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2018b; Irani *et al.*, 2018). In Bur-0, the partially resistant, the energy production pathway was less modulated than in Col-0, as we noted a downregulation of photosystem I and II and an upregulation of chloroplast respirations.

Table IV.2.: Functional enrichment analysis of genes down- and up-regulated putatively targeted by differentially expressed miRNA in both ecotypes Col-0 and Bur-0. Significant results are in green (p_{adjust}<0.05).

GO: Molecular Function						
term_name	term_id	Col0_mRNA_UP	Col0_mRNA_DOWN	Bur0_mRNA_UP	Bur0_mRNA_DOWN	
molecular_function	GO:0003674	8.04E-08	4.50E-02	1	1	1
binding	GO:0005488	1.57E-05	1	1	1	1
organic cyclic compound binding	GO:0097159	4.13E-05	1	1	1	1
heterocyclic compound binding	GO:1901363	8.60E-05	1	1	1	1
prote in domain specific binding	GO:0019904	2.52E-04	1	1	1	1
cat.alytic activity	GO:0003824	3.86E-04	1.04E-02	1	1	1.68E-01
prote in binding	GO:0005515	6.61E-04	1	1	1	1
ion binding	GO:0043167	1.28E-02	1	1	1	1
tetrapyrrole binding	GO:0046906	4.85E-02	1	1	1	1
transferase activity	GO:0016740	1	1	1	1	1.10E-03
UTP:arabinose-1-phosphate uridylyltransferase activity	GO:0010491	1	1	1	1	4.99E-02
UTP:galactose-1-phosphate uridylyltransferase activity	GO:0017103	1	1	1	1	4.99E-02
UTP:xylose-1-phosphate uridylyltransferase activity	GO:0047338	1	1	1	1	4.99E-02
glucuronate-1-phosphate uridylyltransferase activity	GO:0047350	1	1	1	1	4.99E-02
GO: Biological Process						
term_name	term_id	Col0_mRNA_UP	Col0_mRNA_DOWN	Bur0_mRNA_UP	Bur0_mRNA_DOWN	
photosynthesis, light reaction	GO:0019584	1.08E-06	1	1	1	1
photosynthesis	GO:0015979	4.33E-06	1	1	1	1
response to stress	GO:0006950	5.38E-03	1	1	1	1
response to abiotic stimulus	GO:0009528	8.09E-03	1	1	1	1
generation of precursor metabolites and energy	GO:0006091	1.14E-02	1	1	1	1
response to stimulus	GO:0050896	1.23E-02	1	1	1	1
photosynthesis, light harvesting	GO:0009765	1.85E-02	1	1	1	1
photosystem II repair	GO:0010206	2.01E-02	1	1	1	1
biological_process	GO:0008150	2.50E-02	1	1	1	1
response to radiation	GO:0009314	4.80E-02	1	1	1	1
anther wall tapetum formation	GO:0048656	4.99E-02	1	1	1	1
anther wall tapetum cell differentiation	GO:0048657	4.99E-02	1	1	1	1
positive regulation of secondary cell wall biogenesis	GO:1901348	1	9.77E-06	1	1	1
positive regulation of cell wall organization or biogenesis	GO:1903340	1	9.77E-06	1	1	1
external encapsulating structure organization	GO:0045229	1	1.04E-03	1	1	1
positive regulation of cellular component biogenesis	GO:0044089	1	3.92E-03	1	1	1
cell wall organization or biogenesis	GO:0071554	1	8.17E-03	1	1	1
regulation of secondary cell wall biogenesis	GO:2000552	1	9.25E-03	1	1	1
xylem vessel member cell differentiation	GO:0048759	1	1.10E-02	1	1	1
cell wall organization	GO:0071555	1	1.55E-02	1	1	1
regulation of cell wall organization or biogenesis	GO:1903338	1	2.07E-02	1	1	1
xylem development	GO:0010089	1	4.37E-02	1	1	1
tracheary element differentiation	GO:1905177	1	4.46E-02	1	1	1
UDP-D-galactose metabolic process	GO:0052573	1	1	1	1	4.99E-02
GO: Cellular Component						
term_name	term_id	Col0_mRNA_UP	Col0_mRNA_DOWN	Bur0_mRNA_UP	Bur0_mRNA_DOWN	
plastid	GO:0009536	2.10E-09	1	1	1	1
chloroplast	GO:0009507	2.22E-09	1	1	1	1
chloroplast thylakoid	GO:0009534	3.02E-08	1	1	1	1
plastid thylakoid	GO:0031976	3.20E-08	1	1	1	1
chloroplast thylakoid membrane	GO:0009535	1.26E-07	1	1	1	1
plastid thylakoid membrane	GO:0055035	1.34E-07	1	1	1	1
thylakoid membrane	GO:0042651	2.51E-07	1	1	1	1
plastid membrane	GO:0042170	2.59E-07	1	1	1	1
photosynthetic membrane	GO:0034857	2.59E-07	1	1	1	1
thylakoid	GO:0009579	2.78E-07	1	1	1	1
plastid envelope	GO:0009526	5.46E-07	1	1	1	1
chloroplast stroma	GO:0009570	9.71E-06	1	1	1	1
plastid stroma	GO:0009532	1.11E-05	1	1	1	1
cellular anatomical entity	GO:0110165	2.35E-05	5.97E-05	1	1	1
cytoplasm	GO:0005737	5.59E-05	1	1	1	1
cellular_component	GO:0005575	2.42E-04	4.72E-04	1	1	1
intracellular membrane-bounded organelle	GO:0043231	2.72E-04	1	1	1	1
intracellular organelle	GO:0043229	3.28E-04	1	1	1	1
membrane-bounded organelle	GO:0043227	3.52E-04	1	1	1	1
organelle	GO:0043226	4.20E-04	1	1	1	1
intracellular anatomical structure	GO:0005622	4.28E-04	1	1	1	1
envelope	GO:0031975	5.85E-04	1	1	1	1
organelle envelope	GO:0031967	5.85E-04	1	1	1	1
organelle subcompartment	GO:0031984	4.79E-03	1	1	1	1
membrane	GO:0016020	1.23E-01	2.46E-04	1	1	1
integral component of membrane	GO:0016021	2.16E-01	2.96E-03	1	1	1
intrinsic component of membrane	GO:0031224	4.61E-01	3.63E-03	1	1	1
Biosynthesis of secondary metabolites	KEGG: 01110	6.86E-01	1	1	1	1.40E-02
cell periphery	GO:0071944	1	4.81E-04	1	1	1
plasma membrane	GO:0005886	1	7.05E-04	1	1	1
Biosynthesis of nucleotide sugars	KEGG: 01250	1	1.82E-03	1	1	2.36E-01
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	KEGG: 00520	1	6.96E-03	1	1	3.13E-01

The structure of cell wall seems to be impacted in both ecotypes with, mostly, the downregulation of cell wall biosynthesis genes and the upregulation of expansins in Col-0 and the downregulation of cell wall degradation enzymes in Bur-0 and the upregulation of fewer expansins. This is consistent with clubroot **symptoms of hypertrophy which involve cell wall loosening and cell expansion processes** (Devos *et al.*, 2005; Jubault *et al.*, 2013; Zhang *et al.*, 2016a; Irani *et al.*, 2018) and the partially resistant response of Bur-0. Auxin biosynthesis pathway was upregulated in both ecotypes, through the induction of nitrilase (*NIT2*), displaying a greater induction in Col-0 than in Bur-0 (logFC=2.93 and 1.92, respectively), as reported before (Jubault *et al.*, 2013). *PAD3*, a gene coding for a camalexin synthase was induced in both Col-0 and Bur-0 with a higher fold change **in Bur-0 which is consistent with the accumulation of higher content of camalexin previously observed in Bur-0 than in Col-0** (Lemarié *et al.*, 2015b). Furthermore, we found that the arginase *ARGAH2* (*AT4G08870*) was induced at similar level during both Col-0 and Bur-0 response to infection, which was also reported previously as a basal defence mechanisms that aimed to reduce the cellular proliferation induced during the infection (Jubault *et al.*, 2008a, 2013; Gravot *et al.*, 2012). While disease resistance coding gene were downregulad in Col-0, Bur-0 response to clubroot, led to the induction of several receptors involved in disease resistance such as LRR-receptors from the DUF family, thus suggesting that the partial resistant ecotype, Bur-0, **could mount up a stronger disease response to clubroot than Col-0** (Jubault *et al.*, 2013). Interestingly, several epigenetic factors involved in epigenetic processes such as DNA methylation and histone modifications were upregulated in both ecotypes and **suggest the role of epigenetic regulations in plant response to *P. brassicae*.**

The six *MIRNA* families previously identified as involved in *Brassica* response to clubroot are involved in cytokinin accumulation, cell proliferation and the photosynthesis pathway. Twenty-five miRNA belonging to fourteen miRNA families were deregulated during *Arabidopsis* response to clubroot. Among them, six families were already described in *B. rapa* or *B. napus* response to clubroot. The *MIR156* family has been described as involved in time control of flowering and vegetative growth in *Arabidopsis* (Kim *et al.*, 2012; Xu *et al.*, 2016) as well as root elongation (Barrera-Rojas *et al.*, 2020) through the regulation of their target genes *SQUAMOLA LIKE PROTEIN* (*SPL*) or the cytokinin signalling pathway. In our data, miR156 was induced during the Col-0 susceptible response whereas *CKX6*, involved in cytokinin degradation is downregulated.

Table IV.3.: Functional enrichment analysis of genes upregulated (A) and downregulated (B) in Col-0 for each differentially expressed miRNA family. Significant results are in green (p_{adjust}<0.05).

a

Col_0_14DPI_mRNA_upregulated						
GO: Molecular Function						
term_name	term_id	miR164	miR165/miR166	miR396	miR831	miR869
molecular_function	GO:0003674	1.01E-02	1.52E-01	1	1	1.81E-01
protein binding	GO:0005515	1.72E-02	1	3.78E-01	1	1
NAD(P)+ nucleosidase activity	GO:0050135	1	1	1.94E-02	1	1
NAD+ nucleotidase, cyclic ADP-ribose generating	GO:0061809	1	1	1.94E-02	1	1
NAD+ nucleosidase activity	GO:0003953	1	1	1.94E-02	1	1
protein domain specific binding	GO:0019604	1	2.97E-02	1.00E-01	1	1
GO: Biological Process						
term_name	term_id	miR164	miR165/miR166	miR396	miR831	miR869
photosynthesis, light reaction	GO:0019684	1	1.57E-03	1	1	2.96E-01
photosynthesis	GO:0015979	1	2.04E-03	1	1	1
photosynthesis, light harvesting	GO:0009765	1	1.41E-02	1	1	1
GO: Cellular Component						
term_name	term_id	miR164	miR165/miR166	miR396	miR831	miR869
chloroplast thylakoid	GO:0009534	1	7.79E-05	1	1	1.84E-01
plastid thylakoid	GO:0031976	1	8.02E-05	1	1	1.86E-01
thylakoid	GO:0009579	1	2.32E-04	1	1	3.11E-01
chloroplast thylakoid membrane	GO:0009535	1	2.57E-04	1	1	8.77E-01
plastid thylakoid membrane	GO:0053035	1	2.65E-04	1	1	8.88E-01
thylakoid membrane	GO:0042651	1	3.59E-04	1	1	1
photosynthetic membrane	GO:0034357	1	3.64E-04	1	1	1
chloroplast	GO:0009507	1	4.71E-04	1	5.31E-02	1.03E-02
plastid envelope	GO:0009526	1	1.14E-03	1	1	4.60E-02
chloroplast stroma	GO:0009570	1	1.37E-03	1	1	1.01E-01
plastid stroma	GO:0009532	1	1.46E-03	1	1	1.05E-01
plastid	GO:0009536	1	4.17E-03	1	4.24E-03	1.01E-02
plastid membrane	GO:0042170	1	5.62E-03	1	7.63E-01	4.84E-01
cytoplasm	GO:0005737	1	1.10E-02	1	1.75E-01	3.33E-02
plant-type vacuole	GO:0000825	1	1	1	1	1.61E-02
vacuole	GO:0005773	1	1	1	1	1.69E-02
cellular anatomical entity	GO:0110165	1.97E-01	2.57E-02	1	1	1.49E-01
organelle envelope	GO:0031967	1	2.93E-02	1	1	3.92E-01
envelope	GO:0031975	1	2.93E-02	1	1	3.92E-01
extracellular matrix	GO:0031012	1	1	1	1	3.09E-02
intracellular organelle	GO:0043229	1	4.49E-02	1	6.20E-01	9.60E-01
intracellular anatomical structure	GO:0005622	1	4.62E-02	1	1.57E-01	5.91E-01
organelle	GO:0043226	1	4.99E-02	1	6.55E-01	1
thioglycosidase complex	GO:0010169	1	1	4.99E-02	1	1
WP:WIPPathway						
term_name	term_id	miR164	miR165/miR166	miR396	miR831	miR869
Brassinolide biosynthetic pathway	WP:WP2634	1	1	1	1.33E-02	1

b

Col_0_14DPI_mRNA_downregulated						
GO: Molecular Function						
term_name	term_id	miR156/miR157	miR2936	miR319	miR5642	miR8176
catalytic activity	GO:0003824	9.83E-04	1	1	1	1
DNA-binding transcription factor activity	GO:0003700	1	7.87E-01	1.44E-02	1	1
transcription regulator activity	GO:0140110	1	1	2.34E-02	1	1
UDP-glucose 4-epimerase activity	GO:0003978	3.11E-02	1	1	1	1
GO: Biological Process						
term_name	term_id	miR156/miR157	miR2936	miR319	miR5642	miR8176
positive regulation of cell wall organization or biogenesis	GO:1903340	1	7.33E-05	1	1	1
positive regulation of secondary cell wall biogenesis	GO:1901348	1	7.33E-05	1	1	1
positive regulation of cellular component biogenesis	GO:0044089	1	5.33E-03	1	1	1
regulation of secondary cell wall biogenesis	GO:2000652	1	1.01E-02	1	1	1
regulation of cell wall organization or biogenesis	GO:1903338	1	1.85E-02	1	1	1
external encapsulating structure organization	GO:0045229	2.03E-02	1	1	1	1
GO: Cellular Component						
term_name	term_id	miR156/miR157	miR2936	miR319	miR5642	miR8176
cell periphery	GO:0071944	5.39E-02	2.91E-03	1	1	1
cellular anatomical entity	GO:0110165	3.46E-03	3.12E-01	1	1	1
cellular_component	GO:0005575	5.56E-03	7.37E-01	1	1	1
membrane	GO:0016020	8.50E-03	9.05E-02	1	1	1
intrinsic component of membrane	GO:0031224	1	9.41E-03	1	1	1
plasma membrane	GO:0005886	1.07E-02	4.31E-02	1	1	1
integral component of membrane	GO:0016021	7.66E-01	1.73E-02	1	1	1
Biosynthesis of nucleotide sugars	KEGG:01250	1.25E-03	1	8.13E-01	1	1
Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	KEGG:00520	3.76E-03	1	1	1	1

MIR156 was also found as upregulated in a susceptible *B. napus* genotype during the secondary phase of infection (Verma *et al.*, 2014) and repressed during the early response of a susceptible *B. juncea* genotype to *P. brassicae* (Cai *et al.*, 2023), **which is therefore coherent with the accumulation of cytokinin during the secondary phase of infection by *P. brassicae*** (Devos *et al.*, 2006). The *MIR165/MIR166* family has been described as involved in the elongation process of primary roots (Carlsbecker *et al.*, 2010) and is known to target the transcription factors HD-Zip family (Jones-Rhoades, 2012). In our data *MIR165/166* were downregulated in Col-0 and their target genes were enriched in the photosynthesis pathway and the energy production. This result disagreed with previous results that found *MIR165/166* upregulated in a susceptible *B. napus* genotype during the secondary phase of the infection (Verma *et al.*, 2014) and down-regulated during the early response of a susceptible *B. juncea* genotype to clubroot (Cai *et al.*, 2023) **suggesting different physiological responses to clubroot depending on the species and infection phase.** *MIR164* is known to be involved in the control of cell proliferation in leaves through the downregulation of his target gene *CUC2* (Baker *et al.*, 2005; Sieber *et al.*, 2007), which repressed cell proliferation, or through the control of *NAC* transcription factor family (*NAM*, *ATAF1/2*, and *CUC2*) in roots, involved in the promotion of lateral root growth (Guo *et al.*, 2005). In this work, **miR164 was downregulated during the Col-0 susceptible response and one of his gene target, *CUC1*, a *NAC* transcription factor, was induced which is coherent with the upregulation of cell proliferation and gall development.** The induction of *CUC1* in roots, however, is not coherent with previous report on the expression of *CUC1*, usually restricted to the stem and the bud. In a susceptible *B. rapa* genotype, *MIR164* was induced during the primary phase and the latter stage of infection (Wei *et al.*, 2023) and repressed during the secondary phase of infection in a resistant genotype of *B. rapa* (Wei *et al.*, 2016). *MIR319*, is also involved in the cellular proliferation notably in leaf (Koyama *et al.*, 2017) through the regulation of the transcription factors *TCP* and *MYB* as well as the regulation of *MIR396* which itself represses the expression of growth regulating factors (GRF) (Rodriguez *et al.*, 2010, 2015). In this study, *MIR319* was upregulated in Col-0 and Bur-0 responses to clubroot while *MIR396*, *TCP3* and *4* as well as *MYB33* were downregulated in Col-0. None of these targets were identified in Bur-0. **This expression pattern is consistent with cell proliferation and gall development and with the involvement of miR319 in the functionality of galls** formed by the nematode *M. incognita* (Zhao *et al.*, 2015). However, these results disagreed with other studies on clubroot, as miR319 is repressed in the susceptible response of *B. rapa* and *B. napus* to clubroot (Verma *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2023).

Table IV.4.: Functional enrichment analysis of genes upregulated (A) and downregulated (B) in Bur-0 for each differentially expressed miRNA family. Significant results are in green (p_{adjust}<0.05).

a

Bur_0_14DPI_mRNA_upregulated				
GO: Molecular Function				
term_name	term_id	miR169	miR390	miR5638
chitosan binding	GO:2001080	4.98E-02	1	1
GO: Biological Process				
term_name	term_id	miR169	miR390	miR5638
response to peptidoglycan	GO:0032494	4.98E-02	1	1
cell surface pattern recognition receptor signaling pathway	GO:0002752	4.98E-02	1	1
detection of peptidoglycan	GO:0032499	4.98E-02	1	1
GO: Cellular Component				
term_name	term_id	miR169	miR390	miR5638
microtubule minus-end	GO:0036449	1.67E-02	1	1

b

Bur_0_14DPI_mRNA_downregulated				
GO: Molecular Function				
term_name	term_id	miR319	miR866	
transferase activity	GO:0016740	1.04E-02		1
glucuronate-1-phosphate uridylyltransferase activity	GO:0047350	4.98E-02		1
UTP:xylose-1-phosphate uridylyltransferase activity	GO:0047338	4.98E-02		1
UTP:galactose-1-phosphate uridylyltransferase activity	GO:0017103	4.98E-02		1
UTP:arabinose-1-phosphate uridylyltransferase activity	GO:0010491	4.98E-02		1
GO: Biological Process				
term_name	term_id	miR319	miR866	
UDP-D-galactose metabolic process	GO:0052573	4.98E-02		1
KEGG Pathway				
term_name	term_id	miR319	miR866	
Biosynthesis of secondary metabolites	KEGG:01110	8.24E-03		1

Furthermore, miR319 was reported as necessary in the functionality of galls induced in *S. lycopersicum* by *M. incognita* (Zhao *et al.*, 2015). Like in the susceptible response of Col-0, *MIR396* was repressed during the susceptible response of *B. napus* (Verma *et al.*, 2014) **which is consistent with the hyperplasia symptoms induced upon *P. brassicae* infection.** *MIR169* is involved in the control of root architecture through the regulation of NF-YA transcription factor. *MIR169* was downregulated in Bur-0 and targeted genes enriched in pathogen perception.

Three *miRNA* families not yet identified upon clubroot infection but involved in plant response to other pathogens are involved in auxin accumulation

Some miRNAs identified in this work, but not reported previously in the *P. brassicae*-*Brassica* interactions, were however described as involved in other plant-pathogen interactions. *MIR390*, which was also reported as upregulated during the **infection of *A. thaliana* by the root knot nematode *M. incognita*** (Medina *et al.*, 2017), is known to target *AUXIN RESPONSIVE FACTOR 2, 3 and 4* which lead to the accumulation of auxin and the development of lateral root development (Aida *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2010; Promchuea *et al.*, 2017). In our work, *MIR390* is repressed in Bur-0 during the infection by *P. brassicae* and **could thus be involved in the weaker development of galls in the partially resistant ecotype.** In other pathosystems, the role of *MIR390* is less clear. *MIR390* is involved in apple resistance to the fungal pathogen *Colletotrichum gloeosporioides* (Shi *et al.*, 2022) while promoting apple susceptibility to *Alternaria alternata* infection (Qin *et al.*, 2021). The infection of *Arabidopsis* by the virulent strain of *Pseudomonas syringae* DC3000 led to the downregulation of *MIR390* (Zhang *et al.*, 2011a). MiR5658, downregulated in Bur-0 response to clubroot, is induced upon the infection of *Solanum melongena* by *Ralstonia solanacearum* (Kapadia *et al.*, 2023). *MIR831*, downregulated in Col-0 response to clubroot was reported as upregulated upon *A. thaliana* infection by *M. incognita* (Medina *et al.*, 2017). However, no physiological process has been identified for these two miRNA families and further work is needed in order to identify their roles in plant response to pathogen and in particular to clubroot.

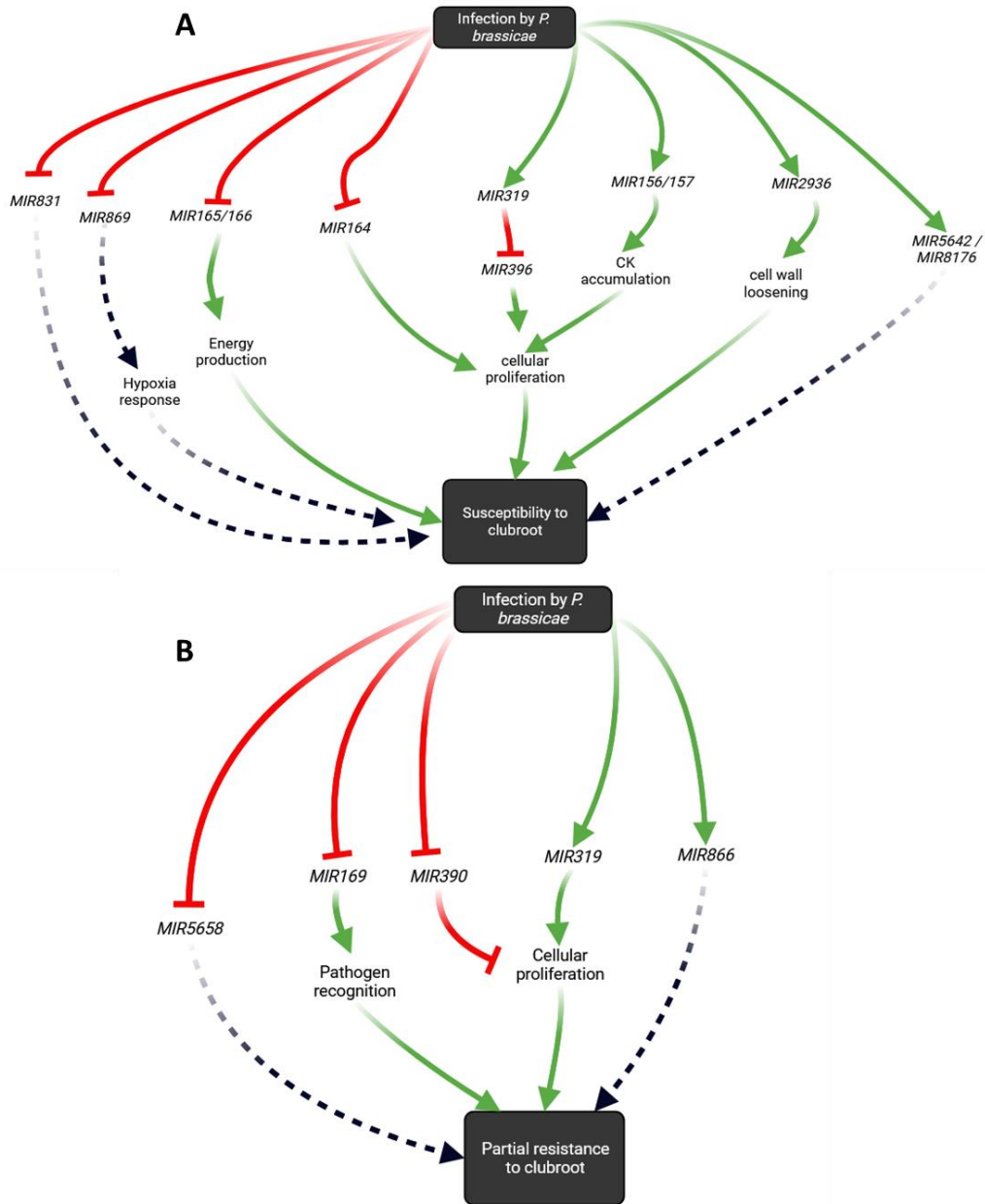


Figure IV.8.: Proposed model for the role of miRNAs in *A. thaliana* response to clubroot.

Green arrows represent induction of the corresponding pathway while red lines represent repression of the corresponding pathway. A) In the sensitive ecotype, Col-0, infection results in: the repression of *MIR165/MIR166*, promoting energy production; the repression of *MIR164*, *MIR396*, and the induction of *MIR319*, favoring cell proliferation; the induction of *MIR156/MIR157*, promoting cytokinin (CK) accumulation and cell proliferation; the induction of *MIR2936*, favouring cell wall degradation. The alteration in the expression of these miRNAs promotes the susceptibility response. The role of three miRNA families, *MIR831* (repressed), *MIR5642*, and *MIR8176* (induced) is currently unknown. The repression of *MIR869*, involved in the hypoxic response, suggests a crosstalk in plant responses to these two stresses. B) In the partially resistant ecotype, Bur-0, infection results in: the repression of *MIR169*, allowing the expression of pathogen attack perception genes and the partial resistance response; the repression of *MIR390*, leading to the suppression of cell proliferation and a role in partial resistance. Infection in Bur-0 also leads to the induction of *MIR319*, promoting cell proliferation and potentially contributing to the partial susceptibility of the Bur-0 ecotype. The role of two miRNA families, *MIR5658* (repressed) and *MIR866* (induced) is still unknown.

Three *MIRNA* families previously involved in abiotic stress response were deregulated in response to clubroot and are involved in cell wall biosynthesis

Some miRNA identified in our study were not previously reported in plant response to biotic stress but were reported as deregulated in abiotic stress responses. *MIR2936*, induced in Col-0, which seems to be involved in the downregulation of genes coding for cell wall biosynthesis was also induced under drought stress (Arjmand *et al.*, 2023) and submergence (Loreti *et al.*, 2020). Another miRNA family, *MIR869* was shown to be induced upon hypoxia stress in *A. thaliana* roots (Moldovan *et al.*, 2010). Previous works on *Brassicaceae* response to clubroot demonstrated that ***P. brassicae* infection could result in an oxygen competition between the plant and the pathogen, leading to an hypoxic response in the host plant** (Jubault *et al.*, 2013; Schuller *et al.*, 2014; Gravot *et al.*, 2016b). ***MIR2936* and *MIR869* could thus be part of a common response of *Arabidopsis* to hydric stress and to inducing gall pathogen.** *MIR5642*, induced during the Col-0 infection by *P. brassicae*, is also induced in *Arabidopsis* response to cold (Aslam *et al.*, 2020), although no physiological process are associated.

MIR8176 and *MIR866*, whose functions are still unknown, were detected for the first time in response to clubroot. *MIR8176* was induced in the susceptible ecotype Col-0 and *miR866* was upregulated in the partially resistant one Bur-0, suggesting putatively new defence or susceptible mechanisms in plant response to clubroot.

In conclusion, this work confirmed the involvement of some miRNA in the *Brassicaceae-P. brassicae* interaction and enables advances on our knowledge on their role. Notably, *miR319*, which regulates cell proliferation in roots, through the downregulation of *miR396* could be a major player in the clubroot gall formation. Moreover, this work enabled the identification of new miRNA involved in plant response to clubroot with notably *miR2936*, which appeared to be involved in the negative regulation of genes enriched in the cell wall biosynthesis pathway as well as in the hypoxic response. A proposition of the putative miRNA roles in the *Arabidopsis* response to the isolate eH is presented in **Fig. IV. 8**. Further work is required to fully validate the involvement of these miRNA in the *Arabidopsis* susceptible and partially resistance responses to clubroot. Analysis of *Arabidopsis* knock-out mutants for some of these miRNA as well as the study of their localisation and expression pattern is underway. Furthermore, degradome sequencing, i.e. sequencing of the miRNA that are degraded within cells (Zheng, 2019) could enable the validation of the miRNA targets identified in this study using psRNA-Target (Dai *et al.*, 2018).

2.5. Acknowledgments

We acknowledge our IGEPP colleagues for their technical support and the Biological Resource Centers BrACySol and Versailles Arabidopsis Stock Center for providing Brassica and Arabidopsis seeds, respectively. This research was supported by L'Institut Agro Rennes-Angers, INRAe and Université de Rennes. We thank Plant2pro for funding the PANDORE project. Mathilde Petitpas was a PhD student co-funded by INRAe BAP department and Brittany Region.

2.6. Authors Contributions

MJ, JL and CL carried out the experiments and collected the data; JL and CL carried out the molecular biology work; MP carried out the bioinformatics analyses; MP, MJM-D and MJ wrote the article and MJM-D and MJ designed and coordinated the study.

2.7. Bibliography

- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemsen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh Y-S, Amasino R, Scheres B (2004) The PLETHORA Genes Mediate Patterning of the Arabidopsis Root Stem Cell Niche. *Cell* 119: 109–120
- Aigu Y, Daval S, Gazengel K, Marnet N, Lariagon C, Laperche A, Legeai F, Manzanares-Dauleux MJ, Gravot A (2022) Multi-Omic Investigation of Low-Nitrogen Conditional Resistance to Clubroot Reveals Brassica napus Genes Involved in Nitrate Assimilation. *Front Plant Sci* 13: 790563
- Aigu Y, Laperche A, Mendes J, Lariagon C, Guichard S, Gravot A, Manzanares-Dauleux MJ (2018) Nitrogen supply exerts a major/minor switch between two QTLs controlling *Plasmodiophora brassicae* spore content in rapeseed. *Plant Pathol* 67: 1574–1581
- Alix K, Lariagon C, Delourme R, Manzanares-Dauleux MJ (2007) Exploiting natural genetic diversity and mutant resources of Arabidopsis thaliana to study the A.thaliana-Plasmodiophora brassicae interaction. *Plant Breed* 126: 218–221
- Arjmand MP, Lahiji HS, Golfazani MM, Biglouei MH (2023) New insights on the regulatory network of drought-responsive key genes in Arabidopsis thaliana. *Genetica* 151: 29–45
- Aslam M, Sugita K, Qin Y, Rahman A (2020) Aux/IAA14 Regulates microRNA-Mediated Cold Stress Response in Arabidopsis Roots. *Int J Mol Sci* 21: 8441
- Baker CC, Sieber P, Wellmer F, Meyerowitz EM (2005) The early extra petals1 Mutant Uncovers a Role for MicroRNA miR164c in Regulating Petal Number in Arabidopsis. *Curr Biol* 15: 303–315

- Barrera-Rojas CH, Rocha GHB, Polverari L, Pinheiro Brito DA, Batista DS, Notini MM, da Cruz ACF, Morea EGO, Sabatini S, Otoni WC, et al (2020) miR156-targeted SPL10 controls *Arabidopsis* root meristem activity and root-derived de novo shoot regeneration via cytokinin responses. *J Exp Bot* 71: 934–950
- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J (2001) Growth Stage–Based Phenotypic Analysis of *Arabidopsis*: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. 12
- Brodmann D, Schuller A, Ludwig-Müller J, Aeschbacher RA, Wiemken A, Boller T, Wingerl A (2002) Induction of Trehalase in *Arabidopsis* Plants Infected With the Trehalose-Producing Pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mol Plant-Microbe Interactions®* 15: 693–700
- Cabrera J, Barcala M, García A, Rio-Machín A, Medina C, Jaubert-Possamai S, Favery B, Maizel A, Ruiz-Ferrer V, Fenoll C, et al (2016) Differentially expressed small RNA s in *Arabidopsis* galls formed by *Meloidogyne javanica*: a functional role for miR390 and its TAS 3-derived tasi RNA s. *New Phytol* 209: 1625–1640
- Cai Z, Xiang M, Tan J, Cheng C, Liu Y, Shi J, Shi M, Li J, Wang D (2023) High-throughput sequencing reveals tuber mustard genes responsive to *Plasmodiophora brassicae* in the early stage of infection. *Physiol Mol Plant Pathol* 123: 101943
- Carlsbecker A, Lee J-Y, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, et al (2010) Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465: 316–321
- Che P, Lall S, Nettleton D, Howell SH (2006) Gene Expression Programs during Shoot, Root, and Callus Development in *Arabidopsis* Tissue Culture. *Plant Physiol* 141: 620–637
- Cucinotta M, Manrique S, Cuesta C, Benkova E, Novak O, Colombo L (2018) CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1) and CUC2 regulate cytokinin homeostasis to determine ovule number in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 69: 5169–5176
- Dai X, Zhuang Z, Zhao PX (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). 6
- Devos S, Laukens K, Deckers P, Van Der Straeten D, Beeckman T, Inzé D, Van Onckelen H, Witters E, Prinsen E (2006) A Hormone and Proteome Approach to Picturing the Initial Metabolic Events During *Plasmodiophora brassicae* Infection on *Arabidopsis*. *Mol Plant-Microbe Interactions®* 19: 1431–1443
- Devos S, Vissenberg K, Verbelen J-P, Prinsen E (2005) Infection of Chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth: impacts on cell wall metabolism and hormone balance. *New Phytol* 166: 241–250
- Dixon GR (2009a) The Occurrence and Economic Impact of *Plasmodiophora brassicae* and Clubroot Disease. *J Plant Growth Regul* 28: 194–202
- Dixon GR (2009b) *Plasmodiophora brassicae* in its Environment. *J Plant Growth Regul* 28: 212–228

- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29: 15–21
- Fahling M, Graf H, Siemens J (2003) Pathotype Separation of *Plasmodiophora brassicae* by the Host Plant. *J Phytopathol* 151: 425–430
- Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N (2012) miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res* 40: 37–52
- Fuchs H (1996) Identification of a Gene in *Arabidopsis thaliana* Controlling Resistance to Clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) and Characterization of the Resistance Response. *Mol Plant Microbe Interact* 9: 091
- Gravot A, Deleu C, Wagner G, Lariagon C, Lugan R, Todd C, Wendehenne D, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ (2012) Arginase Induction Represses Gall Development During Clubroot Infection in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* 53: 901–911
- Gravot A, Richard G, Lime T, Lemarié S, Jubault M, Lariagon C, Lemoine J, Vicente J, Robert-Seilaniantz A, Holdsworth MJ, et al (2016) Hypoxia response in Arabidopsis roots infected by *Plasmodiophora brassicae* supports the development of clubroot. *BMC Plant Biol* 16: 251
- Griffiths-Jones S (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res* 34: D140–D144
- Guo H-S, Xie Q, Fei J-F, Chua N-H (2005) MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor *NAC1* to Downregulate Auxin Signals for Arabidopsis Lateral Root Development. *Plant Cell* 17: 1376–1386
- Irani S, Trost B, Waldner M, Nayidu N, Tu J, Kusalik AJ, Todd CD, Wei Y, Bonham-Smith PC (2018) Transcriptome analysis of response to *Plasmodiophora brassicae* infection in the Arabidopsis shoot and root. *BMC Genomics* 19: 23
- Jin D, Wang Y, Zhao Y, Chen M (2013) MicroRNAs and Their Cross-Talks in Plant Development. *J Genet Genomics* 40: 161–170
- Jones-Rhoades MW (2012) Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Mol Biol* 80: 3–16
- Jubault M, Hamon C, Gravot A, Lariagon C, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ (2008a) Differential Regulation of Root Arginine Catabolism and Polyamine Metabolism in Clubroot-Susceptible and Partially Resistant Arabidopsis Genotypes. *Plant Physiol* 146: 2008–2019
- Jubault M, Lariagon C, Simon M, Delourme R, Manzanares-Dauleux MJ (2008b) Identification of quantitative trait loci controlling partial clubroot resistance in new mapping populations of *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* 117: 191–202
- Jubault M, Lariagon C, Taconnat L, Renou J-P, Gravot A, Delourme R, Manzanares-Dauleux MJ (2013) Partial resistance to clubroot in Arabidopsis is based on changes in the host

- primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity. *Funct Integr Genomics* 13: 191–205
- Kageyama K, Asano T (2009) Life Cycle of *Plasmodiophora brassicae*. *J Plant Growth Regul* 28: 203–211
- Kapadia C, Datta R, Mahammad SM, Tomar RS, Kheni JK, Ercisli S (2023) Genome-Wide Identification, Quantification, and Validation of Differentially Expressed miRNAs in Eggplant (*Solanum melongena* L.) Based on Their Response to *Ralstonia solanacearum* Infection. *ACS Omega* 8: 2648–2657
- Kim JJ, Lee JH, Kim W, Jung HS, Huijser P, Ahn JH (2012) The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 Module Regulates Ambient Temperature-Responsive Flowering via FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 159: 461–478
- Kobelt P, Siemens J, Sacristán MD (2000) Histological characterisation of the incompatible interaction between *Arabidopsis thaliana* and the obligate biotrophic pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mycol Res* 104: 220–225
- Koch E, Cox R, Williams PH (1991) Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Plasmodiophora brassicae*. *J Phytopathol* 132: 99–104
- Koroban NV, Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Sadritdinova AF, Fedorova MS, Snezhkina AV, Bolsheva NL, Muravenko OV, Dmitriev AA, Melnikova NV (2016) The role of microRNA in abiotic stress response in plants. *Mol Biol* 50: 337–343
- Koyama T, Sato F, Ohme-Takagi M (2017) Roles of miR319 and TCP Transcription Factors in Leaf Development. *Plant Physiol* 175: 874–885
- Kozomara A, Griffiths-Jones S (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res* 42: D68–D73
- Laperche A, Aigu Y, Jubault M, Ollier M, Guichard S, Glory P, Strelkov Se, Gravot A, Manzanares-Dauleux Mj (2017) Clubroot resistance QTL are modulated by nitrogen input in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* 130: 669–684
- Lemarié S, Robert-Seilaniantz A, Lariagon C, Lemoine J, Marnet N, Jubault M, Manzanares-Dauleux MJ, Gravot A (2015a) Both the Jasmonic Acid and the Salicylic Acid Pathways Contribute to Resistance to the Biotrophic Clubroot Agent *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* pcv127
- Lemarié S, Robert-Seilaniantz A, Lariagon C, Lemoine J, Marnet N, Levrel A, Jubault M, Manzanares-Dauleux MJ, Gravot A (2015b) Camalexin contributes to the partial resistance of *Arabidopsis thaliana* to the biotrophic soilborne protist *Plasmodiophora brassicae*. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2015.00539
- Li H, Li X, Xuan Y, Jiang J, Wei Y, Piao Z (2018) Genome Wide Identification and Expression Profiling of SWEET Genes Family Reveals Its Role During *Plasmodiophora brassicae*-Induced Formation of Clubroot in *Brassica rapa*. *Front Plant Sci* 9: 207

- Li Q, Shah N, Zhou X, Wang H, Yu W, Luo J, Liu Y, Li G, Liu C, Zhang C, et al (2021) Identification of Micro Ribonucleic Acids and Their Targets in Response to *Plasmodiophora brassicae* Infection in *Brassica napus*. *Front Plant Sci* 12: 734419
- Li X, Wang X, Zhang S, Liu D, Duan Y, Dong W (2012) Identification of Soybean MicroRNAs Involved in Soybean Cyst Nematode Infection by Deep Sequencing. *PLOS ONE* 7: e39650
- Liao R, Wei X, Zhao Y, Xie Z, Nath UK, Yang S, Su H, Wang Z, Li L, Tian B, et al (2023) bra-miR167a Targets ARF8 and Negatively Regulates *Arabidopsis thaliana* Immunity against *Plasmodiophora brassicae*. *Int J Mol Sci* 24: 11850
- Liao Y, Smyth GK, Shi W (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* 30: 923–930
- Liégard B, Baillet V, Etcheverry M, Joseph E, Lariagon C, Lemoine J, Evrard A, Colot V, Gravot A, Manzanares-Dauleux MJ, et al (2019a) Quantitative resistance to clubroot infection mediated by transgenerational epigenetic variation in *Arabidopsis*. *New Phytol* 222: 468–479
- Liégard B, Gravot A, Quadrana L, Aigu Y, Bénéjam J, Lariagon C, Lemoine J, Colot V, Manzanares-Dauleux MJ, Jubault M (2019b) Natural Epiallelic Variation is Associated with Quantitative Resistance to the Pathogen *Plasmodiophora brassicae*. doi: 10.1101/776989
- Loreti E, Betti F, Ladera-Carmona MJ, Fontana F, Novi G, Valeri MC, Perata P (2020) ARGONAUTE1 and ARGONAUTE4 Regulate Gene Expression and Hypoxia Tolerance1[OPEN]. *Plant Physiol* 182: 287–300
- Ludwig-Müller J, Pieper K, Ruppel M, Cohen JD, Epstein E, Kiddle G, Bennett R (1999) Indole glucosinolate and auxin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. glucosinolate mutants and the development of clubroot disease. *Planta* 208: 409–419
- Malinowski R, Novák O, Borhan MH, Spíchal L, Strnad M, Rolfe SA (2016) The role of cytokinins in clubroot disease. *Eur J Plant Pathol* 145: 543–557
- Manzanares-Dauleux MJ, Divaret I, Baron F, Thomas G (2000) Evaluation of French Brassica oleracea landraces for resistance to *Plasmodiophora brassicae*. 8
- Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A (2010) miR390, *Arabidopsis TAS3* tasiRNAs, and Their *AUXIN RESPONSE FACTOR* Targets Define an Autoregulatory Network Quantitatively Regulating Lateral Root Growth. *Plant Cell* 22: 1104–1117
- Medina C, Rocha M, Magliano M, Ratpopoulo A, Revel B, Marteu N, Magnone V, Lebrigand K, Cabrera J, Barcala M, et al (2017) Characterization of microRNAs from *Arabidopsis* galls highlights a role for miR159 in the plant response to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytol* 216: 882–896
- Moldovan D, Spriggs A, Yang J, Pogson BJ, Dennis ES, Wilson IW (2010) Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in *Arabidopsis*. *J Exp Bot* 61: 165–177

- Müller R, Morant M, Jarmer H, Nilsson L, Nielsen TH (2007) Genome-Wide Analysis of the Arabidopsis Leaf Transcriptome Reveals Interaction of Phosphate and Sugar Metabolism. *Plant Physiol* 143: 156–171
- Olszak M, Truman W, Stefanowicz K, Sliwinska E, Ito M, Walerowski P, Rolfe S, Malinowski R (2019) Transcriptional profiling identifies critical steps of cell cycle reprogramming necessary for *Plasmodiophora brassicae* -driven gall formation in Arabidopsis. *Plant J* 97: 715–729
- Paul P, Chhapekar SS, Rameneni JJ, Oh SH, Dhandapani V, Subburaj S, Shin S-Y, Ramchiary N, Shin C, Choi SR, et al (2021) MiR1885 Regulates Disease Tolerance Genes in Brassica rapa during Early Infection with Plasmodiophora brassicae. *Int J Mol Sci* 22: 9433
- Prerostova S, Dobrev P, Konradyova V, Knirsch V, Gaudinova A, Kramna B, Kazda J, Ludwig-Müller J, Vankova R (2018) Hormonal Responses to Plasmodiophora brassicae Infection in Brassica napus Cultivars Differing in Their Pathogen Resistance. *Int J Mol Sci* 19: 4024
- Promchuea S, Zhu Y, Chen Z, Zhang J, Gong Z (2017) ARF2 coordinates with PLETHORAs and PINs to orchestrate ABA-mediated root meristem activity in Arabidopsis: ARF2 mediates PLTs and PINs in ABA signaling. *J Integr Plant Biol* 59: 30–43
- Qin L, Zhao L, Wu C, Qu S, Wang S (2021) Identification of microRNA transcriptome in apple response to Alternaria alternata infection and evidence that miR390 is negative regulator of defense response. *Sci Hortic* 289: 110435
- R Core Team (2022) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, Vilo J (2019) g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). *Nucleic Acids Res* 47: W191–W198
- Rodriguez RE, Ercoli MF, Debernardi JM, Breakfield NW, Mecchia MA, Sabatini M, Cools T, De Veylder L, Benfey PN, Palatnik JF (2015) MicroRNA miR396 Regulates the Switch between Stem Cells and Transit-Amplifying Cells in Arabidopsis Roots. *Plant Cell* 27: 3354–3366
- Rodriguez RE, Mecchia MA, Debernardi JM, Schommer C, Weigel D, Palatnik JF (2010) Control of cell proliferation in Arabidopsis thaliana by microRNA miR396. *Development* 137: 103–112
- Schuller A, Kehr J, Ludwig-Müller J (2014) Laser Microdissection Coupled to Transcriptional Profiling of Arabidopsis Roots Inoculated by Plasmodiophora brassicae Indicates a Role for Brassinosteroids in Clubroot Formation. *Plant Cell Physiol* 55: 392–411
- Shi J, Jiang Q, Zhang S, Dai X, Wang F, Ma Y (2022) MIR390 Is Involved in Regulating Anthracnose Resistance in Apple. *Plants* 11: 3299
- Sieber P, Wellmer F, Gheyselinck J, Riechmann JL, Meyerowitz EM (2007) Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the MIR164 family in developmental robustness. *Development* 134: 1051–1060

- Siemens J, Keller I, Sarx J, Kunz S, Schuller A, Nagel W, Schmülling T, Parniske M, Ludwig-Müller J (2006) Transcriptome Analysis of *Arabidopsis* Clubroots Indicate a Key Role for Cytokinins in Disease Development. *Mol Plant-Microbe Interactions*® 19: 480–494
- Some A, Manzanares MJ, Laurens F, Baron F, Thomas G, Rouxel F (1996) Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates . *Plant Pathol* 45: 432–439
- Truman W, Sreekanta S, Lu Y, Bethke G, Tsuda K, Katagiri F, Glazebrook J (2013) The CAL-MODULIN-BINDING PROTEIN60 Family Includes Both Negative and Positive Regulators of Plant Immunity1[W][OPEN]. *Plant Physiol* 163: 1741–1751
- Verhoeven A, Kloth KJ, Kupczok A, Oymans GH, Damen J, Rijnsburger K, Jiang Z, Deelen C, Sasidharan R, van Zanten M, et al (2023) *Arabidopsis* latent virus 1, a comovirus widely spread in *Arabidopsis thaliana* collections. *New Phytol* 237: 1146–1153
- Verma SS, Rahman MH, Deyholos MK, Basu U, Kav NNV (2014) Differential Expression of miRNAs in *Brassica napus* Root following Infection with *Plasmodiophora brassicae*. *PLoS ONE* 9: e86648
- Wei X, Liao R, Zhang X, Zhao Y, Xie Z, Yang S, Su H, Wang Z, Zhang L, Tian B, et al (2023) Integrative Transcriptome, miRNAs, Degradome, and Phytohormone Analysis of *Brassica rapa* L. in Response to *Plasmodiophora brassicae*. *Int J Mol Sci* 24: 2414
- Wei X, Xu W, Yuan Y, Yao Q, Zhao Y, Wang Z, Jiang W, Zhang X (2016) Genome-wide Investigation of microRNAs and Their Targets in *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* Root with *Plasmodiophora brassicae* Infection. *Hortic Plant J* 2: 209–216
- Wei X, Zhang Y, Zhao Y, Xie Z, Hossain MR, Yang S, Shi G, Lv Y, Wang Z, Tian B, et al (2021) Root Transcriptome and Metabolome Profiling Reveal Key Phytohormone-Related Genes and Pathways Involved Clubroot Resistance in *Brassica rapa* L. *Front Plant Sci* 12: 759623
- Xu M, Hu T, Zhao J, Park M-Y, Earley KW, Wu G, Yang L, Poethig RS (2016) Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genet* 12: e1006263
- Yang X, Zhang L, Yang Y, Schmid M, Wang Y (2021) miRNA Mediated Regulation and Interaction between Plants and Pathogens. *Int J Mol Sci* 22: 2913
- Yu Y, Jia T, Chen X (2017) The ‘how’ and ‘where’ of plant micro RNA s. *New Phytol* 216: 1002–1017
- Zhang W, Gao S, Zhou X, Chellappan P, Chen Z, Zhou X, Zhang X, Fromuth N, Coutino G, Coffey M, et al (2011) Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Mol Biol* 75: 93–105
- Zhang X, Liu Y, Fang Z, Li Z, Yang L, Zhuang M, Zhang Y, Lv H (2016) Comparative Transcriptome Analysis between Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and Wild Cabbage (*Brassica macrocarpa* Guss.) in Response to *Plasmodiophora brassicae* during Different Infection Stages. *Front. Plant Sci.* 7:

- Zhao W, Li Z, Fan J, Hu C, Yang R, Qi X, Chen H, Zhao F, Wang S (2015) Identification of jasmonic acid-associated microRNAs and characterization of the regulatory roles of the miR319/TCP4 module under root-knot nematode stress in tomato. *J Exp Bot* 66: 4653–4667
- Zhao Y, Bi K, Gao Z, Chen T, Liu H, Xie J, Cheng J, Fu Y, Jiang D (2017) Transcriptome Analysis of *Arabidopsis thaliana* in Response to *Plasmodiophora brassicae* during Early Infection. *Front Microbiol* 8: 673
- Zheng Y (2019) Chapter 6 - Identification of miRNA and siRNA Targets in Plants. *In* Y Zheng, ed, *Comput. Non-Coding RNA Biol.* Academic Press, pp 177–205

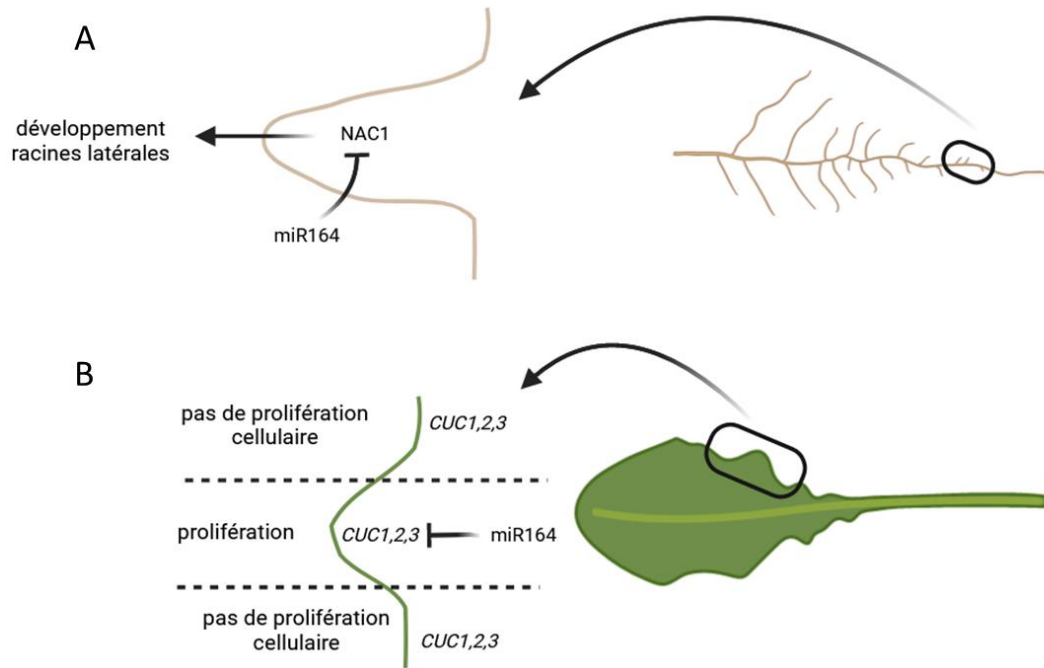


Figure IV. 9. : Contrôle de la prolifération cellulaire par miR164 dans différents tissus. A) au niveau du système racinaire, miR164, en réprimant l'expression de sa cible *NAC1*, est impliqué dans la formation des racines latérales (Guo *et al.*, 2005). B) miR164 réprime l'expression de ses cibles *CUC1*, *2* et *3* qui elles répriment la prolifération cellulaire aboutissant à la formation de dentelures au niveau des feuilles (Baker *et al.*, 2005; Nikovics *et al.*, 2006).

3. Validation fonctionnelle des miARN

Les analyses bio-informatiques réalisées ont conduit à l'identification de 26 miARN différentiellement exprimés lors de l'infection par l'isolat eH. Vingt et un miARN ont été identifiés chez l'écotype Col-0 et 5 miARN chez l'écotype Bur-0, miR319b étant induit par l'infection chez les deux écotypes. Afin de valider le rôle de certains de ces miARN dans la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie, nous avons étudié le comportement de mutants knock-out des gènes pré-curseurs de ces miARN face à l'infection par la hernie. Trois tests pathologiques ont successivement été mis en place mais n'ont pas abouti à des résultats exploitables pour l'article du fait d'un défaut d'infection du témoin Col-0 sensible. Le faible développement de symptômes de hernie observé sur Col-0 serait lié à une modification du substrat commercial utilisé. Des expérimentations sont en cours pour identifier et résoudre ce problème. Dans les paragraphes suivants je présente le design expérimental mis en œuvre pour valider le rôle de ces miARN chez *Arabidopsis* ainsi que les résultats préliminaires obtenus lors d'un dernier essai. Cette expérimentation sera répétée afin d'inclure les résultats dans la version finale de l'article.

3.1. Validation fonctionnelle du rôle des miARN dans la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie

Le choix des mutants des miARN à étudier a été guidé par : i) leur implication putative dans la régulation des voies et processus physiologiques intervenant dans l'interaction plante *A. thaliana*-*P. brassicae* et ii) leur disponibilité. Les mutants KO retenus ont été générés dans les fonds génétiques Col-0 ou Ler-0, génotypes sensibles à l'isolat eH de *P. brassicae* (Alix et al., 2007). Les miARN retenus ainsi que leurs caractéristiques et les résultats escomptés lors de l'évaluation du comportement de chacun de ces mutants knock-out vis-à-vis de l'isolat eH sont les suivants :

- miR164a, miR164b et miR164c : ces trois miARN appartiennent à la famille des *MIR164* et sont réprimés chez l'écotype sensible Col-0 à 14 jours après l'inoculation (JAI). Dans les racines d'*A. thaliana* et d'*Arachi hypogaea*, miR164 réprime l'expression de gènes cibles, les *NAC* (*NAM : NO APICAL MERISTEM* et *CUC : CUP-SHAPED COTYLEDON*) et réprime ainsi la production de racines latérales (Guo et al., 2005; Unver et al., 2021). (**Fig. IV.9.A.**).

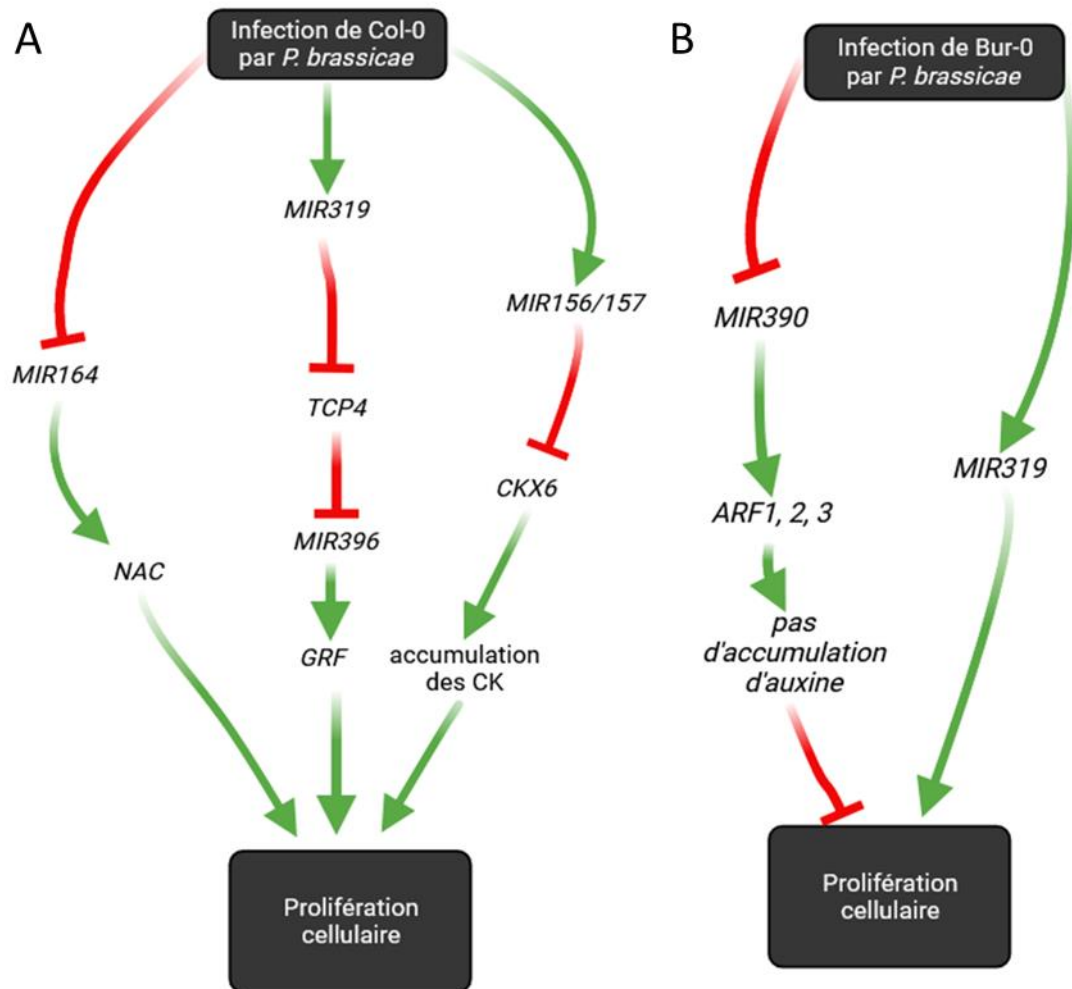


Figure IV.10. : Hypothèses sur le rôle des miARN dans la prolifération cellulaire lors de l'infection de Col-0 et Bur-0 par *P. brassicae*. (A) Chez Col-0, l'expression de miR319 conduit à la répression de facteurs *TCP* (*TEOSINTE BRANCHED1*, *CYCLOIDEA*, et *PCF*) entraînant une répression de miR396, l'induction des *GRF* (GROWTH REGULATING FACTOR) et conduirait à la prolifération cellulaire et au développement des galles. Au niveau de miR164, la répression de miR164 devrait conduire à la surexpression des facteurs de transcription *NAC* (*NAM : NO APICAL MERISTEM* et *CUC : CUP-SHAPED COTYLEDON*) et donc à la promotion de la prolifération cellulaire lors de l'infection par l'isolat eH. (B) Chez Bur-0, la répression de miR390 entraîne la surexpression des *ARF* (*AUXIN RESPONSIVE FACTOR*) ce qui perturbe l'accumulation d'auxine et réprime la prolifération cellulaire. Les flèches en vert présentent un effet positif sur l'expression/la mise en place de mécanismes et tiret en rouge un effet négatif sur l'expression/la mise en place d'un mécanisme.

Cependant, leur rôle dans le contrôle du processus de serration induit par l'expression de ses gènes cibles *CUC1*, *CUC2* et *CUC3*, qui répriment la prolifération cellulaire au niveau des feuilles et favorisent la production de dentelure, suggère également un rôle positif de miR164 dans la prolifération cellulaire (Baker *et al.*, 2005; Nikovics *et al.*, 2006) (**Fig. IV.9.B.**). Ce miARN a déjà été identifié comme modulant la réponse d'*Oryza sativa* au champignon *Magnaporthe oryzae* (Wang *et al.*, 2018b), la réponse du coton à *Verticillium dahlia* (Hu *et al.*, 2020) ainsi que dans le contrôle de la réponse d'hypersensibilité en réprimant *NAC4* (Lee *et al.*, 2017). La prédiction du comportement des mutants KO pour miR164 vis-à-vis de *P. brassicae* est complexe puisque miR164 semble avoir un rôle différent dans les racines et dans les feuilles. Dans nos données, les membres de la famille *MIR164* sont réprimés et *CUC1* – dont l'expression est d'ordinaire restreinte à la tige ou au bourgeons (Mallory *et al.*, 2004)– induit, ce qui pourrait se révéler cohérent avec le rôle de miR164 dans les racines (Guo *et al.*, 2005) (**Fig. IV.10.**). La répression de l'expression de miR164 dans les mutants KO pourrait ainsi conduire à une induction des gènes NAC et à la prolifération cellulaire associée au développement des racines latérales et à une plus grande sensibilité de ces mutants à la hernie par rapport au génotype sauvage non muté. Le mutant *mir164a* n'exprime pas miR164a (Nikovics *et al.*, 2006) et le mutant *mir164b* présente une mutation au niveau de la région formant la structure en épingle à cheveux, diminuant ainsi son accumulation dans les tissus (Mallory *et al.*, 2004).

- miR319a, miR319b, miR319c appartiennent à la famille *MIR159*. miR319b est induit à la fois chez Col-0 et Bur-0 et miR319a et miR319c sont uniquement induits chez Col-0. Ces miARN inhibent l'accumulation d'acide jasmonique (Schommer *et al.*, 2008), participent à la formation des dentelures des feuilles d'*Arabidopsis* (Koyama *et al.*, 2010, 2017), régulent positivement la prolifération cellulaire (Pulido & Laufs, 2010; Schommer *et al.*, 2014) et favorisent l'infection d'*O. sativa* par *M. oryzae* (Zhang *et al.*, 2018a) ou de *S. lycopersicum* par *M. incognita* (Zhao *et al.*, 2015). Les mutants altérés dans l'expression et l'accumulation de miR319a,b présenteraient une moindre sensibilité à l'isolat eH que l'écotype non muté Col-0. En effet, l'absence de production de miR319 lèverait la répression du facteur *TCP4* et de miR396, menant à la diminution des facteurs de croissance (*GROWTH REGULATING FACTOR, GRF*) et la répression de la prolifération cellulaire et de la formation des galles (Rodriguez *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2015).

Dans nos données, miR319 est induit chez Col-0 et Bur-0, *TCP4* et miR396 sont réprimés chez Col-0 uniquement (**Fig. IV.10.B.**). Le mutant *mir319a* mime une perte de fonction de miR319a puisqu'une mutation au niveau de sa séquence l'empêche de reconnaître ces cibles, le mutant *mir319b* ne présente pas d'expression de miR319b (Koyama *et al.*, 2017).

- comme explicité ci-dessus, *miR396b*, réprimé chez Col-0, est impliqué dans le contrôle négatif de la division cellulaire *via* notamment la répression des *GROWTH REGULATING FACTOR (GRF)* (Rodriguez *et al.*, 2010) ainsi que dans la sensibilité d'*A. thaliana* au champignon *Fusarium oxysporum* (Soto-Suárez *et al.*, 2017). L'absence d'expression de miR396 conduirait ainsi à une sur-expression des GRF et une augmentation de la prolifération cellulaire, favorisant les symptômes d'hyperplasie induits par l'infection. Le mutant altéré dans la production de miR396b serait donc plus sensible à l'isolat eH que l'écotype non muté Col-0.
- miR390a, réprimé chez Bur-0, est impliqué dans l'accumulation d'auxine et dans la prolifération cellulaire (Aida *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2010; Promchuea *et al.*, 2017). Les données de la littérature semble montrer que l'expression de miR390 conduit à la répression des facteurs répondant à l'auxine (*AUXIN RESPONSIVE FACTOR : ARF2,3 et 4*), à l'augmentation de la production d'auxine et à la prolifération cellulaire (Aida *et al.*, 2004; Marin *et al.*, 2010; Promchuea *et al.*, 2017). L'absence d'expression et d'accumulation de miR390 entrainerait potentiellement une moindre sensibilité des mutants KO de ce miARN à l'isolat eH par rapport à l'écotype Col-0 non muté. L'altération de miR390 conduirait en effet à une expression des ARF, limitant l'accumulation d'auxine, la prolifération cellulaire et la formation des galles. Dans nos données, miR390 est réprimé avec l'infection dans l'écotype partiellement résistant Bur-0, expliquant potentiellement la taille réduite des galles présentes chez cet écotype.

Les mutants KO pour *miR396b* et *miR390a*, n'étant pas actuellement homozygotes au niveau du transgène, n'ont pas été inclus dans ces tests pathologiques.

La réponse de ces mutants à l'isolat eH de *P. brassicae* a été évaluée dans un dispositif expérimental comportant 3 répétitions biologiques, avec douze plantes par génotype et par répétition biologique. Les mutants ont été inoculés avec 1mL d'une solution de l'isolat eH à 1×10^7 spores/mL dix jours après semis. Afin d'évaluer l'impact de la mutation sur le phénotype (morphologique et moléculaire) de la plante sans infection, 6 plantes par génotype et par répétition biologique ont été semées et cultivées sans inoculation par *P. brassicae*.

Tableau IV.5. : Résultats des deux répétitions de la gamme d'hôtes différentiels placées dans les mêmes conditions que les mutants KO altérés dans l'expression de miARN. Le comportement des génotypes de la gamme d'hôtes vis-à-vis de l'isolat eH sont évalués selon leurs symptômes racinaires en suivant les classes détaillées par Manzanares-Dauleux et (al., 2000). Le nombre de plantes dans chaque classe permet ainsi de calculer l'indice pathologique (DI) décrit précédemment. Un génotype présentant un indice pathologique supérieur à 60 est considéré comme sensible. Un génotype présentant un indice pathologique inférieur à 25 est considéré comme résistant à la hernie. Un génotype présentant un indice pathologique compris entre 25 et 60 présente une résistance partielle.

Gamme d'Hôtes Différentiels N°1							
	0	1	2	2+	3	Nombre de Plantes	DI
ECD5				5	1	6	79
ECD6		1	1	2	2	6	71
ECD10			2	2	2	6	75
Brutor				1	2	3	92
C10	4					4	0
CB151	3					3	0
Mendel	6					6	0
C7	3					3	0

Gamme d'Hôtes Différentiels N°1							
	0	1	2	2+	3	Nombre de Plantes	DI
ECD5				4		4	75
ECD6		2	1	2	1	6	58
ECD10				2		2	75
Brutor			1	1	2	4	81
C10	4		1			5	10
CB151	2					2	0
Mendel	6					6	0
C7	3					3	0

Toutes les plantes ont été phénotypées 21 jours après l'infection (ou 28 jours après semis pour les plantes non inoculées) et des échantillons de racines et de feuilles des plantes infectées et non infectées ont été prélevés et conservés dans l'azote liquide pour vérifier l'absence d'expression des miARN dans les mutants, étudier l'expression des miARN dans les écotypes sauvages et l'expression des gènes potentiels cibles de ces miARN par RT-qPCR dans les génotypes sauvages et mutés.

3.2. Résultats obtenus

Deux répétitions de la gamme d'hôtes différentiels ont été évaluées lors de chacune des trois tests pathologiques. Les résultats de la gamme d'hôtes différentiels correspondaient aux résultats attendus (**Tableau IV.5.**) : le témoin sensible ECD5 présente bien un indice pathologique supérieur à 60, les génotypes ECD6, ECD10 et Brutor sont sensibles comme attendu ($DI > 60$) et C10, CB151, Mendel et C7 sont résistants ($DI < 25$) validant ainsi le pathotype (P1) de l'isolat eH utilisé. Si la gamme d'hôtes différentiels présente bien les symptômes attendus, le génotype Col-0, sensible à l'isolat eH présente un indice pathologique moyen inférieur à 55, contre un indice pathologique attendu supérieur à 80 (**Figure IV.11.**) (Alix *et al.*, 2007; Jubault *et al.*, 2008b) avec une grande variabilité de résultats observée entre les tests. La faible sensibilité de Col-0 à l'isolat eH dans ce test empêche toute interprétation sur le comportement des mutants vis-à-vis de l'isolat eH. Aucune différence significative n'a été observée entre les génotypes sauvages et mutés.

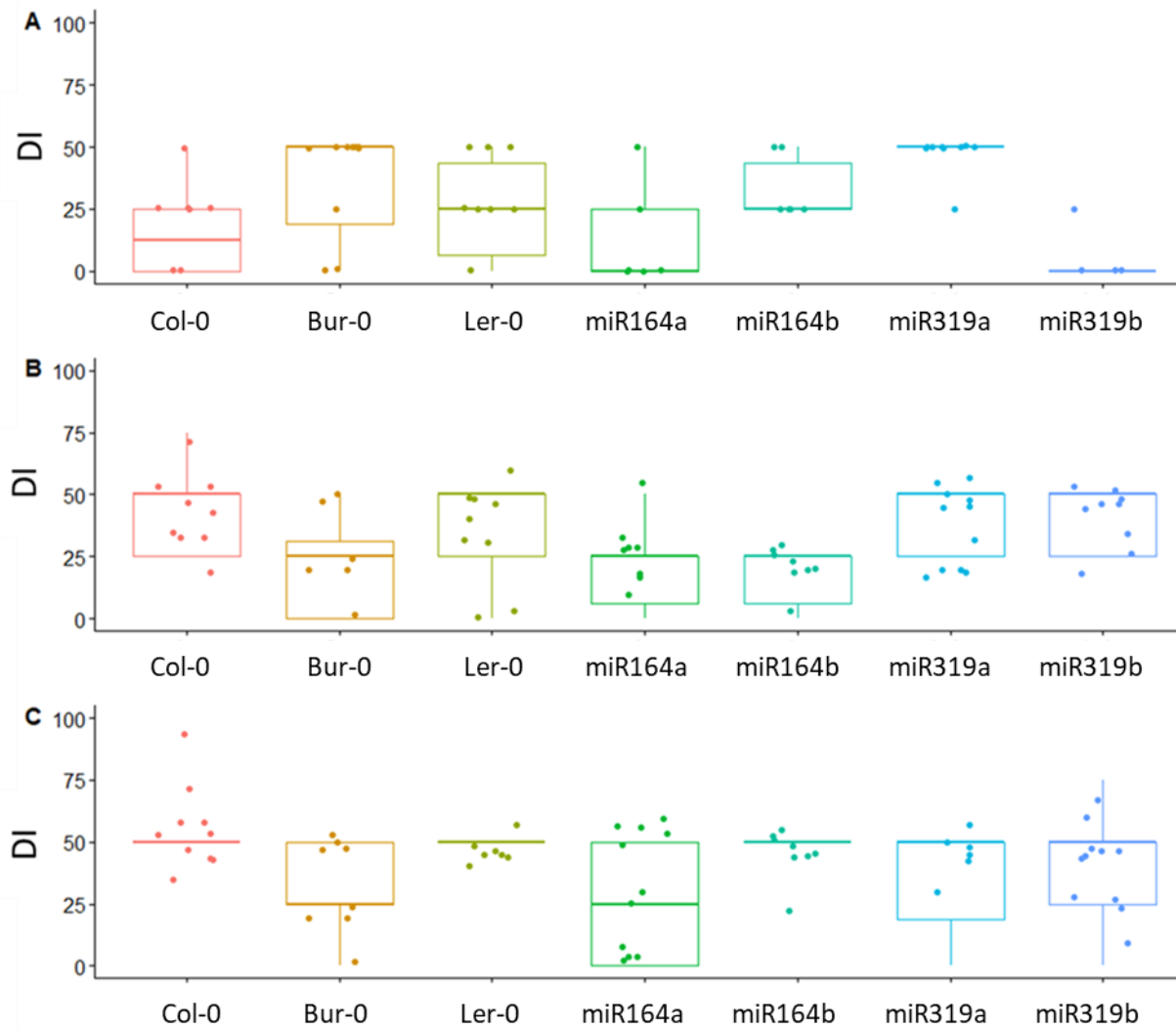


Figure IV.11. : Comportement des mutants KO des miARN vis-à-vis de l'isolat eH de *P. brassicae*. En abscisses, sont représentés les génotypes évalués : les écotypes Col-0, Bur-0 et Ler-0 et les mutants KO miR164a, miR164b, miR319a et miR319b. En ordonnées, est représenté l'indice pathologique (DI) évalué pour chaque génotype dans les trois blocs (A, B et C). Les points représentent les données par individu, les lignes centrales indiquent les médianes ; les limites des cases indiquent les 25e et 75e percentiles déterminés par le logiciel R. Aucun effet significatif n'a été observé. Bloc A : n=12 pour Bur-0 ; n= 10 pour Col-0 et Ler-0 ; n=9 pour miR164a et n= 6 pour miR319b et miR164b. Bloc B : n=11 pour miR319a ; n=10 pour miR164a, miR319a et miR164b ; n=9 pour miR319b, Ler-0 et miR319a et n=8 pour Bur-0. Bloc C : n= 12 pour miR164a ; n=11 pour miR319 et n= 10 pour Col-0 ; n=9 pour Bur-0 ; n=8 pour miR319a et miR164b et n=7 pour Ler-0.

4. Conclusion partielle et perspectives

L'étude du transcriptome et du miR-ome chez *A. thaliana* en réponse à la hernie ont donc permis de :

- Valider les voies de signalisation et les processus physiologiques induits lors l'infection par la hernie précédemment identifiés chez les génotypes sensible et partiellement résistant, Col-0 et Bur-0 :
 - La production d'énergie est induite chez les plantes infectées avec l'augmentation de l'expression des gènes potentiellement impliqués dans le cycle de Calvin, dans la fermentation, dans la dégradation du sucrose et de l'amidon chez Col-0 et à travers la respiration chloroplastique chez Bur-0
 - Une surexpression des gènes potentiellement impliqués dans la dégradation des parois cellulaires et l'induction d'expansines, chez Col-0 et dans une moindre mesure chez Bur-0.
 - La reconnaissance de la présence de *P. brassicae* via l'induction de gènes codant pour des récepteurs de type NLR/RLK, chez Bur-0 et dans une moindre mesure chez Col-0 et l'induction des voies de défense associées à la production d'acide salicylique (SA) chez Bur-0 et d'acide jasmonique (JA) chez Col-0.
 - Une augmentation de l'expression des gènes potentiellement impliqués dans la dégradation des sphingolipides et des gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de phospholipides et d'acides gras chez Col-0.
 - Une surexpression des gènes impliqués dans la biosynthèse des anthocyanes chez Col-0.
- Mettre en évidence vingt-six miARN appartenant à quatorze familles de miARN dont l'expression varie suite à l'infection dans Col-0 et/ou Bur-0 :
 - Six familles avaient déjà été identifiées dans la réponse des *Brassicacées* à *P. brassicae* : *MIR156*, *MIR164*, *MIR165/166*, *MIR169*, *MIR159* et *MIR396*.

Chapitre IV – Implication des miARN dans la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie

- Trois familles n'avaient pas été identifiées dans la réponse des *Brassica* à *P. brassicae* (*MIR390*, *MIR831* et *MIR5658*) mais ont déjà été identifiées dans la réponse d'autres plantes (*G. max*, *B. napus*, *S. lycopersicum*) à d'autres agents pathogènes (*M. incognita*, *P. syringae*, *Ralstonia solanacearum*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*) : *MIR390*, *MIR5658* et *MIR863*.
- Trois familles n'avaient pas été jusque-là identifiées comme impliquées dans la réponse des plantes aux agents pathogènes mais avaient déjà été décrites dans la réponse des plantes au froid, à la sécheresse ou à un excès d'eau : *MIR2936*, *MIR5642* et *MIR869*.
- Deux familles miARN n'ont jamais été décrites ni dans la réponse des plantes aux agents pathogènes ni aux stress abiotiques : *MIR8176* et *MIR866*.
- De prédire les gènes cibles de ces miARN et d'identifier les voies physiologiques dans lesquelles ces couples miARN/gènes cibles sont potentiellement impliqués :
 - La production d'énergie pour *MIR165/MIR166*
 - La perception d'éléments d'origine pathogénique pour *MIR169*
 - La création et l'organisation des parois végétales pour *MIR2936*
 - Des récepteurs de type TIR-NLR pour *MIR396*

Il est toutefois nécessaire de valider le rôle de ces miARN dans la réponse d'*A. thaliana* à la hernie des crucifères en étudiant notamment le comportement des mutants knock-out vis-à-vis de la hernie. D'autre part, plusieurs autres approches pourraient nous permettre de valider les cibles des miARN identifiés précédemment et d'étudier leur implication dans la réponse à la hernie des crucifères :

- Etudier l'expression par RT-qPCR de gènes cibles prédits dans les mutants knock-out altérés dans l'expression et/ou l'accumulation des miARN et les écotypes en conditions non inoculées.
- Réaliser un séquençage spécifique des ARN messagers clivés, ce que l'on appelle le dégradome, et comparer ainsi les ARN messagers dégradés entre les écotypes sauvages et les mutants KO en conditions non inoculées.
- Réaliser une cinétique d'expression des miARN et de leurs gènes cibles chez des écotypes présentant différents niveaux de résistance afin de mieux comprendre le rôle des miARN et de leurs cibles dans la mise en place des réponses des plantes à la hernie

- Evaluer la localisation *in vivo* des miARN et de leurs cibles *via* l'utilisation des lignées rapportrices. Nous disposons actuellement de plusieurs lignées permettant de suivre l'expression de miR164a et miR164b (Cortizo et Laufs, données non publiées).

Approfondir l'étude des miARN dans la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie permettrait ainsi une meilleure compréhension de leur rôle dans les mécanismes de réponse des plantes et conduire potentiellement à l'identification de nouveaux mécanismes de résistance. Il serait pertinent de réaliser des mutants knock-out *via* la méthode CRISPR-Cas9, déjà utilisée au sein du laboratoire, pour des miARN très peu étudiés dans la littérature mais identifiés dans notre étude comme potentiellement impliqués dans des mécanismes de sensibilité vis-à-vis de la hernie (MIR2936, MIR5642 et MIR869, *MIR8176* et *MIR866*).

Chapitre V : Discussion générale et perspectives

CHAPITRE V : Discussion générale et perspectives

L'infection d'*A. thaliana* par le protiste parasite obligatoire *P. brassicae* conduit à la formation de galles au niveau du système racinaire et induit des bouleversements cellulaires et physiologiques importants (Aist & Williams, 1971; Kobelt *et al.*, 2000; Kageyama & Asano, 2009). L'architecture génétique de la réponse d'*A. thaliana* à la hernie des Crucifères implique des facteurs génétiques (Fuchs, 1996; Jubault *et al.*, 2013) et épigénétiques (Liégard *et al.*, 2019a,b) dont l'effet peut dépendre des conditions expérimentales (Gravot *et al.*, 2016a; Laperche *et al.*, 2017; Aigu *et al.*, 2018; Liégard *et al.*, 2019a). Au cours de ma thèse, je me suis intéressée à l'implication de deux mécanismes épigénétiques dans la réponse d'*A. thaliana* à *P. brassicae* : 1) la méthylation de l'ADN, dans le cadre d'épimutations transmissibles sur plusieurs générations contrôlant la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie des crucifères sous différentes conditions abiotiques et 2) l'implication des miARN dans cette réponse et notamment dans le contrôle des processus physiologiques modulés lors de l'infection.

Le premier objectif de ma thèse était donc d'évaluer l'impact des conditions abiotiques sur l'architecture du contrôle épigénétique (détection, localisation et effet des QTL^{epi}) de la résistance à la hernie. Pour répondre à cet objectif, la réponse de la population epiRIL, présentant une séquence génétique quasiment identique (74 variants génétiques détectés) mais des profils de méthylation différents dérivés des parents Col-0 et *ddm1-2*, inoculée ou non inoculée par *P. brassicae* a été phénotypée dans différentes conditions abiotiques : en conditions de culture optimales pour l'interaction *Arabidopsis* - *P. brassicae* et sous différentes contraintes abiotiques ponctuelles (appliquées 7 jours après l'inoculation et ce pendant 7 jours) : une hausse de 5°C de la température jour et nuit, une sécheresse modérée, un engorgement et la combinaison des contraintes thermique et hydrique.

Nous avons ainsi montré que :

- Les plantes de la population epiRIL sont plus grandes et démontrent une moindre sensibilité à la hernie en condition d'élévation de la température, sont plus petites et présentent une moindre sensibilité à l'infection par *P. brassicae* en condition de déficit hydrique et plus petites et présentant des plus grands symptômes en condition d'engorgement.

- Lors de l'application combinée d'une élévation de température et d'un déficit hydrique, les plantes sont plus petites et présentent des symptômes plus fortement réduits. Lors de la combinaison d'une élévation de la température et d'une saturation hydrique, les plantes sont plus petites dans les conditions standard et les symptômes plus faibles que lors de la condition d'engorgement.
- Le contrôle de la réponse à la hernie est le plus souvent polyépigénétique avec des facteurs épigénétiques contrôlant la réponse à la hernie détectés quelles que soient les conditions abiotiques.
- L'architecture du contrôle épigénétique de cette réponse est modulée par les conditions abiotiques, certains facteurs épigénétiques étant spécifiques d'une contrainte abiotique en particulier, d'autres étant stables entre plusieurs conditions de culture.
- La population epiRIL présente une plasticité phénotypique dépendant des conditions abiotiques et partiellement contrôlées par les facteurs épigénétiques.

Le deuxième objectif de ma thèse était de déterminer si des miARN étaient impliqués dans la réponse de sensibilité et de résistance partielle d'*A. thaliana* à la hernie. Pour y répondre, les ARN messagers et les microARN ont été extraits à partir de racines infectées ou non infectées d'un écotype sensible (Col-0) et d'un écotype partiellement résistant (Bur-0) à deux temps cinétiques après inoculation. Après séquençage, nous avons identifié les gènes et miARN différenciellement exprimés durant l'infection chez les deux écotypes. Nous avons ainsi :

- Confirmé la faible réponse transcriptomique des écotypes d'*Arabidopsis* à l'infection par la hernie lors de la phase primaire d'infection (temps cinétique précoce).
- Démonstré et confirmé que les réponses transcriptomiques de Col-0 et Bur-0 à la hernie diffèrent, soit au niveau des voies impliquées, soit au niveau de l'intensité de leur expression.
- Identifié des miARN différenciellement exprimés lors de l'infection par *P. brassicae* et pour la plupart différents entre l'écotype sensible (Col-0) et l'écotype partiellement résistant (Bur-0).
- Confirmé l'implication des miARN précédemment identifiés dans l'interaction *Brassica-P. brassicae*, dans le contrôle de processus physiologiques connus comme impliqués dans la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie (par exemple la remobilisation des sucres ou la dégradation des parois cellulaires).
- Identifié des miARN non décrits auparavant dans la réponse des plantes aux agents pathogènes.

Dans ce dernier chapitre, nous allons discuter dans un premier temps des limites des expérimentations réalisées et notamment du choix des conditions expérimentales. Nous aborderons ensuite les perspectives d'étude de ces épimutations, notamment comment caractériser leur comportement dans des conditions se rapprochant des conditions climatiques réelles, et comment caractériser plus finement leurs rôles dans la réponse d'*A. thaliana* à la hernie ; c'est-à-dire identifier les gènes causaux, les voies de signalisation que ces QTL^{epi} contrôlent. Nous discuterons ensuite de la validation des miARN et de leur rôle dans l'interaction *A. thaliana*-*P. brassicae*. Nous discuterons enfin de la nécessité d'intégrer dans nos travaux d'autres mécanismes épigénétiques étroitement liés à la méthylation de l'ADN et/ ou aux miRNA et qui pourraient également être impliqués dans la réponse d'*A. thaliana* à la hernie. Nous terminerons cette discussion en abordant la transférabilité de nos résultats aux cultures d'intérêt agronomique.

1. De la complexité d'étudier l'impact des conditions abiotiques sur les interactions hôtes-pathogènes

Lors de cette étude, nous avons fait le choix de nous concentrer sur trois contraintes abiotiques qui peuvent impacter l'issue de l'interaction *A. thaliana*-*P. brassicae* : une augmentation de la température, un déficit et une saturation hydriques. Ces trois contraintes abiotiques peuvent impacter à la fois l'hôte, l'agent pathogène et leur interaction. L'élévation de la température peut ainsi entraîner une réponse de thermomorphogénèse chez *A. thaliana* tandis que les contraintes hydriques peuvent altérer le développement de la plante. Au niveau du pathogène, *P. brassicae* est un parasite obligatoire des Brassicacées dont la température optimale de développement est de 25 °C et dont le cycle de vie est composé de 3 phases : la phase des spores de repos dans le sol, la phase primaire d'infection et la phase secondaire d'infection dont les durées varient en fonction des hôtes et des températures (Sharma *et al.*, 2011a,b). Une forte humidité du sol est essentielle lors de la phase primaire d'infection pour une bonne germination des spores de repos, le déplacement des zoospores primaires dans le substrat et l'infection des poils absorbants racinaires (Aist & Williams, 1971; Hamilton & Crête, 1978; Takahashi, 1994). Une humidité modérée du substrat serait également nécessaire lors de l'infection des cellules du cortex durant la phase secondaire puisque les zoospores secondaires pourraient être relarguées dans le sol avant de pouvoir infecter les cellules du cortex (Kageyama & Asano, 2009).

Les modalités d'application des trois contraintes abiotiques ont été choisies à partir des données de la littérature et des connaissances et résultats disponibles au laboratoire sur l'interaction *A. thaliana* - *P. brassicae*. Pour la contrainte d'élévation de température, nous avons choisi une augmentation de 5°C des températures de jour et de nuit pour plusieurs raisons : 1) dans le travail de thèse de Benjamin Liégard réalisé précédemment dans le laboratoire d'accueil, des variations de température de l'ordre de 3°C, liées au dysfonctionnement de la chambre de culture, ont eu un effet sur la détection de 5 QTL^{epi} (Liégard *et al.*, 2019a) ; 2) les scénarios les plus pessimistes concernant le réchauffement climatique estiment une augmentation moyenne de la température du globe de l'ordre de 4°C (IPCC, 2022) et 3) nous souhaitons rester dans la gamme de température ambiante chaude d'*A. thaliana* qui se situe entre 22°C-28°C (Liu *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2018; Gil & Park, 2019), l'optimum de température pour *Arabidopsis* étant de 21-22°C selon Li *et al.* (2018). Les tests pathologiques ont été réalisés en chambre de culture, nous permettant ainsi d'appliquer et de suivre facilement cette contrainte abiotique (à savoir 27°C durant la journée et 24°C durant les 8 heures de nuit de 7 à 14 jours après inoculation) avec des écarts à la consigne maxima observés inférieurs à 1°C. Dans la littérature, les modalités et la durée d'application d'un déficit hydrique sont très différentes entre les études. Les plantes peuvent ainsi être privées d'arrosage pendant quelques heures (Niu *et al.*, 2013), 12 jours (Bhas-kara *et al.*, 2015) ou pendant toute la durée de l'étude (Rasheed *et al.*, 2016) selon les espèces et les objectifs. L'intensité du déficit hydrique n'est pas toujours évaluée et lorsqu'elle est évaluée, la méthodologie utilisée pour la mesurer diffère entre les études. Par exemple, visant à étudier l'effet combiné d'une sécheresse et de l'infection d'*A. thaliana* à *P. syringae*, Gupta *et al.* (2016) ont évalué l'humidité de leur sol en pesant chacun des pots de leur expérimentation à différents moments clefs de leur étude. Cette approche permet un suivi précis de l'humidité relative du substrat mais requiert une importante logistique qui aurait été difficile à mettre en œuvre au sein de nos structures expérimentales. Ces auteurs ont estimé la capacité au champ (FC) de leur substrat en utilisant la formule suivante : $FC = [(WW-DW)/DW] \times 100$ à partir du poids de leur substrat humide (WW) et du poids de leur substrat sec (DW). Ces auteurs ont considéré avoir appliqué un stress hydrique modéré lorsque l'humidité relative de leur substrat atteignait 60 à 80% et un stress sévère lorsque l'humidité relative de leur substrat se situait entre 20 et 40%. Marchin *et al.* (2020) se basent eux sur la mesure du « volumetric water content » (VWC), évaluée directement par l'utilisation de sonde afin de déterminer le statut hydrique de leur substrat et considèrent une valeur de 10% de VWC comme un stress hydrique modéré en précisant que cette condition ne conduit pas à la morte des plantes, la condition d'irrigation standard correspondant à un VWC de 35% (Marchin *et al.*, 2020).

En nous basant sur les données de la littérature et sur la connaissance des conditions optimales de culture pour le pathosystème *Arabidopsis-P. brassicae* acquise dans le laboratoire (Gravot *et al.*, 2016a) nous avons établi des conditions d'irrigation cohérentes avec les valeurs proposées par Marchin *et al.* (2020). Le niveau de déficit hydrique appliqué (mesuré à l'aide de sondes sans fil) a ainsi conduit à un VWC de 19.99% +/- 1.1 au début du stress (7 jours après inoculation) jusqu'à 10.39% +/- 0.29 à la fin de la période du stress (14 jours après inoculation). La reprise de l'arrosage a conduit à une VWC de 35.34 % +/- 0.7. La contrainte engorgement était plus facile à mettre en place. Nous avons ainsi placé les racines d'*A. thaliana* sous l'eau pendant sept jours, sans inonder les parties aériennes, comme décrit dans d'autres études, notamment Rauf *et al.* (2013).

Les caractéristiques du cycle de vie de l'agent pathogène et de la plante ont également guidé les choix concernant la durée et la temporalité de l'application des contraintes. Ainsi les contraintes abiotiques, seules ou en combinaison, ont été appliquées dès sept jours après l'inoculation (et ce pendant sept jours), ce qui correspond à la fin de l'infection primaire et au début de l'infection secondaire. Lors de la phase primaire de l'infection, la plante ne semble pas réagir à l'infection : aucun symptôme n'est visible sur les racines (Kageyama & Asano, 2009) et peu de gènes sont différentiellement exprimés entre les plantes infectées et non infectées comme observé dans notre étude et dans la littérature (Siemens *et al.*, 2006; Jubault *et al.*, 2013; Irani *et al.*, 2018;). Lors de la phase secondaire d'infection, les zoospores secondaires infectent les cellules du cortex entraînant la formation de galles ainsi qu'une reprogrammation cellulaire et physiologique (Siemens *et al.*, 2006; Jubault *et al.*, 2013; Irani *et al.*, 2018). L'infection des cellules du cortex par les zoospores secondaires suppose qu'elles se déplacent dans la matrice du sol, ce qui rend cette phase dépendante des caractéristiques du sol, dont l'humidité. L'hypothèse que nous faisons est qu'un déficit hydrique entraînerait une moins bonne infection des cellules du cortex, à l'inverse d'une saturation hydrique. Dans notre étude, par rapport à standard et sans l'inoculation, les deux contraintes hydriques altèrent le développement des plantes, de manière plus intense lors d'un déficit que d'un excès hydrique. L'impact sur le développement des deux contraintes hydriques est similaire avec inoculation. Par ailleurs, l'infection semble avoir un effet positif sur la taille des plantes lors d'un déficit hydrique ($dLf < 0$) mais n'impacte pas la taille des plantes lors d'un engorgement ($dLf = 0$). Au niveau des symptômes, le déficit hydrique conduit à une réduction de la taille des galles, à une réduction de l'indice pathologique et à une réduction de l'indice GALA (taille des galles standardisée par la taille des feuilles).

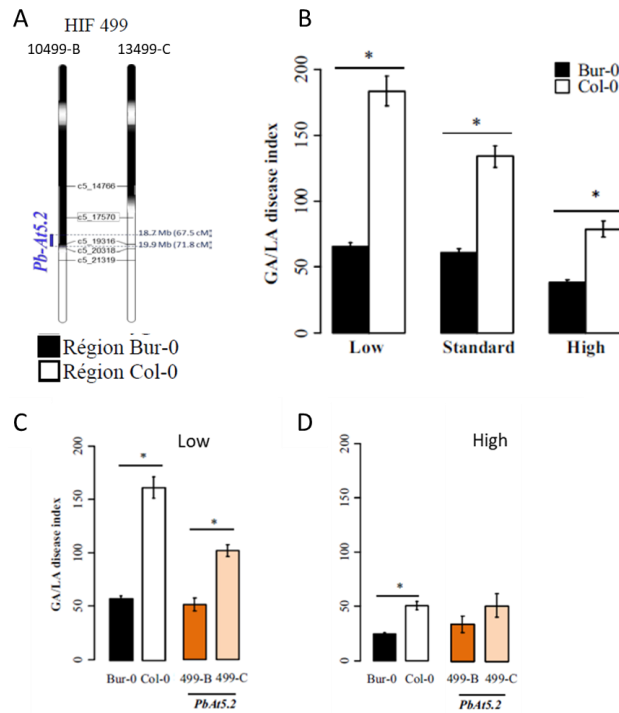


Figure V.1. : Impact des conditions abiotiques sur le niveau de résistance de différentes lignées d'*A. thaliana*. A) Le trait bleu sous l'indication *Pb-At 5.2* représente l'intervalle de confiance de ce QTL détecté par Jubault et al. (2008). Les marqueurs sont représentés par des tirets sur le chromosome 5. Le nom de chaque marqueur indique le numéro du chromosome (c5) et la position physique du marqueur en paires de bases. Les zones noires sur le chromosome représentent les régions homozygotes d'origine Bur-0 et celles en blanc représentent les régions homozygotes d'origine Col-0. Les lignées HIF 104499 et 13499 sont identiques pour la majorité de leurs génomes, combinaison du génome des deux parents Col-0 et Bur-0. Elles diffèrent uniquement dans la région encadrant le QTL *Pb-At5.2* pour laquelle 104499 porte les allèles de Bur-0 à l'état homozygote et 13499 porte les allèles de Col-0 à l'état homozygote. (B) Impact d'une basse irrigation (low), d'une irrigation standard et d'une haute irrigation (high) sur l'indice GALA chez Col-0, Bur-0. (C) Impact d'une basse irrigation (low) et (D) d'une haute irrigation (high) sur l'indice GALA chez Col-0, Bur-0 et les lignées HIF 104499 (499-B) et 13499 (499-C).

Lors d'un engorgement, la taille des galles est réduite, l'indice pathologique n'est pas impacté et l'indice GALA est plus important. Ces résultats sont ainsi cohérents avec nos hypothèses. Il est également envisageable que la condition d'engorgement et l'infection des plantes par *P. brassicae* amplifie le stress hypoxique subi par la plante puisque l'eau empêche la respiration du système racinaire et l'infection conduit à une compétition pour l'oxygène disponible à l'intérieur des racines (Gravot *et al.*, 2016b).

Cependant, ces résultats semblent contredire une étude réalisée précédemment au sein du laboratoire sur les effets des conditions hydriques du sol sur la réponse à la hernie de Col-0 notamment. Gravot *et al.* (2016) ont rapporté une moindre sensibilité de l'écotype sensible Col-0 lors d'une augmentation du niveau d'humidité du substrat et une plus forte sensibilité de Col-0 lors d'une baisse du niveau d'irrigation (**Fig. V.1**). Ces résultats contradictoires entre nos études pourraient s'expliquer par des différences dans les modalités d'application (intensité et durée d'application) des contraintes hydriques. Dans mon travail de thèse, les contraintes duraient une semaine contre deux semaines dans l'article de Gravot *et al.* (2016) et là où nous avons complètement cessé d'arroser les plantes en conditions de déficit hydrique, Gravot *et al.*, (2016a) ont réduit la quantité d'arrosage. Des expérimentations complémentaires doivent être envisagées afin de caractériser plus finement l'effet des différentes modalités d'application de la contrainte déficit hydrique (durée et/ou intensité) sur le génotype Col-0 avec et sans inoculation par la hernie.

L'application des trois contraintes abiotiques, appliquées seules ou en combinaison a été réalisée pendant sept jours. Cette durée, relativement courte par rapport à d'autres études, a été choisie d'une part afin de permettre la survie d'une majorité des plantes jusqu'à la fin des tests pathologiques. En effet, l'application d'une combinaison de deux contraintes abiotiques (élévation de la température et contraintes hydriques) sur des plantes déjà affaiblies par l'infection par la hernie sur une durée plus longue aurait très probablement conduit à une perte d'une partie de lignées de la population epiRIL, rendant difficile les analyses ultérieures. D'autre part, si la contrainte thermique peut être mise en place et son effet évalué sur un court laps de temps, par exemple quelques heures, modalités que l'on rencontre souvent dans la littérature (Swindell *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2009), la mise en place de la contrainte engorgement et surtout sécheresse est plus lente. Lors de la mise en place de la contrainte sécheresse, la diminution de VWC de 35% (condition STANDARD) à 10% (condition DROUGHT, sécheresse modérée) nécessite plus de 7 jours.

La saturation en eau (60% de VWC), lors de la contrainte d'engorgement est visible presque immédiatement après avec recouvert d'eau le système racinaire. Enfin, le cycle d'infection de *P. brassicae* étant asynchrone, plusieurs stades coexistent durant l'infection (Liu *et al.*, 2020) et l'application des contraintes abiotiques sur plusieurs jours permet d'optimiser l'impact de chaque contrainte sur l'agent pathogène.

Durant ces tests pathologiques, des contraintes abiotiques ont été appliquées seules ou en combinaison sur les plantes inoculées et non inoculées. Nous avons pu évaluer l'effet de ces contraintes abiotiques sur le développement de la plante, *via* la mesure de la longueur de la plus grande feuille des plantes non inoculées, cependant, nous ne sommes pas en mesure d'affirmer que les contraintes abiotiques appliquées ont eu un effet direct sur l'agent pathogène. Du fait de son caractère biotrophe obligatoire, il est difficile d'étudier l'effet des contraintes abiotiques sur le développement de *P. brassicae* lui-même (indépendamment du développement de la plante). Des expérimentations visant à évaluer l'impact des conditions abiotiques directement sur le développement de *P. brassicae* pourraient être envisagées par quantification de l'ADN de l'agent pathogène dans les racines par qPCR ou en déterminant précisément sa localisation et son développement dans les différents tissus racinaires lors des différents stades de l'infection *via* la réalisation de coupes histologiques (Liu *et al.*, 2020). Afin de pouvoir s'affranchir de l'effet des contraintes abiotiques sur le développement de la plante, il serait intéressant de réaliser ces études sur des lignées epiRIL présentant une forte sensibilité à la hernie et une plasticité faible au niveau de leur développement dans les différentes conditions abiotiques. Ainsi, l'étude des lignées présentant un faible ΔL_{fni} comme par exemple les epiRIL258, epiRIL238, epiRIL114 et epiRIL439 en condition HEAT, pourrait permettre d'évaluer l'impact d'une élévation de la température sur *P. brassicae* en s'affranchissant de l'effet de cette contrainte abiotique sur le développement des plantes. En conditions DROUGHT et FLOOD, toute la population epiRIL présente une importante plasticité au niveau du développement foliaire. Il serait intéressant d'investiguer si parmi les 382 autres lignées epiRIL non utilisées dans cette thèse, certaines présentent un développement foliaire stable sous DROUGHT et FLOOD afin d'évaluer l'impact des conditions hydriques sur la capacité d'infection de l'agent pathogène en s'affranchissant de l'impact des conditions abiotiques sur la plante.

Nous avons été en mesure d'appliquer des contraintes abiotiques qui conduisaient à des phénotypes contrastés au niveau du développement foliaire de la population epiRIL ou de sa réponse à la hernie des Crucifères, cependant nous n'avons pas évalué au niveau moléculaire si les lignées epiRIL avaient perçu les contraintes abiotiques que nous avons appliquées.

A**B**

Figure V.2. : Réponse de thermo-morphogénèse observée chez la population epiRIL lors d'une élévation de température de 5°C A) Condition STANDARD et B) Elévation de 5°C de la température. Les flèches orange indiquent les plantes présentant une élévation des pétioles. Photos prises quatre jours après le début de de la contrainte.

Lors d'une élévation de la température, nous avons ainsi observé une réponse phénotypique typique de la thermo-morphogénèse : les plantes présentaient en effet une élévation de leurs pétioles (**Fig. V.2.**) suggérant une perception de la contrainte thermique par les plantes. Au niveau des conditions DROUGHT et FLOOD, les plantes présentaient un développement foliaire significativement réduit (une réduction comprise entre 68 et 53 %) suggérant une perception de la contrainte. Afin de confirmer au niveau moléculaire la perception par les plantes des trois contraintes abiotiques, nous pourrions évaluer le niveau d'expression de gènes marqueurs de ces contraintes. Plusieurs gènes dérégulés lors de stress thermiques et hydriques ont déjà été identifiés dans la littérature avec notamment *PIN-FORMED 3* (*PIN3* ; *AT1G70940*) codant un régulateur des flux d'auxine et identifié comme induit lors de l'exposition d'*Arabidopsis* à une température de 28°C (Park *et al.*, 2019), *NCED3* (*NINE-CIS-EPOXYCAROTENOID DIOXYGENASE 3* ; *AT3G14440*) impliqué dans la biosynthèse de l'acide abscissique et induit cinq jours après la mise en place d'un déficit hydrique (Rasheed *et al.*, 2016) et *ACC OXYDASE 1* (*ACO1* ; *AT2G19590*) impliqué dans la synthèse de l'éthylène et induit dès 4 heures après la mise en place d'un excès d'eau (Hsu *et al.*, 2011).

La réalisation de nos expérimentations en conditions contrôlées dans des chambres de culture nous a permis de mettre en évidence une modulation de l'architecture du contrôle épigénétique de la réponse d'*A. thaliana* à la hernie par les contraintes environnementales mais ces conditions restent très éloignées des conditions environnementales réelles. En effet, les conditions abiotiques subies par les plantes au champ sont bien plus complexes que celles que nous avons mises en œuvre dans notre étude. Ainsi, afin d'obtenir des résultats dans un contexte plus réaliste, il serait pertinent d'évaluer le comportement de la population epiRIL au champ, sans et avec infestation par la hernie, et de le comparer à celui observé en conditions contrôlées. L'expérimentation au champ d'*A. thaliana* n'est pas très courante mais a déjà été réalisée par Roux *et al.* (2011) pour étudier l'effet de l'altération de la méthylation générée dans la population epiRIL dans le contrôle de la variabilité phénotypique. Cependant l'évaluation et le phénotypage des 123 epiRIL en champ est complexe du fait de l'hétérogénéité de l'environnement abiotique et biotique rencontré au sein d'un champ et de la difficulté de caractériser finement ces environnements. En effet, trouver des parcelles avec des infestations homogènes reste difficile et une inoculation artificielle du champ par la hernie est totalement exclue.

Il serait également intéressant de phénotyper la réponse d'une collection d'écotypes d'*Arabidopsis* vis-à-vis de la hernie, sous différentes conditions abiotiques en conditions contrôlées et/ou au champ. Ces accessions seraient notamment choisies en fonction de la disponibilité de données de séquençage et de méthylation. Des données combinées de séquençage et de méthylation existent pour 866 accessions naturelles d'*A. thaliana* récoltées à travers le monde. Ces données ont été obtenues à partir de l'ADN de feuilles de plantes cultivées à plusieurs températures (pouvant ainsi nous permettre d'évaluer la stabilité des régions différentiellement méthylées en fonction des températures) et à l'analyse des SNP/indel et des régions méthylées par MethylC-seq présents dans leurs génomes (Kawakatsu *et al.*, 2016). Le couplage des données génomiques et épigénomiques aux données de phénotypage (développement foliaire et réponse à la hernie) d'un sous-set d'une centaine d'accessions présentant des phénotypes contrastés vis-à-vis de la hernie (connues du fait notamment de précédents phénotypages réalisés au sein du laboratoire d'accueil) nous permettrait de réaliser des analyses d'associations (GWAS) afin d'évaluer l'effet de variants génétiques et épigénétiques dans la réponse d'*A. thaliana* à *P. brassicae* dans les différentes conditions de culture. Avec ces résultats, il nous sera ainsi possible d'évaluer si 1) les QTL^{epi} identifiés dans la population epiRIL sont également présents dans une population d'accessions naturelles, 2) les QTL^{epi} et QTL identifiés dans le panel d'accessions naturelles en conditions contrôlées sont stables dans les différentes conditions abiotiques testées (conditions standard et contraintes abiotiques et 3) si les QTL^{epi}/QTL identifiés dans le panel d'accessions en conditions contrôlées sont stables dans des conditions environnementales complexes rencontrées au champ. De plus, et afin d'intégrer les interactions génotype x environnement de façon optimale dans notre modèle, il serait intéressant de réaliser ces tests sur plusieurs années et dans plusieurs localisations géographiques, dont les environnements climatiques et agronomiques seraient finement caractérisés et utilisés en covariables dans le modèle (GWAS environnementale).

2. Aller plus loin dans la connaissance des gènes causaux

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons identifié 35 QTL^{epi} – dont 10 sont impliqués dans le contrôle du développement foliaire sans inoculation par *P. brassicae* et 25 dans le contrôle de la réponse d'*A. thaliana* à *P. brassicae* – avec des tailles d'intervalles de confiance comprises entre 6.61 Mb et 17.12 Mb.

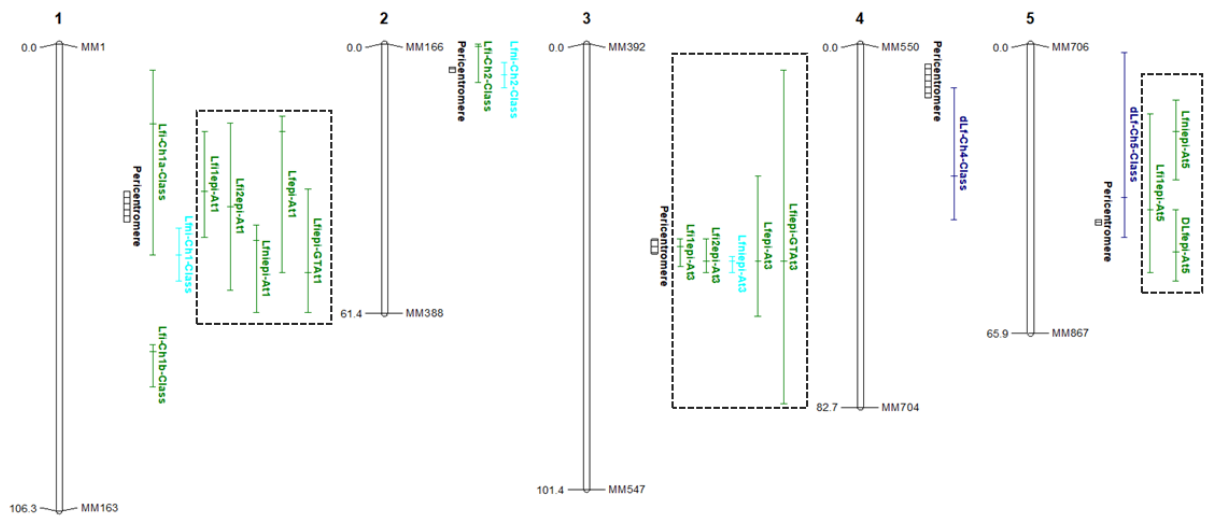


Figure V.3. : Conservation des QTL^{epi} détectés dans notre études (unboxed) et dans l'étude de B. Liégard (boxed) pour Lfi (vert), Lfni (cyan) et dLf (bleu).

Nous avons pu démontrer que pour la plupart des locus l'épiallèle hypométhylé apporté par le parent *ddm1-2*, était associé à des feuilles et des galles plus petites mais à une augmentation de l'indice GALA (surface des galles standardisée par les feuilles) et de l'indice pathologique, et donc une plus grande sensibilité à la maladie. Ces résultats diffèrent en quelques aspects de ceux trouvés précédemment dans le laboratoire (Liégard *et al.*, 2019a) et pourraient s'expliquer par l'étude de traits phénotypiques différents et des conditions expérimentales différentes. Bien que nous avons des variables communes avec celles de Liégard *et al.* (2019a) (Lfi et DI), la variable GALA (Gravot *et al.*, 2016), mesurant la taille des symptômes standardisée par la taille des feuilles, n'a été utilisée que dans notre étude. De même, nous n'avons pas évalué la quantité d'ADN de l'agent pathogène dans les racines par qPCR comme étudié par B. Liégard. Pour les variables communes entre nos deux études (Lfi, Lfni et dlf) (**Fig. V.3**) peuvent s'expliquer par la différence de structures expérimentales utilisées lors de nos thèses respectives, avec notamment une chambre de culture défaillante et moins finement régulée climatiquement dans le cadre de la thèse de B. Liégard.

Par ailleurs, des interactions épistatiques ont déjà été identifiées dans le contrôle de la résistance à la hernie (Manzanares-Dauleux *et al.*, 2000). Dans notre étude, et comme précédemment mis en évidence (Liégard *et al.*, 2019a) peu d'interaction épistatiques ont été observées entre les QTL^{epi} que nous avons détectés dans chaque condition abiotique mais nous n'avons pas évalué s'il existait des interactions épistatiques entre les QTL^{epi} détectés et le reste du génome comme cela avait été précédemment montré. Au vu de la présence de 74 variants génétiques dans la population epiRIL, il serait intéressant d'évaluer s'il existe des interactions entre nos QTL^{epi} et ces variants.

Sur les 35 QTL^{epi} détectés, trois QTL^{epi} ont été détectés au niveau du marqueur MM863 à la fin du chromosome 5, contrôlant l'indice pathologique et l'indice GALA en condition DROUGHT et l'indice GALA en condition FLOOD. Les intervalles de confiance de ces QTL^{epi} ont des tailles comprises entre 3.8 et 11.33 Mbp, soit de 935 à 1910 gènes codant notamment des protéines. Ces QTL^{epi} sont particulièrement intéressants de part : 1) leur intervalle de confiance de taille relativement petite, 2) leur localisation loin des régions péricentromériques et donc loin des régions riches en élément répétées et transposons, et 3) la présence du QTL *Pb-At 5.2* dans leurs intervalles de confiance (Jubault *et al.*, 2008).

Tableau V.1 : Lignées recombinantes au niveau de l'intervalle de confiance du QTL GALA-Ch5-DROUGHT. La première colonne indique la lignée epiRIL épigénotypée, les 5 colonnes suivantes présentent l'épigénotypage de ces lignées pour 5 épimarqueurs. En rouge, les lignées présentant l'épiallèle hypométhylé *ddm1-2* et en vert l'épiallèle hyperméthylé WT. Le phénotype GALA dans les différentes conditions pour chaque lignée est données en annexe **Tableau Supp. V.1.**

	MM859	MM862	MM863	MM865	MM867
epiRIL70	1	1	1	1	2
epiRIL439	1	1	1	1	2
epiRIL208	1	1	1	2	2
epiRIL244	1	1	1	2	2
epiRIL257	1	1	1	2	2
epiRIL356	1	1	1	2	2
epiRIL333	1	1	2	2	2
epiRIL362	1	1	2	2	2
epiRIL366	1	1	2	2	2
epiRIL344	1	2	2	2	2
epiRIL225	1	2	2	1	1
epiRIL480	2	2	1	1	1
epiRIL410	2	2	2	1	1
epiRIL93	2	2	2	2	1
epiRIL215	2	2	2	2	1

Les gènes NLR causaux *AT5G47260* et *AT5G47280* du QTL *Pb-At5.2* ont été récemment validés dans le laboratoire comme impliqués dans la résistance partielle de Bur-0 à la hernie par une approche de CRISPR-KO dans les fonds génétiques résistants Bur-0 et HIF-10499 (données en cours de publication). L'expression de ces gènes est contrôlée par une épimutation dont l'effet dépend de la disponibilité en eau (Gravot *et al.*, 2016a; Liégard *et al.*, 2019b). Les gènes *AT5G47260* et *AT5G47280* pourraient donc être également des gènes candidats potentiels pour les 3 QTL épigénétiques détectés dans notre étude dans cette région. Cependant, même si ces gènes apparaissent comme des gènes candidats causaux probables, il faut garder à l'esprit que ces deux gènes sont situés à 500 kb du marqueur épigénétique MM863 au pic de nos QTL^{epi} et qu'il y a, dans l'intervalle de confiance des QTL^{epi}, plus de 900 autres gènes codant des protéines, eux aussi candidats causaux possibles. Afin de valider si les gènes *AT5G47260* et *AT5G47280* sont les gènes causaux de nos QTL^{epi} ou si ce sont d'autres gènes présents dans ces intervalles de confiance, il est nécessaire d'affiner l'intervalle de confiance de ces trois QTL^{epi}.

Une approche de cartographie fine pourrait être envisagée pour certains de nos QTL^{epi}, notamment les trois QTL^{epi} précédemment décrits et localisés sur la fin du chromosome 5. Il s'agirait dans un premier temps d'identifier les lignées epiRIL présentant des recombinaisons dans leurs intervalles de confiance. Le QTL^{epi} GALA-Ch5-DROUGHT, par exemple, présente un intervalle de confiance de 3.7 Mbp compris entre les épimarqueurs MM859 et MM867. Quinze des 123 lignées epiRIL présentent des recombinaisons au niveau de son intervalle de confiance (**Tableau V.1**). Il serait également possible d'identifier des lignées recombinantes supplémentaires entre les épimarqueurs MM859 et MM867 dans les 382 autres lignées de la population epiRIL que nous n'avons pas utilisées pendant cette thèse. Les 382 autres lignées epiRIL n'ayant pas été génotypées, il faudra envisager un épi-génotypage pour les cinq épimarqueurs (MM859, MM862, MM863, MM865 et MM867) inclus dans l'intervalle de confiance du QTL^{epi} GALA-Ch5-DROUGHT afin d'identifier les lignées présentant des recombinaisons dans cette région. La densification de la zone en épimarqueurs pourra être réalisée à partir des épimarqueurs précédemment identifiés par Colome-Tatche *et al.* (2012) mais non utilisés pour la carte épigénétique. Une fois les lignées recombinantes identifiées au sein de la population entière et épigénotypées à l'aide des nouveaux épimarqueurs, leur phénotypage en réponse à l'infection par la hernie dans les différentes conditions abiotiques (STANDARD, HEAT, DROUGHT et FLOOD) appliquées durant la thèse permettra la réalisation d'analyses de liaison pour les caractères DI et GALA et la réduction de leurs intervalles de confiance.

Cette réduction de l'intervalle de confiance devrait nous permettre de réduire fortement le nombre de gènes/ éléments génétiques candidats causaux sous ces QTL^{epi} pour pouvoir ensuite envisager une (non)-validation fonctionnelle d'un petit nombre d'entre eux par des approches CRISPR. Si la validation de l'implication d'un gène candidat dans la réponse d'*Arabidopsis* pourra être réalisée par des approches KO en utilisant la technologie CRISPR-Cas9, la validation de l'implication d'épimutations contrôlant ce gène causal ne pourra être faite que par des approches de (dé)méthylation ciblée (Sapozhnikov & Szyf, 2022).

3. Stabilité des QTL^{epi} et des niveaux de méthylation des gènes causaux dans les différentes conditions abiotiques

Durant ces travaux, nous avons pu mettre en évidence que l'architecture du contrôle épigénétique de la réponse d'*A. thaliana* à la hernie des crucifères était dépendant des conditions abiotiques. Ainsi, sur les trente-cinq QTL^{epi} détectés, quinze QTL^{epi} ont été détectés dans une seule condition abiotique et vingt se sont révélés être communs entre au moins deux conditions abiotiques (dont huit partagent un épimarqueur au pic du QTL^{epi} avec au moins un autre QTL^{epi} et douze présentent des intervalles de confiance qui se chevauchent). Nous ne pouvons pas totalement exclure que la non-détection de certains QTL^{epi} ne soit pas liée à des limites de phénotypage. Le phénotypage de la réponse à l'infection par la hernie dans différentes contraintes environnementales est complexe. Même si un grand soin a été apporté lors de la réalisation des tests pathologiques, nous ne pouvons pas exclure par exemple une hétérogénéité dans l'arrosage en conditions STANDARD, HEAT ou de contrainte hydrique, le statut hydrique des plantes étant suivi à l'aide de 6 sondes réparties dans la chambre et non par la pesée des pots individuels. Des variations d'irrigation, même faibles pourraient avoir un impact sur l'infection (cf discuté dans le **paragraphe 1.**) et expliquer une partie de la variabilité intra-génotype observée dans les tests. Outre ces limites techniques, nous pouvons émettre trois hypothèses quant à la modulation de l'effet des QTL^{epi} par l'environnement :

- Les conditions abiotiques impactent le niveau de méthylation du (des) gène(s) causal(aux) et donc les voies en aval que ce(s) gène(s) causal(aux) contrôle(ent)
- Les conditions abiotiques appliquées entraînent une variation de la méthylation au niveau des épimarqueurs et, par des mécanismes de spreading, au niveau du (des) gène(s) causal(aux) et donc les voies en aval que ce(s) gène(s) causal(aux) contrôle(ent)

- Les conditions abiotiques impactent directement les voies de réponse (voies métaboliques ou de signalisation) impliquées dans la réponse de résistance ou de sensibilité à la hernie modulant ainsi le phénotype de résistance de la plante sans impacter le niveau de méthylation

Nous avons évalué durant ces travaux une population épigénétiquement recombinante dont les 126 épimarqueurs sont stables sur dix générations (Colome-Tatche *et al.*, 2012). Le niveau de méthylation de ces épimarqueurs a été évalué de manière qualitative avec 3 niveaux de méthylation possibles : un état hypométhylé, un état de méthylation intermédiaire et un état hyperméthylé. Colome-Tatche *et al.* (2012) rapportent que 1) 68.8% des régions hypométhylées issues du parent *ddm1-2* ont réversé au cours des 10 générations vers un statut hyperméthylé et que 2) certaines de ces réversions ont été observées chez certaines lignées seulement. Ce taux de réversion a été estimé entre $1.36E^{-6}$ et $5.85E^{-7}$ par lignée et par génération (Cortijo, 2012).

Nous avons étudié le niveau de méthylation de deux épimarqueurs (MM171 et MM863) en fonction des conditions abiotiques appliquées. Ces deux marqueurs sont hyperméthylés chez Col-0 et l'épiRIL495 en conditions classiques de culture. L'épimarqueur MM863 présente un niveau de méthylation stable chez ces deux lignées quelles que soient les conditions de culture testées tandis que l'épimarqueur MM171 devient hypométhylé dans la condition HEAT uniquement. Chez Bur-0, ces deux épimarqueurs présentent un état hypométhylé en conditions STANDARD et HEAT mais présentent un état intermédiaire de méthylation voire une hyperméthylation en conditions FLOOD et DROUGHT. Nous avons ainsi mis en évidence une variation de méthylation de certains épimarqueurs en fonction des conditions abiotiques appliquées et cette variation est dépendante du reste du fond (épi)génétique. Ces variations de méthylation détectées au niveau d'épimarqueurs n'ont pas d'impact direct sur la détection de QTL^{epi} (**Figure III.1**). En effet, la détection de QTL^{epi} n'est impactée que si ces variations de méthylation concernent également le gène causal d'un QTL à proximité de l'épimarqueur (par exemple par phénomène de spreading (Ahmed *et al.*, 2011) ou par réversion de méthylation impactant de grandes régions (Cortijo, 2012)). Afin de valider ces premiers résultats obtenus uniquement au niveau de deux épimarqueurs et d'évaluer la proportion d'épimarqueurs présentant des niveaux de méthylation variables en fonction des conditions abiotiques, l'analyse ciblée du niveau de méthylation des 124 autres épimarqueurs dans les différentes conditions abiotiques pourra être réalisée par Bisulfite- PCR-Sequencing.

Une approche globale par Whole Genome Bisulfite sequencing (WGBS) pourrait nous permettre d'évaluer, à l'échelle du génome, si 1) les DMR sont stables en fonction des conditions et 2) s'il existe d'autres DMR potentiellement pertinentes à intégrer dans la carte épigénétique déjà réalisée (Colome-Tatche *et al.*, 2012). Ces expérimentations pourront être réalisées dans un premier temps sur un petit nombre de lignées présentant soit une majorité de loci hypométhylés comme l'épiRIL232 (97 épimarqueurs hypométhylés sur 126) soit une majorité de loci hyperméthylés telle que l'épiRIL170 (125 épimarqueurs hyperméthylés sur 126) avant d'être généralisées à des lignées présentant des phénotypes ou des comportements particuliers.

Même si la variation de méthylation au niveau des épimarqueurs n'impacte pas à priori directement la détection de QTL, la mise en évidence de variations de méthylation au niveau d'épimarqueurs confirme la possibilité d'un méthylome variable en fonction des contraintes abiotiques et de modifications de méthylation au niveau d'autres régions du génome, tels que des gènes ou éléments génétiques contrôlant la réponse de la plante à la hernie.

De nombreuses études ont déjà rapporté la modulation du niveau de méthylation global du génome de la plante ou de régions spécifiques du génome lors de l'application de contraintes abiotiques, corroborant nos résultats observés sur les épimarqueurs MM171 et MM863. Ces modifications épigénétiques sont adaptatives (régulations épigénétiques en réponse à des stimuli) mais peuvent aussi être hérissables, c'est-à-dire transmises aux générations suivantes (épimutations) (**cf chapitre I.2**). Une augmentation du niveau de méthylation global a ainsi été observée chez la mûre et le citron (Ackah *et al.*, 2022; Huang *et al.*, 2023) lors d'un déficit hydrique ou chez le coton lors d'une augmentation de la température (He *et al.*, 2022). D'autres stress environnementaux, comme les radiations peuvent entraîner une modulation du niveau de méthylation de certains gènes, comme par exemple *FAD3A*, impliqué dans la biosynthèse d'acides gras chez le lin (Lancíková *et al.*, 2020). L'application de contraintes abiotiques peut également conduire à la création d'épimutations. Chez le pissenlit, par exemple, l'application de diverses contraintes abiotiques a conduit à la modification de méthylation de 20 régions, lors d'un déficit nutritionnel, et de 37 régions, lors d'un traitement au SA, 74% de ces épimutations étant transmises à la seconde génération (Verhoeven *et al.*, 2010). Chez un génotype de riz résistant à la sécheresse, l'application d'un déficit hydrique sur plus de six générations a entraîné la modification de l'état de méthylation de 89 régions (DMR), 29.8% de ces DMR étant transmises sur plusieurs générations. Sur 402 DMR induites par la sécheresse chez un génotype de riz sensible, 3.2% sont transmises sur au moins six générations (Zheng *et al.*, 2013, 2017).

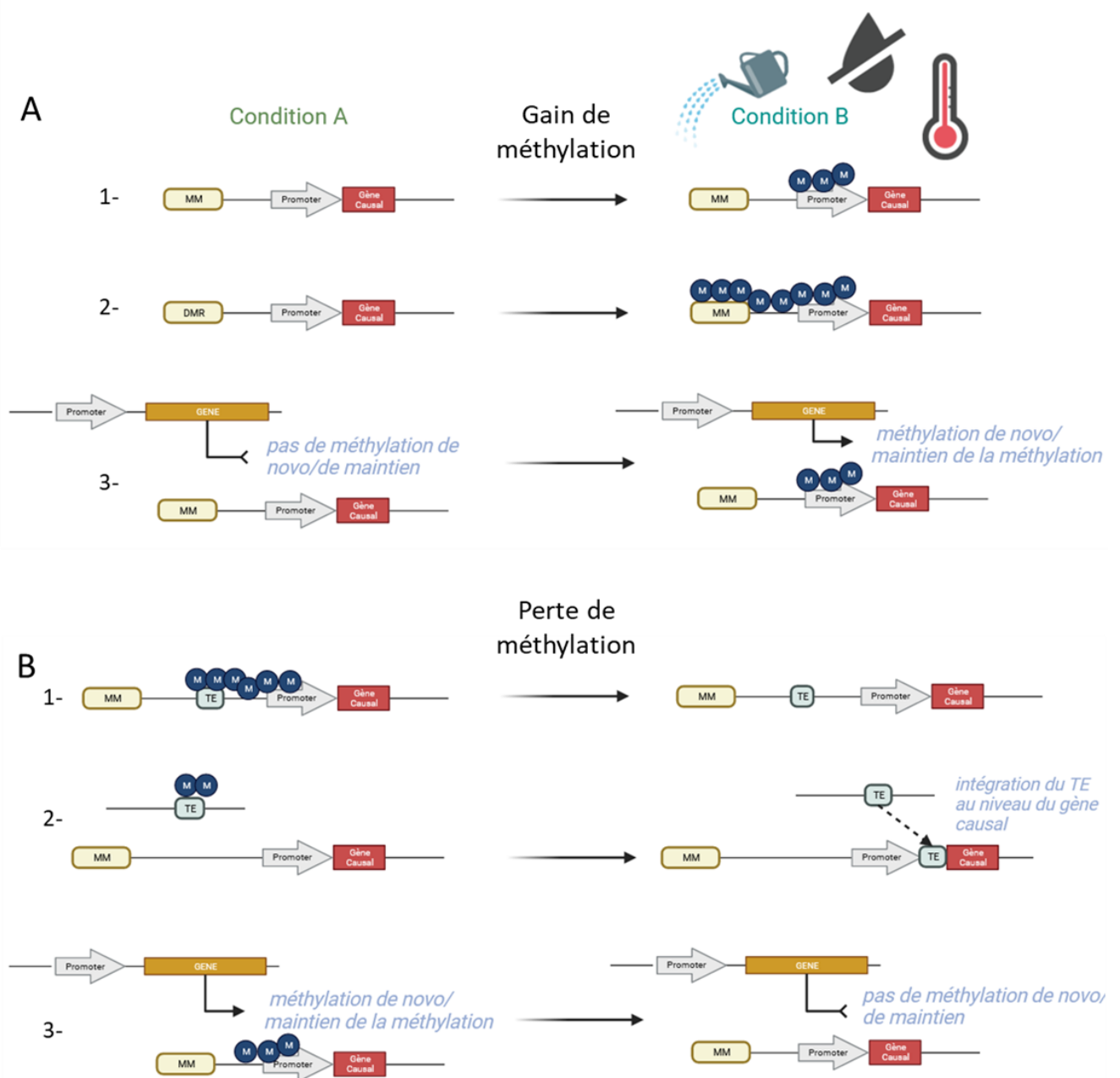


Figure V.4. : Hypothèses de modulation du niveau de méthylation sous différentes conditions abiotiques. A) Lorsque la condition B conduit à une méthylation des gènes causaux soit au niveau de leur promoteur (1), soit au niveau des épimarqueurs et par phénomène de spreading (2). Ce gain de méthylation peut potentiellement s’expliquer par (3) un impact positif de la condition B sur les mécanismes de méthylation *de novo* ou de maintien de la méthylation ou un impact négatif de la condition B sur les mécanismes de déméthylation active. B) Lorsque la condition B conduit à une déméthylation, (1) d’éléments transposables (TE) proches des gènes causaux ce qui entraîne la déméthylation par spreading du promoteur du gène causal et sa potentielle expression. (2) la déméthylation d’un élément transposable (TE) dans la condition B ce qui entraîne sa remobilisation et son intégration dans le promoteur et/ou le gène causal. Cette déméthylation peut-être expliqué par (3) un impact négatif de la condition B sur les mécanismes de méthylation *de novo* ou de maintien de la méthylation ou un impact positif de la condition B sur les mécanismes de déméthylation active.

La modulation du niveau de méthylation global ou spécifique peut s'expliquer par un effet des conditions abiotiques sur les mécanismes de mise en place de la méthylation *de novo*, du maintien de la méthylation ou bien de la déméthylation. De nombreux mutants impactés dans la voie de méthylation *de novo* et notamment dans la production de petits ARN non codants sont moins tolérants que les écotypes sauvages à une élévation de la température (Popova *et al.*, 2013). Chez la tomate ou le peuplier, l'altération de l'expression du gène *DDMI*, impliqué dans le maintien de la méthylation, conduit à une meilleure tolérance à l'augmentation de la température ou à la sécheresse, respectivement (Sow *et al.*, 2021; Singh *et al.*, 2021). Plusieurs protéines impliquées dans le processus de déméthylation, telles que ROS1 ou DEMETER, sont induites lors de la réponse d'*A. thaliana* et de *B. napus* à une élévation de la température (Naydenov *et al.*, 2015; Fan *et al.*, 2020; Yang *et al.*, 2022).

Un des rôles majeurs de la méthylation de l'ADN est la mise sous-silence des éléments transposables et répétés (Quesneville, 2020) et plusieurs travaux ont montré, lors de stress abiotiques, la perte de méthylation au niveau de certains de ces éléments conduisant à leur expression comme par exemple l'expression du rétrotransposon LTR-copia like *ONSEN* ou des éléments transposable *COPIA* et *GYPHY* lors d'un stress thermique chez *A. thaliana* (Cavrak *et al.*, 2014; Deneweth *et al.*, 2022). Une proportion importante des épimarqueurs de la population epiRIL étant positionnés au niveau des régions péri-centromériques, riches en transposons et éléments répétés, une perte de méthylation au niveau de certains de ces épimarqueurs lors de l'application de contraintes abiotiques est à envisager. De même la perte de méthylation au niveau de transposons lors de l'application de contraintes abiotiques pourrait expliquer la perte ou la détection de QTL^{epi} dans ces conditions de culture : (i) la déméthylation d'un transposon à proximité d'un gène causal contrôlant le développement ou la réponse à la hernie de la population epiRIL pourrait expliquer la déméthylation par spreading du gène causal (région promotrice et/ou corps du gène) et ainsi la modification de son expression ; (ii) la déméthylation d'un transposon pourrait entraîner son transfert vers d'autres régions du génome et son insertion dans un gène (région promotrice ou corps de gène) contrôlant le développement ou la réponse à la hernie de la population epiRIL et ainsi en modifier l'expression ou la fonctionnalité (**Fig. V.4**).

Outre les transposons et les gènes impliqués dans la mise place, le maintien de la méthylation et la déméthylation, des gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques ont déjà été décrits comme étant modulés par les conditions abiotiques.

En effet, une déméthylation des promoteurs des gènes *ACONITASE HYDRATASE 3 (ACO3)*, *ACCELERATED DEATH CELL 6 (ACD6)* et *GLUTATHIONE S-TRANSFERASE (GST)* impliqués dans la biosynthèse de SA lors de stress abiotiques a été observée par Yang *et al.* (2022). Il semble ainsi pertinent d’imaginer que la perte ou la détection de QTL^{epi} dans des conditions abiotiques spécifiques soient dues à la modification directe du niveau de méthylation de gènes impliquée dans les voies de défense des plantes.

Il est également envisageable que les conditions abiotiques impactent directement les processus physiologiques mis en place lors de l’infection d’*A. thaliana* par *P. brassicae*. La hausse de la température conduit ainsi à des phénomènes de thermo-morphogénèse et notamment à une accumulation d’auxine dans les parties abaxiales du pétiole (Hwang *et al.*, 2017; Park *et al.*, 2019). Cette accumulation d’auxine au niveau des parties aériennes pourrait venir contrebalancer l’accumulation d’auxine au niveau des racines lors de l’infection par *P. brassicae* et participer à une meilleure résistance de la plante. Cependant, l’activation de la voie des brassinostéroïdes et de l’expression de gènes induisant l’expansion cellulaire lors d’une élévation de la température pourrait favoriser le développement de galles et le phénomène d’hypertrophie lors de l’infection par *P. brassicae* (Ibañez *et al.*, 2018). *A contrario*, la suppression de la réponse auxinique et la production de glucosinolates lors d’un déficit hydrique (Shani *et al.*, 2017; Salehin *et al.*, 2019) pourraient participer à la réponse de résistance que nous avons observée durant notre étude. De plus, l’accumulation d’ABA lors de l’infection par *P. brassicae* (Devos *et al.*, 2005; Jayasinghe *et al.*, 2023) et des phénomènes de sécheresse (Kim *et al.*, 2004; Fujita *et al.*, 2005, 2009; Yoshida *et al.*, 2010, 2015) suggèrent une réponse similaire de la plante à ces deux stress. En condition d’excès d’eau, la plante produit de l’éthylène et réorganise sa structure racinaire en développant d’aérenchymes et des racines adventives (Hinz *et al.*, 2010; Licausi *et al.*, 2011). Lors d’un excès hydrique, les plantes accumulent de l’auxine et surexpriment l’*EXPANSINE 11 (EXP11)* (Rauf *et al.*, 2013). Tous ces changements sont similaires à ceux observés lors de l’infection par *P. brassicae*, notamment au niveau de l’expansion cellulaire. De plus, l’éthylène a été montré comme favorisant la phase secondaire de l’infection (Wang *et al.*, 2022), ainsi, l’éthylène produit lors de la condition FLOOD durant la phase secondaire de l’infection pourrait favoriser cette dernière.

Ces réponses physiologiques ont été identifiées chez des écotypes naturels sensible ou résistant à la hernie des crucifères, mais les mécanismes de la réponse des epiRIL à la hernie n’ont pas été caractérisés fonctionnellement.

Afin d'identifier les réponses mises en place par les lignées epiRIL lors de l'infection et de les relier aux QTL^{epi} que nous avons identifiés, plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Une première stratégie serait de créer des couples HIF pour « Heterogeneous Inbred Family » pour quelques QTL^{epi} et d'étudier leurs réponses transcriptomiques à l'infection par la hernie. Ces couples de lignées présentent en effet des fonds génétique et épigénétique identiques sauf au niveau du QTL^{epi} d'intérêt. Elles permettraient d'évaluer les réponses transcriptomiques associées à un QTL^{epi} en s'affranchissant des variants génétiques et des relations épistatiques avec le reste du génome. Cette technique est cependant très complexe dans le cas des epiRILs et longue puisqu'elle demande une autofécondation des lignées sur au moins 6 générations ce qui mettrait plus d'un an et demi et demande également l'identification d'une lignée hétérozygote au niveau de cette région. Une stratégie d'analyse en bulk serait plus rapide et permettrait aussi de s'affranchir de l'effet du fond génétique. Ainsi, les ARNm d'une dizaine de lignées, présentant au niveau des marqueurs d'intérêt l'épi-haplotype favorisant la résistance et infectées par la hernie, seront séquencés ensemble (bulk) et comparés aux ARNm d'une dizaine de lignées présentant, au niveau de ces marqueurs, l'épi-haplotype défavorable à la résistance. Une analyse d'enrichissement fonctionnelle des gènes différentiellement exprimés pourra ainsi nous permettre d'identifier les mécanismes de résistance et de sensibilité associés à chacun des types de lignées. Sur ces échantillons, une analyse cinétique des hormones, dont l'auxine, les cytokinines, l'éthylène, l'acide jasmonique et l'acide salicylique permettrait de comparer les voies de réponse de la population epiRIL avec celles identifiées chez les écotypes Col-0 et Bur-0. Dans le cas du QTL^{epi} (GALA-Ch2-Standard), unique QTL^{epi} identifié comme contrôlant le caractère GALA en condition STANDARD, détecté sur le chromosome 2 au niveau de l'épimarqueur MM171 et dont l'hypométhylation était associée à la sensibilité à la hernie, 20 lignées pourraient être considérées. Dix lignées présentent l'épi-haplotype hypométhylé et une réponse de sensibilité : epiRIL122, 232, 114, 114, 477, 466, 98, 363, 54, 432 et 229 et dix lignées présentent l'épi-haplotype hyperméthylé et une réponse plus résistante : epiRIL315, 366, 523, 400, 437, 492, 60, 52, 458 et 172.

Qu'il s'agisse de l'étude des HIF ou des bulk de plusieurs lignées, réaliser ces études à 14 jours après l'infection au cours de l'infection secondaire et à 21 jours après l'infection, lors de l'évaluation du phénotypage, permettrait un suivi cinétique des réponses mises en place et une comparaison avec les données disponibles au laboratoire sur les écotypes Col-0 et Bur-0.

Il serait d'ailleurs également intéressant d'utiliser ces deux écotypes déjà bien caractérisés dans les conditions optimales afin d'évaluer l'impact de conditions abiotiques sur les processus physiologiques mis en place lors des réponses de sensibilité ou de résistance.

4. Validation et étude de l'implication des miRNA et de leurs gènes cibles dans la réponse à la hernie

Au cours de ce travail de thèse, nous avons montré l'implication des miARN dans la réponse d'*A. thaliana* à la hernie. Vingt-et-un miARN sont différentiellement exprimés entre plantes infectées et non-infectées chez l'écotype sensible Col-0 et cinq chez l'écotype partiellement résistant, Bur-0.

Ces miARN ont été identifiés en utilisant l'outil miRDeep2 développé pour l'identification des miRNA chez le génome animal, pouvant potentiellement biaiser les résultats obtenus. En effet, quelques différences existent entre les miARN des plantes et ceux des animaux et ces spécificités sont prises en compte, ou non, par certains outils de mapping. Par exemple, un nombre important de miARN animaux sont situés dans les introns des ARNm contre un seul jusque-là identifié (miR402) chez les plantes (Millar & Waterhouse, 2005). Ainsi, l'utilisation d'autres outils de mapping tels que sRNAbench, miRExpress ou miRDEEP2-P pourrait permettre l'identification d'autres miARN impliqués dans la réponse d'*A. thaliana* à la hernie (Li *et al.*, 2021).

Les 13 miARN induits chez Col-0 appartiennent à 5 familles de miARN : *MIR156*, *MIR159*, *MIR2936*, *MIR5642* et *MIR8176* et les 8 miARN réprimés appartiennent aux cinq familles suivantes : *MIR164*, *MIR166*, *MIR396*, *MIR831* et *MIR869*. Chez Bur-0, les trois miARN réprimés appartiennent à la famille de *MIR169*, *MIR390* et *MIR5658* et les deux miARN induits appartiennent à la famille de *MIR159* et *MIR866*. Chez l'écotype sensible Col-0, 283 gènes ont été prédits comme cibles des miARN différentiellement régulés. Parmi eux, 145 gènes prédits comme étant les cibles de 8 miRNA sont induits et 138 gènes prédits comme étant les cibles de 13 miRNA sont réprimés lors de l'infection. Les cibles prédites de miR165/miR166 sont enrichies en gènes impliqués dans les processus et composants cellulaires associés à la production d'énergie, comme le chloroplaste. Les cibles prédites de miR156/miR157 sont enrichies en gènes impliqués dans la biosynthèse de sucres et d'acides aminés. Finalement, les cibles prédites de miR2936 sont enrichies en gènes impliqués dans la biosynthèse des parois végétales.

Chez l'écotype partiellement résistant (Bur-0), 6 gènes, induits lors de l'infection, ont été prédits comme ciblés par 2 miARN et 43 gènes, réprimés durant l'infection, sont ciblés par 3 miARN. Les cibles prédites de miR169 sont enrichies en gènes impliqués dans les mécanismes de perception des molécules des agents pathogènes tels que des peptidoglycanes. Les cibles de miR319 sont enrichies en gènes impliqués dans la voie de production de sucre ou de métabolites secondaires.

De nombreux miARN impliqués dans la réponse des plantes aux nématodes du genre *Meloidogyne*, lesquels provoquent des symptômes impliquant des phénomènes d'hyperplasie et d'hypercentrophie, ont été également retrouvés dans la réponse d'*A. thaliana* à la hernie des crucifères, notamment des miARN des familles *MIR156*, *MIR164*, *MIR165/MIR166*, *MIR169*, *MIR319*, *MIR390* et *MIR396* avec des patterns d'expression similaires ou différents. Par exemple *MIR319*, induit dans notre étude chez les 2 génotypes, est réprimé durant l'infection d'un génotype sensible d'*A. thaliana* par les nématodes à galles (Cabrera *et al.*, 2016; Medina *et al.*, 2017) mais induit dans la réponse d'un génotype sensible de tomate à *M. incognita* (Zhao *et al.*, 2015). *MIR390*, réprimé durant l'infection de l'écotype partiellement résistant, Bur-0, est induit lors de l'infection par ces nématodes de génotypes sensibles d'*Arabidopsis*, du coton, de la tomate et du pois (Cabrera *et al.*, 2016; Díaz-Manzano *et al.*, 2018; Pan *et al.*, 2019). *MIR396*, réprimé lors de l'infection de l'écotype sensible Col-0 par *P. brassicae* est également réprimé dans les premiers jours de l'infection par *M. incognita* et *H. schachtii* mais induit lors de la phase d'infection tardive (Hewezi *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2015; Kaur *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2019). Cependant, il est à souligner que ces miARN ont également été décrits dans d'autres interactions plante-agent pathogène ne conduisant pas à la production de protubérances cellulaires, telles que l'infection par *Sclerotinia sclerotiorum* chez *Arabidopsis* (Cao *et al.*, 2020) ou chez *B. napus* (Cao *et al.*, 2016; Regmi *et al.*, 2021), suggérant qu'ils pourraient intervenir dans des processus de réponse des plantes aux agents pathogènes plus généraux que dans le développement de galles.

En tant que régulateurs clefs d'un grand nombre de processus physiologiques, les miARN sont de plus en plus considérés comme étant impliqués dans le dialogue inter-règnes entre une plante et son microbiote (Middleton *et al.*, 2021) ou bien entre une plante et un agent pathogène comme par exemple cela été montré lors de l'infection d'*A. thaliana* par la plante parasitaire *Cuscuta campestris* (Shahid *et al.*, 2018). Dans le cas de la hernie des crucifères, l'infection de la plante entraîne une modification de la communauté microbienne de la rhizosphère (Zhao *et al.*, 2017; Lebreton *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2020).

Tableau V.2. : Implication des miARN identifiés durant ce travail de thèse dans d'autres contraintes abiotiques et biotiques.

Familles de MIARN	Stress biotiques	Stress abiotiques
<i>MIR156;MIR164;MIR165 /MIR166; MIR16; MIR159;MIR390;MIR396</i>	<i>M. incognita, M. javanica, G. restochiens, H. glycines, H. schachtii, S. sclerotiorum</i>	Sécheresse;Thermique , Excès d'eau
<i>MIR2936</i>	NA	Excès d'eau
<i>MIR5642</i>	NA	Sécheresse
<i>MIR5658</i>	<i>R. solanacearum</i>	Excès d'eau
<i>MIR831</i>	<i>M. incognita</i>	NA
<i>MIR869</i>	NA	Excès d'eau

Le microbiote du sol régule également la germination des spores de repos (Wang *et al.*, 2023b) et peut moduler la réponse transcriptomique des deux partenaires chez le pathosystème *B. napus/P. brassicae* (Daval *et al.*, 2020). Étudier le rôle des miARN dans l'interaction tripartite plante - *P. brassicae* - microbiote pourrait permettre une meilleure compréhension de ces interactions. Durant ma thèse, je me suis intéressée aux miARN de la plante modulés lors de l'infection par la hernie, mais les échantillons déjà séquencés pourraient également permettre d'identifier les miARN de *P. brassicae* et leurs cibles chez l'agent pathogène mais aussi chez la plante hôte, notamment ceux impliqués dans le détournement du métabolisme de la plante. Afin d'évaluer le rôle des miARN de la plante hôte ou de *P. brassicae* sur le contrôle des communautés microbiennes et vice-et versa le rôle des miRNA du microbiote sur la physiologie de la plante et de l'agent pathogène, extraire et séquencer les petits ARN présents dans la rhizosphère lors d'une infection de *Brassicaceae* par la hernie pourrait conduire à l'identification de miARN issus de la plante, de *P. brassicae* et du microbiote et leurs cibles respectives chez les trois acteurs de cette interaction.

Les miARN ne sont pas seulement impliqués dans la réponse des plantes aux contraintes biotiques mais jouent également un rôle majeur dans la réponse des plantes aux contraintes abiotiques (Zhang, 2015; Pagano *et al.*, 2021). Des miARN dont l'expression est modulée par la température ont été identifiés chez le soja (Ding *et al.*, 2021), le lin (Pokhrel & Meyers, 2022), le blé (Sihag *et al.*, 2021) ou l'arbre *Betula luminifera* (Pan *et al.*, 2017). Un déficit hydrique conduit également à la modification de l'expression de certains miARN chez le maïs (Aravind *et al.*, 2017), la vesce commune (Zhu *et al.*, 2021), le théier (Guo *et al.*, 2017) ou le riz (Xia *et al.*, 2020). Un stress inondation ou hypoxique entraîne des modulations similaires chez la luzerne (Feyissa *et al.*, 2021), le maïs (Zhang *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2012; Zhai *et al.*, 2013), la tomate sauvage (Hou *et al.*, 2019) ou *Arabidopsis* (Moldovan *et al.*, 2010). Parmi les miARN que nous avons identifiés dans notre étude et impliqués dans la réponse d'*A. thaliana* à *P. brassicae* (**Tableau V.2.**), plusieurs ont déjà été décrits dans la réponse des plantes à des contraintes abiotiques. La famille *MIR156* a ainsi été identifiée chez plusieurs espèces végétales (la tomate, le théier, *A. thaliana*, le riz, le maïs, le colza et le lin) lors de leur réponse à des stress abiotiques tels qu'une hausse de température (Ding *et al.*, 2021), un déficit hydrique (Aravind *et al.*, 2017) ou un excès d'eau (Liu *et al.*, 2012; Hou *et al.*, 2019; Feyissa *et al.*, 2021). Les familles *MIR165/MIR166*, *MIR164*, *MIR169*, *MIR319*, *MIR390* et *MIR396* ont également été identifiées dans la réponse à d'autres stress abiotiques (Lu *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019, 2020; Wen *et al.*, 2020; Fang *et al.*, 2021; Wang *et al.*, 2023a).

Même s'ils sont moins fréquemment décrits dans des réponses aux stress, miR5642 a été identifié dans la réponse du maïs à la sécheresse (Aravind *et al.*, 2017), miR5658 dans la réponse du maïs à l'inondation (Liu *et al.*, 2012) et miR2936 dans la réponse d'*A. thaliana* à un excès d'eau (Loreti *et al.*, 2020).

Certains miARN, impliqués dans la réponse des plantes à plusieurs contraintes biotiques ou abiotiques sont ainsi considérés comme miARN généralistes tels que *MIR165/MIR166*, *MIR396* ou *MIR319*, tandis que les miARN identifiés dans la réponse des plantes à un ou deux stress suggèrent une réponse plus spécifique de ces miARN, tels que *MIR866*. Des travaux précédemment réalisés par Sanz-Carbonell *et al.* (2019a,b) ont démontré que les miARN généralistes ciblent majoritairement (70% des cibles) des facteurs de transcription impliqués dans des processus développementaux et sont considérés alors comme des régulateurs principaux des nœuds (hubs) de régulation de l'expression génique (Sanz-Carbonell *et al.*, 2019a,b). Les miARN dits spécialistes ciblent des gènes impliqués dans des processus de réponse spécifiques au stress appliqué ou des fonctions cellulaires basales comme le métabolisme primaire ou la photosynthèse (Sanz-Carbonell *et al.*, 2019a,b).

Les miARN que nous avons étudiés semblent ainsi importants dans les processus de réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques. Afin de valider leur rôle dans l'interaction *A. thaliana*-*P. brassicae*, il faudrait phénotyper la réponse à la hernie des mutants altérés dans l'expression des miARN. De nombreux mutants sont déjà disponibles au sein du laboratoire ou d'autres institutions. Il est toutefois important de prendre en compte la redondance fonctionnelle de certains miARN au sein de chaque famille et la possibilité de ne pas observer de phénotype lors de l'évaluation d'un mutant altéré dans l'expression d'un seul miARN. Il sera ainsi nécessaire de prévoir le développement et le phénotypage de doubles voire triples mutants pour chacune des familles. Certains de ces mutants sont en cours d'évaluation au sein du laboratoire, notamment les mutants KO simples *mir164 a, b et c* et le triple mutant *mir164abc* ainsi que les mutants KO simples *miR319a* et *b* et le double mutant *miR319ab* (Koyama *et al.*, 2017). L'utilisation de mutants « surexpresses » de ces miARN ou mimant une perte de leur fonction (mutant TARGET MIMICRY) pourrait également permettre de valider ou réfuter, le rôle de ces miARN dans l'interaction *Arabidopsis*-*P. brassicae*.

Pour les miRNA dont les mutants KO présenteraient des phénotypes intéressants (résistance ou sensibilité accrue face à la hernie), le développement de lignées à fusion transcriptionnelle, c'est-à-dire des lignées transgéniques rapportrices permettant de suivre l'activité des promoteurs grâce à l'utilisation de molécules fluorescentes telles que la GFP (green fluorescent protein (Kain *et al.*, 1995) ou la Venus (Nagai *et al.*, 2002), permettrait de suivre la localisation *in vivo* de l'expression des miARN d'intérêt ainsi que de leur cible (Sieber *et al.*, 2007; Bilsborough *et al.*, 2011).

Les mutants décrits ci-dessus n'ont pas encore développés pour toutes les familles identifiées dans notre étude. Le développement de mutants KO par CRISPR-Cas9, déjà utilisée au laboratoire, pourrait être envisagé pour créer de nouveaux mutants. *MIR2936*, par exemple, impliqué dans le contrôle de l'expression de gènes impliqués dans la biosynthèse des parois végétales est un miARN qu'il pourrait être pertinent d'étudier en priorité. Un mutant KO, développé dans le fond génétique Col-0, altéré dans l'expression de *MIR2636* présenterait une surexpression des gènes impliqués dans la voie de biosynthèse des parois végétales et ceci pourrait potentiellement amener à une diminution de symptômes et donc à une résistance accrue à la hernie par rapport à l'écotype Col-0.

Nous avons également identifié plus de 382 gènes ciblés par les 14 familles de miARN lors de l'infection par *P. brassicae*. Plusieurs approches pourraient permettre de valider les cibles des miARN et leur rôle dans la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie. Il est envisageable d'une part d'étudier et de comparer par RT-qPCR l'expression de ces gènes cibles, identifiés grâce à psRNATarget, dans les mutants KO ou sur-expressseurs du miARN et dans les écotypes Col-0 et Bur-0, avec et sans infection par la hernie. Chez les écotypes Col-0, sensible et Bur-0, partiellement résistant, un échantillonnage des racines inoculées par l'isolat eH de *P. brassicae* et non inoculées 14 jours après infection (ou 24 jours après semis pour les plantes non inoculées) pourra permettre de réaliser un séquençage du dégradome. Lorsque les miARN clivent leurs cibles, le fragment possédant la queue poly-A présente à son extrémité 5' un groupe phosphate. Lors de l'analyse du dégradome ou PARE (Parallel Analyses of RNA ends), ces fragments sont fixés à une sonde, amplifiés puis séquencés. Cette méthode pourrait ainsi nous permettre d'identifier des ARN messagers cibles que nous n'avons pas identifiés *in silico* dans nos données transcriptomiques.

En outre, si les miARN sont souvent étudiés dans la réponse des plantes aux stress biotiques et abiotiques, peu d'études ont été conduites sur leur implication dans la réponse des plantes à un stress biotique sous contraintes abiotiques. Une de ces rares études s'intéresse à l'impact des conditions abiotiques sur les miARN impliqués dans la réponse du melon au champignon *Monosporascus cannonballus* (Villalba-Bermell *et al.*, 2021). Les auteurs ont ainsi étudié l'effet d'une baisse de la température, de la salinité et de jours courts sur la réponse de la plante à l'agent pathogène et ont pu identifier 22 miARN différentiellement régulés sous deux ou trois stress combinés. 60% de ces miARN ne présentaient pas de réponse d'expression additive, c'est-à-dire que le niveau d'expression de ces miARN dans les conditions de contraintes combinées n'est pas égal à la somme des niveaux d'expression des miARN lors de l'application des contraintes appliquées seules suggérant ainsi que la réponse du melon à des stress combinés ne peut pas être prédite par sa réponse à un stress individuel. Cinq familles de miARN détectées dans notre étude ont également été identifiées lors des travaux sur la réponse du melon à une combinaison de stress dont *MIR156*, *MIR165/166*, *MIR164*, *MIR319* et *MIR396*. Étudier l'impact des conditions abiotiques sur les miARN impliqués dans le pathosystème *Arabidopsis - P. brassicae* pourrait conduire à l'identification de mécanismes de réponse conservés entre les stress ou spécifiques d'un stress ou d'une combinaison de stress et nous apporter une meilleure compréhension de la réponse des plantes à la hernie sous contraintes environnementales. Cette étude pourrait être réalisée dans les différentes conditions de culture mises en place durant ma thèse (HEAT, DROUGHT, FLOOD, HEAT x DROUGHT, HEAT x FLOOD) sur les génotypes Col-0 et Bur-0 infectées par l'isolat eH (i) de manière ciblée sur les miRNA précédemment identifiés en conditions standard et validés fonctionnellement par génétique inverse ou (ii) sans à priori par le séquençage des miARN de racines, cette dernière approche ouvrant la possibilité d'identifier de nouveaux miARN non identifiés durant ma thèse.

5. Interactions entre les mécanismes épigénétiques dont la méthylation de l'ADN et les miRNA

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons étudié l'implication de deux mécanismes épigénétiques dans la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie : la méthylation de l'ADN et les miARN. Ces deux mécanismes, que nous avons étudiés de manière indépendante, sont pourtant liés. Nous avons par exemple observé la présence de gènes codant des miARN dans l'intervalle de confiance de certains QTL^{epi}. En effet, dans l'intervalle de confiance du QTL^{epi} GALA-Flood-Ch5 de 11.33 Mb (1910 gènes), nous avons identifié 32 gènes *MIR* codant des miARN, dont 4

(miR166e, miR319b, miR396b et miR869) ont été identifiés dans notre étude dans la réponse à la hernie chez *Arabidopsis* en conditions classiques de culture. Phénotyper la réponse vis-à-vis de la hernie des mutants KO et de lignées à fusion transcriptionnelle de ces miARN et étudier leur cinétique d'expression lors de l'infection par l'isolat eH sous différentes conditions abiotiques permettraient d'évaluer leur rôle dans les réponses de résistance ou de sensibilité. Par ailleurs, chez *B. oleracea*, l'application d'un stress thermique lors de l'embryogénèse a entraîné la dérégulation de trente et un gènes impliqués notamment dans des voies de défense comme la production de ROS ou la signalisation dépendante de l'ABA *via* des modifications de méthylation et leur ciblage par des miARN (Kong *et al.*, 2022). De telles interactions ont également été montrées lors de l'infection du soja par le nématode à kystes *H. glycines*, durant laquelle la méthylation de l'ADN au niveau des promoteurs de miARN contrôle leur expression (Rambani *et al.*, 2020). Chez le riz, Wu *et al.* (2010) ont montré que des long miARN (lmiARN) de 24 nt et AGO4, étaient impliqués dans la méthylation de gènes cibles. L'interaction entre la méthylation de l'ADN et l'expression des miARN a également été démontrée chez l'homme (Glaich *et al.*, 2019; Fuso *et al.*, 2020), notamment lors du développement de cancers du sein (Aure *et al.*, 2021), durant lequel une boucle de régulation semble exister entre des miARN et la méthylation de l'ADN. En effet, la méthylation de l'ADN au niveau des régions promotrices de miARN régule leur expression et certains miARN, dont hsa-miR-29c-5 répriment l'expression de la DNA methyltransferase 3 (DNMT3A), conduisant à l'hypométhylation de gènes impliqués dans le développement du cancer.

En plus de la méthylation de l'ADN et des miARN, d'autres mécanismes épigénétiques pourraient potentiellement contrôler la réponse d'*A. thaliana* à la hernie. L'expression d'une région est en général le résultat de la combinaison de différents mécanismes épigénétiques (Roudier *et al.*, 2011; Sequeira-Mendes *et al.*, 2014). Par exemple, la vernalisation est un processus bien caractérisé au niveau épigénétique et correspond à une induction de la floraison par l'application de températures basses *via* la répression du locus *FLOWERING LOCUS C (FLC)* (Groszmann *et al.*, 2011; Kim & Sung, 2014). La répression du locus FLC est médiée notamment par la présence du variant d'histone H2A.Z (Deal *et al.*, 2007) et de la marque histone répressive H3K27me3 (histone 3 lysine 27 triméthylation) (Gendall *et al.*, 2001; Bastow *et al.*, 2004; Sung & Amasino, 2004; De Lucia *et al.*, 2008) dont la mise en place est elle-même contrôlée par des ARN non codants, dont le LNC COLDAIR (Heo & Sung, 2011) et des miARN, tel que miR396 (Yuan *et al.*, 2020).

Il serait ainsi restrictif d'étudier seulement la méthylation de l'ADN et les miARN dans l'interaction *Arabidopsis* - *P. brassicae*. Deux éléments suggèrent d'ailleurs que d'autres mécanismes épigénétiques sont impliqués dans cette interaction. 1) Par ailleurs, le long ARN non codant (*AT5G06965*) situé à 6kb en amont des gènes *AT5G47260* et *AT5G47280* du QTL *Pb-At 5.2* contrôlé par une épimutation pourrait être impliqué dans le niveau de méthylation de cette région. En effet, une analyse d'association pangénomique (GWAS) réalisée sur 287 accessions d'*A. thaliana* a conduit, au sein du laboratoire, à l'identification de 3 variants nucléotidiques (A à G, G à A, A à C dans Col-0 et Bur-0 respectivement) présents dans le lncARN *AT5G06965* et significativement associés au niveau de méthylation des gènes *AT5G47260* et *AT5G47280* (données non publiées, M. Jubault). La création de mutants à travers une approche de CRISPR-cas9 pour altérer l'expression de *AT5G06965* ou de CRISPR-dead-cas9 couplée à une adénosine désaminase permettant la modification d'une adénosine en une guanine (A à G) permettrait de valider (ou non) le rôle de ce lncARN dans la méthylation de *AT5G47260* et *AT5G47280*. 2) L'étude du QTL *Pb-At 5.2* au laboratoire a permis de mettre en évidence une accumulation des petits ARN interférents (siARN) au niveau des gènes *AT5G47260* et *AT5G47280* chez Col-0 et non chez Bur-0.

Des données de séquençage après traitement au bisulfite (méthylome) et des petits ARN interférents obtenus chez Col-0 et Bur-0 à 7 et 14 jours après l'infection en conditions de culture STANDARD sont disponibles au laboratoire et leur analyse pourrait permettre d'identifier si 1) l'infection par *P. brassicae* impacte le niveau de méthylation de certaines régions du génome dans ces écotypes, 2) si ces régions différenciellement méthylées sont ciblées par des siARN, 3) si les gènes et les miARN identifiés comme étant impliqués dans la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie durant ma thèse, colocalisent avec ces régions différenciellement méthylées et les clusters de siARN. Enfin, afin de déterminer si d'autres mécanismes épigénétiques sont impliqués dans la réponse d'*A. thaliana* à *P. brassicae*, il serait possible d'étudier le phénotype de mutants altérés dans la mise en place de modifications d'histones, dans la production d'ARN interférant ou d'autres mécanismes épigénétiques.

6. Transférabilité des résultats aux cultures d'intérêt agronomique

Des variations épigénétiques impliquées dans le contrôle de traits complexes ont également été identifiées chez des espèces d'intérêt agronomique. Des populations cumulant des variations génétiques et épigénétiques ont été développées et exploitées chez le sorgho, le colza, le peuplier ou le manioc (Duan *et al.*, 2009; Long *et al.*, 2011; Zou *et al.*, 2017; Lu *et al.*, 2020). Chez le sorgho, Duan *et al.* (2009) ont construit une carte regroupant 29 marqueurs génétiques et 122 régions différentiellement méthylées permettant l'utilisation combinée de marqueurs génétiques et épigénétiques dans l'identification des régions génomiques contrôlant des traits complexes. Chez le colza, Long *et al.* (2011) ont généré une carte épigénétique (E-map) sur la population *B. napus* TNDH et l'ont combinée à la carte génétique préexistante (G-map) (Qiu *et al.*, 2006) pour constituer une carte combinant cartes génétiques et épigénétiques (I-map). Pour la construction de la carte épigénétique, ces auteurs ont identifié 627 DMR entre les parents dont 86% étaient stables à deux stades de développement, mais seuls quatre-vingt-dix-sept marqueurs épigénétiques restent stables durant cinq méioses. L'utilisation de ces cartes a mené à l'identification de 125 QTL^{epi} et 148 QTL, contrôlant des traits d'intérêt agronomique tels que le rendement, la croissance de la plante ou le temps de floraison (Long *et al.*, 2011). Sur une population F2 de manioc, 1482 DMR ont été identifiées (Zou *et al.*, 2017) et ont permis la détection de 318 QTL^{epi} associés à la tolérance au froid et 524 QTL^{epi} associés au rendement. Chez le peuplier, une carte épigénétique constituée de 2 818 DMR réparties sur 19 groupes de liaison a été réalisée sur une population en ségrégation (Lu *et al.*, 2020). Cette carte épigénétique a été utilisée pour détecter 163 QTL^{epi} impliquant 1043 DMR et expliquant de 1.7 à 44.5% de la variabilité observée pour des traits phénotypiques liés à la croissance et à des propriétés du bois. Des eWAS (*epigenome wide association studies*) ont été réalisées sur des populations naturelles d'arbres à l'aide d'épimarqueurs MSAP et ont permis l'identification d'épiallèles associés aux gradients climatiques chez le chêne blanc de Californie (Gugger *et al.*, 2016; Can *et al.*, 2021), ou chez le palmier à huile, l'identification d'une épimutation régulant le transposon *Karma* associée au variant somaclonal Mantled (Ong-Abdullah *et al.*, 2015).

Au sein du laboratoire, des études génétiques ont conduit à l'identification de régions génomiques contrôlant la résistance de *B. oleracea* et *B. napus* à l'infection par l'isolat eH, c'est à dire le même isolat que nous avons étudié ici (Rocherieux *et al.*, 2004; Laperche *et al.*, 2017; Aigu *et al.*, 2018). Afin d'évaluer si les QTL déjà identifiés au sein du laboratoire sont contrôlés par une épimutation, nous pourrions mettre en œuvre une approche de traitement au bisulfite et séquençage. Certains QTL sont particulièrement intéressants, dont, par exemple les QTL *Pb-Bo1* et *Pb-Bo2* identifiés et conférant une résistance à plusieurs isolats chez *B. oleracea* (Rocherieux *et al.*, 2004) ou le QTL localisé sur le chromosome C09 de *B. napus*, dont l'effet est modulé en fonction de la nutrition azotée (Laperche *et al.*, 2017). La disponibilité de séquences génomiques et de méthylome chez certaines *Brassica* dont *B. napus* (Bayer *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018; Rousseau-Gueutin *et al.*, 2020; Zhang *et al.*, 2021) et *B. oleracea* (Salmon *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2019), devraient permettre la réalisation d'études d'orthologie entre les *Brassicaceae* pour les régions d'intérêt identifiées pendant ma thèse et d'estimer la variabilité épigénétique existante à ces loci chez les *Brassica*.

Nous avons identifié des miARN conservés entre la réponse d'*A. thaliana* à *P. brassicae* et la réponse des *Brassica* à la hernie, notamment *MIR156*, *MIR164*, *MIR165/166*, *MIR169*, *MIR159* et *MIR396*. Des études comparatives rapportent aussi de la conservation entre *Brassicaceae* des formes matures de miR164 ainsi que de certains précurseur tels que pré-miR157a (Jain & Das, 2016; Rajpal *et al.*, 2022). Ainsi, l'identification de miARN dérégulés dans la réponse d'*A. thaliana* à la hernie et leur validation fonctionnelle chez la plante modèle *Arabidopsis* pourrait potentiellement permettre l'identification de nouveaux mécanismes de résistance et/ou de sensibilité impliqués dans l'interaction *Brassica* - hernie des crucifères. Toutefois, la validation fonctionnelle des miARN conservés chez *B. napus* nécessitera l'extinction par CRISPR-Cas9 des multiples copies du gène précurseur du miRNA qui peuvent exister dans les génomes polyploïdes comme celui de *B. napus*.

S'il pourrait être envisageable d'intégrer le polymorphisme épigénétique dans les schémas de sélection, des questions demeurent quant à l'héritabilité sur plusieurs générations de ces épimutations et sur leur stabilité sous différentes conditions abiotiques. Cependant, au vu des résultats obtenus chez *A. thaliana* et si l'étendue de la variabilité épigénétique est conservée entre les espèces, il pourrait potentiellement être envisageable d'exploiter cette source de polymorphisme pour créer des variétés adaptées et adaptables aux fluctuations de l'environnement biotique et abiotique entraînées par le changement climatique.

En conclusion, les résultats obtenus dans le cadre de ma thèse démontrent que des contraintes thermique et hydrique modifient l'architecture épigénétique (détection, localisation et effet des QTL^{epi}) contrôlant la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à la hernie. Par ailleurs, notre étude a permis d'identifier plusieurs familles de miARN qui jouent un rôle central dans cette réponse. Des travaux complémentaires sont en cours pour établir d'un côté quels sont les mécanismes expliquant la modulation de certains facteurs épigénétiques et d'un autre côté le rôle fonctionnel des cibles des miRNA. Enfin ce travail apporte des éléments nouveaux sur la variabilité épigénétique potentiellement utilisable pour la construction de variétés résistantes dans des environnements contraints.

Bibliographie

Bibliographie

- Achrem M, Stępień E, Kalinka A** (2023) Epigenetic Changes Occurring in Plant Inbreeding. *International Journal of Molecular Sciences* **24**: 5407
- Achuo EA, Prinsen E, Hofte 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
- Ackah M, Guo L, Li S, Jin X, Asakiya C, Aboagye ET, Yuan F, Wu M, Essoh LG, Adjibolosoo D, et al** (2022) DNA Methylation Changes and Its Associated Genes in Mulberry (*Morus alba* L.) Yu-711 Response to Drought Stress Using MethylRAD Sequencing. *Plants* **11**: 190
- Afgan E, Baker D, Batut B, van den Beek M, Bouvier D, Čech M, Chilton J, Clements D, Coraor N, Grüning BA, et al** (2018) The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2018 update. *Nucleic Acids Research* **46**: W537–W544
- Agarwal A, Kaul V, Faggian R, Rookes JE, Ludwig-Müller J, Cahill DM** (2011) Analysis of global host gene expression during the primary phase of the *Arabidopsis thaliana*–*Plasmodiophora brassicae* interaction. *Functional Plant Biol* **38**: 462
- Agius F, Kapoor A, Zhu J-K** (2006) Role of the *Arabidopsis* DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11796–11801
- Ahmad F, Farman K, Waseem M, Rana RM, Nawaz MA, Rehman HM, Abbas T, Baloch FS, Akrem A, Huang J, et al** (2019) Genome-wide identification, classification, expression profiling and DNA methylation (5mC) analysis of stress-responsive ZFP transcription factors in rice (*Oryza sativa* L.). *Gene* **718**: 144018
- Ahmed I, Sarazin A, Bowler C, Colot V, Quesneville H** (2011) Genome-wide evidence for local DNA methylation spreading from small RNA-targeted sequences in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res* **39**: 6919–6931
- Aida M, Beis D, Heidstra R, Willemssen V, Blilou I, Galinha C, Nussaume L, Noh Y-S, Amasino R, Scheres B** (2004) The PLETHORA Genes Mediate Patterning of the *Arabidopsis* Root Stem Cell Niche. *Cell* **119**: 109–120
- Aigu Y, Daval S, Gazengel K, Marnet N, Lariagon C, Laperche A, Legeai F, Manzanares-Dauleux MJ, Gravot A** (2022) Multi-Omic Investigation of Low-Nitrogen Conditional Resistance to Clubroot Reveals *Brassica napus* Genes Involved in Nitrate Assimilation. *Front Plant Sci* **13**: 790563
- Aigu Y, Laperche A, Mendes J, Lariagon C, Guichard S, Gravot A, Manzanares-Dauleux MJ** (2018) Nitrogen supply exerts a major/minor switch between two QTLs controlling *Plasmodiophora brassicae* spore content in rapeseed. *Plant Pathol* **67**: 1574–1581

- Aist JR, Williams PH** (1971) The cytology and kinetics of cabbage root hair penetration by *Plasmodiophora brassicae*. *Can J Bot* **49**: 2023–2034
- Akimoto K, Katakami H, Kim H-J, Ogawa E, Sano CM, Wada Y, Sano H** (2007) Epigenetic Inheritance in Rice Plants. *Annals of Botany* **100**: 205–217
- Akman M, Kleine R, van Tienderen PH, Schranz EM** (2017) Identification of the Submergence Tolerance QTL Come Quick Drowning1 (CQD1) in *Arabidopsis thaliana*. *J Hered* **108**: 308–317
- Alix K, Lariagon C, Delourme R, Manzanares-Dauleux MJ** (2007) Exploiting natural genetic diversity and mutant resources of *Arabidopsis thaliana* to study the *A. thaliana*?*Plasmodiophora brassicae* interaction. *Plant Breeding* **126**: 218–221
- Aller EST, Jagd LM, Kliebenstein DJ, Burow M** (2018) Comparison of the Relative Potential for Epigenetic and Genetic Variation To Contribute to Trait Stability. *G3 Genes|Genomes|Genetics* **8**: 1733–1746
- de Almeida Engler J, Gheysen G** (2013) Nematode-Induced Endoreduplication in Plant Host Cells: Why and How? *MPMI* **26**: 17–24
- Alves-Carvalho S, Gazengel K, Bretaudeau A, Robin S, Daval S, Legeai F** (2021) Askor, A R Package for Easy RNASeq Data Analysis. *Proceedings of The 1st International Electronic Conference on Entomology*. MDPI, Sciforum.net, p 10646
- Andolfo G, Ercolano MR** (2015) Plant Innate Immunity Multicomponent Model. *Frontiers in Plant Science* **6**:
- Aoun N, Tauleigne L, Lonjon F, Deslandes L, Vaillau F, Roux F, Berthomé R** (2017) Quantitative Disease Resistance under Elevated Temperature: Genetic Basis of New Resistance Mechanisms to *Ralstonia solanacearum*. *Front Plant Sci* **8**: 1387
- Arends D, Prins P, Jansen RC, Broman KW** (2010) R/qtl: high-throughput multiple QTL mapping: Fig. 1. *Bioinformatics* **26**: 2990–2992
- Arıkan B, Özden S, Turgut-Kara N** (2018) DNA methylation related gene expression and morphophysiological response to abiotic stresses in *Arabidopsis thaliana*. *Environmental and Experimental Botany* **149**: 17–26
- Arjmand MP, Lahiji HS, Golfazani MM, Biglouei MH** (2023) New insights on the regulatory network of drought-responsive key genes in *Arabidopsis thaliana*. *Genetica* **151**: 29–45
- Aslam M, Sugita K, Qin Y, Rahman A** (2020) Aux/IAA14 Regulates microRNA-Mediated Cold Stress Response in *Arabidopsis* Roots. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 8441
- Ávila Méndez K, Romero HM** (2017) Plant responses to pathogen attack: molecular basis of qualitative resistance. *Rev Fac Nac Agron* **70**: 8225–8235
- Awbery JH, Griffiths E** (1932) The basic law of the wet-and-dry-bulb hygrometer at temperatures from 40 to 100 C. *Proc Phys Soc* **44**: 132–142

- Bac-Molenaar JA, Granier C, Keurentjes JJB, Vreugdenhil D** (2016) Genome-wide association mapping of time-dependent growth responses to moderate drought stress in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment* **39**: 88–102
- Badet T, Voisin D, Mbengue M, Barascud M, Sucher J, Sadon P, Balagué C, Roby D, Raffaele S** (2017) Parallel evolution of the POQR prolyl oligo peptidase gene conferring plant quantitative disease resistance. *PLoS Genet* **13**: e1007143
- Baker B, Zambryski P, Staskawicz B, Dinesh-Kumar SP** (1997) Signaling in Plant-Microbe Interactions. *Science* **276**: 726–733
- Baker CC, Sieber P, Wellmer F, Meyerowitz EM** (2005) The early extra petals1 Mutant Uncovers a Role for MicroRNA miR164c in Regulating Petal Number in *Arabidopsis*. *Current Biology* **15**: 303–315
- Barah P, B N MN, Jayavelu ND, Sowdhamini R, Shameer K, Bones AM** (2016) Transcriptional regulatory networks in *Arabidopsis thaliana* during single and combined stresses. *Nucleic Acids Research* **44**: 3147–3164
- Barbetti MJ, Banga SS, Salisbury PA** (2012) Challenges for crop production and management from pathogen biodiversity and diseases under current and future climate scenarios – Case study with oilseed Brassicas. *Field Crops Research* **127**: 225–240
- Barragan AC, Weigel D** (2021) Plant NLR diversity: the known unknowns of pan-NLRomes. *The Plant Cell* **33**: 814–831
- Barrera-Rojas CH, Rocha GHB, Polverari L, Pinheiro Brito DA, Batista DS, Notini MM, da Cruz ACF, Morea EGO, Sabatini S, Otoni WC, et al** (2020) miR156-targeted SPL10 controls *Arabidopsis* root meristem activity and root-derived de novo shoot regeneration via cytokinin responses. *Journal of Experimental Botany* **71**: 934–950
- Bartels A, Han Q, Nair P, Stacey L, Gaynier H, Mosley M, Huang QQ, Pearson JK, Hsieh T-F, An Y-QC, et al** (2018) Dynamic DNA Methylation in Plant Growth and Development. *Int J Mol Sci* **19**: 2144
- Bastedo DP, Khan M, Martel A, Seto D, Kireeva I, Zhang J, Masud W, Millar D, Lee JY, Lee AH-Y, et al** (2019) Perturbations of the ZED1 pseudokinase activate plant immunity. *PLOS Pathogens* **15**: e1007900
- Batool M, El-Badri AM, Hassan MU, Haiyun Y, Chunyun W, Zhenkun Y, Jie K, Wang B, Zhou G** (2023) Drought Stress in *Brassica napus*: Effects, Tolerance Mechanisms, and Management Strategies. *J Plant Growth Regul* **42**: 21–45
- Becker C, Hagemann J, Müller J, Koenig D, Stegle O, Borgwardt K, Weigel D** (2011) Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature* **480**: 245–249
- Ben-Gera H, Dafna A, Alvarez JP, Bar M, Mauerer M, Ori N** (2016) Auxin-mediated lamina growth in tomato leaves is restricted by two parallel mechanisms. *The Plant Journal* **86**: 443–457

- Bennett M, Cleaves K, Hewezi T** (2021) Expression Patterns of DNA Methylation and Demethylation Genes during Plant Development and in Response to Phytohormones. *International Journal of Molecular Sciences* **22**: 9681
- Bewick AJ, Schmitz RJ** (2017) Gene body DNA methylation in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **36**: 103–110
- Bhadra P, Maitra S, Shankar T, Hossain A, Praharaj S, Aftab T** (2022) Climate change impact on plants: Plant responses and adaptations. *Plant Perspectives to Global Climate Changes*. Elsevier, pp 1–24
- Bi G, Zhou Z, Wang W, Li L, Rao S, Wu Y, Zhang X, Menke FLH, Chen S, Zhou J-M** (2018) Receptor-Like Cytoplasmic Kinases Directly Link Diverse Pattern Recognition Receptors to the Activation of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascades in Arabidopsis. *The Plant Cell* **30**: 1543–1561
- Bi H, Kovalchuk N, Langridge P, Tricker PJ, Lopato S, Borisjuk N** (2017) The impact of drought on wheat leaf cuticle properties. *BMC Plant Biol* **17**: 85
- Bi K, He Z, Gao Z, Zhao Y, Fu Y, Cheng J, Xie J, Jiang D, Chen T** (2016) Integrated omics study of lipid droplets from *Plasmodiophora brassicae*. *Sci Rep* **6**: 36965
- Bidzinski P, Ballini E, Ducasse A, Michel C, Zuluaga P, Genga A, Chiozzotto R, Morel J-B** (2016) Transcriptional Basis of Drought-Induced Susceptibility to the Rice Blast Fungus *Magnaporthe oryzae*. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2016.01558
- Bineau E, Diouf I, Carretero Y, Duboscq R, Bitton F, Djari A, Zouine M, Causse M** (2021) Genetic diversity of tomato response to heat stress at the QTL and transcriptome levels. *The Plant Journal* **107**: 1213–1227
- Bird KA, Niederhuth CE, Ou S, Gehan M, Pires JC, Xiong Z, VanBuren R, Edger PP** (2021) Replaying the evolutionary tape to investigate subgenome dominance in allopolyploid *Brassica napus*. *New Phytol* **230**: 354–371
- Bollman KM, Aukerman MJ, Park M-Y, Hunter C, Berardini TZ, Poethig RS** (2003) HASTY, the Arabidopsis ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* **130**: 1493–1504
- Bologna NG, Voinnet O** (2014) The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Annual Review of Plant Biology* **65**: 473–503
- Botero-Ramirez A, Hwang S-F, Strelkov SE** (2021) *Plasmodiophora brassicae* Inoculum Density and Spatial Patterns at the Field Level and Relation to Soil Characteristics. *Pathogens* **10**: 499
- Boutrot F, Zipfel C** (2017) Function, Discovery, and Exploitation of Plant Pattern Recognition Receptors for Broad-Spectrum Disease Resistance. *Annu Rev Phytopathol* **55**: 257–286
- Bouyer D, Kramdi A, Kassam M, Heese M, Schnittger A, Roudier F, Colot V** (2017) DNA methylation dynamics during early plant life. *Genome Biology* **18**: 179

- Boyes DC, Zayed AM, Ascenzi R, McCaskill AJ, Hoffman NE, Davis KR, Görlach J** (2001) Growth Stage–Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. 12
- Bradshaw AD** (1965) Evolutionary Significance of Phenotypic Plasticity in Plants. *Advances in Genetics*. Elsevier, pp 115–155
- Bras YL, Bretaudeau A, Sallou O, Collin O** (2013) Towards a Life Sciences Virtual Research Environment.
- Bratch J, HUNTER S, EACHUS R, WEEKS P, PASQUINELLI AE** (2004) Trans-splicing and polyadenylation of let-7 microRNA primary transcripts. *RNA* **10**: 1586–1594
- Brodmann D, Schuller A, Ludwig-Müller J, Aeschbacher RA, Wiemken A, Boller T, Wingler A** (2002) Induction of Trehalase in *Arabidopsis* Plants Infected With the Trehalose-Producing Pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *MPMI* **15**: 693–700
- Broman KW, Wu H, Sen S, Churchill GA** (2003) R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* **19**: 889–890
- Buczacki ST, Toxopeus H, Mattusch P, Johnston TD, Dixon GR, Hobolth LA** (1975) Study of physiologic specialization in *Plasmodiophora brassicae*: Proposals for attempted rationalization through an international approach. *Transactions of the British Mycological Society* **65**: 295–303
- Budak H, Akpinar BA** (2015) Plant miRNAs: biogenesis, organization and origins. *Funct Integr Genomics* **15**: 523–531
- Burton NO, Greer EL** (2022) Multigenerational epigenetic inheritance: Transmitting information across generations. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **127**: 121–132
- Cabrera J, Barcala M, García A, Rio-Machín A, Medina C, Jaubert-Possamai S, Favery B, Maizel A, Ruiz-Ferrer V, Fenoll C, et al** (2016a) Differentially expressed small RNAs in *Arabidopsis* galls formed by *Meloidogyne javanica*: a functional role for miR390 and its TAS3-derived tasiRNAs. *New Phytologist* **209**: 1625–1640
- Cabrera J, Barcala M, García A, Rio-Machín A, Medina C, Jaubert-Possamai S, Favery B, Maizel A, Ruiz-Ferrer V, Fenoll C, et al** (2016b) Differentially expressed small RNAs in *Arabidopsis* galls formed by *Meloidogyne javanica*: a functional role for miR390 and its TAS 3-derived tasi RNAs. *New Phytol* **209**: 1625–1640
- Cai C, Li C, Sun R, Zhang B, Nichols RL, Hake KD, Pan X** (2021) Small RNA and degradome deep sequencing reveals important roles of microRNAs in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) response to root-knot nematode *Meloidogyne incognita* infection. *Genomics* **113**: 1146–1156
- Cai Z, Xiang M, Tan J, Cheng C, Liu Y, Shi J, Shi M, Li J, Wang D** (2023) High-throughput sequencing reveals tuber mustard genes responsive to *Plasmodiophora brassicae* in the early stage of infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **123**: 101943

- Calarco JP, Borges F, Donoghue MTA, Van Ex F, Jullien PE, Lopes T, Gardner R, Berger F, Feijó JA, Becker JD, et al** (2012) Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell* **151**: 194–205
- Carlsbecker A, Lee J-Y, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, Zhou J, Lindgren O, Moreno-Risueno MA, Vatén A, Thitamadee S, et al** (2010) Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* **465**: 316–321
- Cavanagh AP, Slattery R, Kubien DS** (2023) Temperature-induced changes in Arabidopsis Rubisco activity and isoform expression. *Journal of Experimental Botany* **74**: 651–663
- Ce F, Mei J, He H, Zhao Y, Hu W, Yu F, Li Q, Ren X, Si J, Song H, et al** (2021) Identification of Candidate Genes for Clubroot-Resistance in Brassica oleracea Using Quantitative Trait Loci-Sequencing. *Frontiers in Plant Science* **12**:
- Černý M, Jedelský PL, Novák J, Schlosser A, Brzobohatý B** (2014) Cytokinin modulates proteomic, transcriptomic and growth responses to temperature shocks in Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment* **37**: 1641–1655
- Chakraborty S** (2013) Migrate or evolve: options for plant pathogens under climate change. *Global Change Biology* **19**: 1985–2000
- Chaloner TM, Gurr SJ, Bebber DP** (2021) Plant pathogen infection risk tracks global crop yields under climate change. *Nat Clim Chang* **11**: 710–715
- Chand SK, Nanda S, Mishra R, Joshi RK** (2017) Multiple garlic (*Allium sativum* L.) microRNAs regulate the immunity against the basal rot fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cepae*. *Plant Science* **257**: 9–21
- Chang A, Lamara M, Wei Y, Hu H, Parkin IAP, Gossen BD, Peng G, Yu F** (2019) Clubroot resistance gene *Rcr6* in *Brassica nigra* resides in a genomic region homologous to chromosome A08 in *B. rapa*. *BMC Plant Biology* **19**: 224
- Chao H, Hu Y, Zhao L, Xin S, Ni Q, Zhang P, Chen M** (2022) Biogenesis, Functions, Interactions, and Resources of Non-Coding RNAs in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* **23**: 3695
- Che P, Lall S, Nettleton D, Howell SH** (2006) Gene Expression Programs during Shoot, Root, and Callus Development in Arabidopsis Tissue Culture. *Plant Physiology* **141**: 620–637
- Chen D-H, Huang Y, Jiang C, Si J-P** (2018) Chromatin-Based Regulation of Plant Root Development. *Front Plant Sci* **9**: 1509
- Chen G, Zhang B, Ding J, Wang H, Deng C, Wang J, Yang Q, Pi Q, Zhang R, Zhai H, et al** (2022) Cloning southern corn rust resistant gene *RppK* and its cognate gene *AvrRppK* from *Puccinia polysora*. *Nat Commun* **13**: 4392
- Chen L, Zhang L, Xiang S, Chen Y, Zhang H, Yu D** (2021) The transcription factor WRKY75 positively regulates jasmonate-mediated plant defense to necrotrophic fungal pathogens. *Journal of Experimental Botany* **72**: 1473–1489

- Chen Q, Huang X, Chen X, Shamsunnaher, Song W-Y** (2019a) Reversible activation of XA21-mediated resistance by temperature. *Eur J Plant Pathol* **153**: 1177–1184
- Chen W, Li Y, Yan R, Xu L, Ren L, Liu F, Zeng L, Yang H, Chi P, Wang X, et al** (2019b) Identification and Characterization of *Plasmodiophora brassicae* Primary Infection Effector Candidates that Suppress or Induce Cell Death in Host and Nonhost Plants. *Phytopathology*® **109**: 1689–1697
- Chen W, Li Y, Yan R, Xu L, Ren L, Liu F, Zeng L, Yang H, Chi P, Wang X, et al** (2019c) Identification and Characterization of *Plasmodiophora brassicae* Primary Infection Effector Candidates that Suppress or Induce Cell Death in Host and Nonhost Plants. *Phytopathology*® **109**: 1689–1697
- Chinchilla D, Zipfel C, Robatzek S, Kemmerling B, Nürnberger T, Jones JDG, Felix G, Boller T** (2007) A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**: 497–500
- Cho KH, Park SH, Kim KT, Kim S, Kim JS, Park BS, Woo JG, Lee HJ** (2012) Mapping quantitative trait loci (QTL) for clubroot resistance in *Brassica rapa* L. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* **87**: 325–333
- Choi Y, Gehring M, Johnson L, Hannon M, Harada JJ, Goldberg RB, Jacobsen SE, Fischer RL** (2002) DEMETER, a DNA Glycosylase Domain Protein, Is Required for Endosperm Gene Imprinting and Seed Viability in Arabidopsis. *Cell* **110**: 33–42
- Choudhary A, Senthil-Kumar M** (2022) Drought attenuates plant defence against bacterial pathogens by suppressing the expression of CBP60g/SARD1 during combined stress. *Plant, Cell & Environment* **45**: 1127–1145
- Chung C-L, Longfellow JM, Walsh EK, Kerdieh Z, Van Esbroeck G, Balint-Kurti P, Nelson RJ** (2010) Resistance loci affecting distinct stages of fungal pathogenesis: use of introgression lines for QTL mapping and characterization in the maize - *Setosphaeria turcica* pathosystem. *BMC Plant Biology* **10**: 103
- Clapham DE** (2007) Calcium Signaling. *Cell* **131**: 1047–1058
- Clauw P, Coppens F, De Beuf K, Dhondt S, Van Daele T, Maleux K, Storme V, Clement L, Gonzalez N, Inzé D** (2015) Leaf Responses to Mild Drought Stress in Natural Variants of Arabidopsis. *Plant Physiology* **167**: 800–816
- Coelho RR, Vieira P, Antonino de Souza Júnior JD, Martin-Jimenez C, De Veylder L, Cazareth J, Engler G, Grossi-de-Sa MF, de Almeida Engler J** (2017) Exploiting cell cycle inhibitor genes of the KRP family to control root-knot nematode induced feeding sites in plants. *Plant, Cell & Environment* **40**: 1174–1188
- Cokus S, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild C, Pradhan S, Nelson S, Pellegrini M, Jacobsen S** (2008) Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**: 215–219. *Nature* **452**: 215–9

- Cole SJ, Diener AC** (2013) Diversity in receptor-like kinase genes is a major determinant of quantitative resistance to *Fusarium oxysporum* f.sp. *matthioli*. *New Phytologist* **200**: 172–184
- Collier SM, Hamel L-P, Moffett P** (2011) Cell Death Mediated by the N-Terminal Domains of a Unique and Highly Conserved Class of NB-LRR Protein. *MPMI* **24**: 918–931
- Colome-Tatche M, Cortijo S, Wardenaar R, Morgado L, Lahouze B, Sarazin A, Etcheverry M, Martin A, Feng S, Duvernois-Berthet E, et al** (2012) Features of the Arabidopsis recombination landscape resulting from the combined loss of sequence variation and DNA methylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: 16240–16245
- Compere SJ, Palmiter RD** (1981) DNA methylation controls the inducibility of the mouse metallothionein-I gene in lymphoid cells. *Cell* **25**: 233–240
- Cook DE, Mesarich CH, Thomma BPHJ** (2015) Understanding Plant Immunity as a Surveillance System to Detect Invasion. *Annu Rev Phytopathol* **53**: 541–563
- Cortijo S** (2012) Etude des variations épigénétiques liées aux séquences répétées comme source de changements phénotypiques héréditaires chez *Arabidopsis thaliana*.
- Cortijo S, Wardenaar R, Colome-Tatche M, Gilly A, Etcheverry M, Labadie K, Caillieux E, Hospital F, Aury J-M, Wincker P, et al** (2014a) Mapping the Epigenetic Basis of Complex Traits. *Science* **343**: 1145–1148
- Cortijo S, Wardenaar R, Colomé-Tatché M, Johannes F, Colot V** (2014b) Genome-Wide Analysis of DNA Methylation in Arabidopsis Using MeDIP-Chip. *In* C Spillane, PC McKeown, eds, *Plant Epigenetics and Epigenomics: Methods and Protocols*. Humana Press, Totowa, NJ, pp 125–149
- da Costa CT, Offringa R, Fett-Neto AG** (2020) The role of auxin transporters and receptors in adventitious rooting of *Arabidopsis thaliana* pre-etiolated flooded seedlings. *Plant Science* **290**: 110294
- Côté IM, Darling ES, Brown CJ** (2016) Interactions among ecosystem stressors and their importance in conservation. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**: 20152592
- Cramer GR, Ergül A, Grimplet J, Tillett RL, Tattersall EAR, Bohlman MC, Vincent D, Sonderegger J, Evans J, Osborne C, et al** (2007) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct Integr Genomics* **7**: 111–134
- Crawford AJ, McLachlan DH, Hetherington AM, Franklin KA** (2012) High temperature exposure increases plant cooling capacity. *Current Biology* **22**: R396–R397
- Cubas P, Vincent C, Coen E** (1999a) An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *401*: 5

- Cucinotta M, Manrique S, Cuesta C, Benkova E, Novak O, Colombo L** (2018) CUP-SHAPED COTYLEDON1 (CUC1) and CUC2 regulate cytokinin homeostasis to determine ovule number in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **69**: 5169–5176
- Cui Y, Kump LR, Ridgwell AJ, Charles AJ, Junium CK, Diefendorf AF, Freeman KH, Urban NM, Harding IC** (2011) Slow release of fossil carbon during the Palaeocene–Eocene Thermal Maximum. *Nature Geosci* **4**: 481–485
- Dai X, Zhuang Z, Zhao PX** (2018) psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *6*
- Dalakouras A, Vlachostergios D** (2021) Epigenetic approaches to crop breeding: current status and perspectives. *Journal of Experimental Botany* **72**: 5356–5371
- Dar FA, Mushtaq NU, Saleem S, Rehman RU, Dar TUH, Hakeem KR** (2022) Role of Epigenetics in Modulating Phenotypic Plasticity against Abiotic Stresses in Plants. *International Journal of Genomics* **2022**: e1092894
- Datta S, Taghvaeian S, Stivers J** (2017) Understanding Soil Water Content and Thresholds For Irrigation Management. doi: 10.13140/RG.2.2.35535.89765
- Daval S, Belcour A, Gazengel K, Legrand L, Gouzy J, Cottret L, Lebreton L, Aigu Y, Mougel C, Manzanares-Dauleux MJ** (2019) Computational analysis of the *Plasmodiophora brassicae* genome: mitochondrial sequence description and metabolic pathway database design. *Genomics* **111**: 1629–1640
- Daval S, Gazengel K, Belcour A, Linglin J, Guillerm-Erckelboudt A, Sarniguet A, Manzanares-Dauleux MJ, Lebreton L, Mougel C** (2020) Soil microbiota influences clubroot disease by modulating *Plasmodiophora brassicae* and *Brassica napus* transcriptomes. *Microb Biotechnol* **13**: 1648–1672
- Debieu M, Huard-Chauveau C, Genissel A, Roux F, Roby D** (2016) Quantitative disease resistance to the bacterial pathogen *Xanthomonas campestris* involves an *Arabidopsis* immune receptor pair and a gene of unknown function: The genetic bases of QDR to black rot. *Molecular Plant Pathology* **17**: 510–520
- Dekhuijzen HM** (1980) The occurrence of free and bound cytokinins in clubroots and *Plasmodiophora brassicae* infected turnip tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **49**: 169–176
- Deleris A, Halter T, Navarro L** (2016) DNA Methylation and Demethylation in Plant Immunity. *Annu Rev Phytopathol* **54**: 579–603
- Dempsey DA, Vlot AC, Wildermuth MC, Klessig DF** (2011) Salicylic Acid Biosynthesis and Metabolism. *Arabidopsis Book* **9**: e0156
- Desaint H, Aoun N, Deslandes L, Vaillau F, Roux F, Berthomé R** (2021) Fight hard or die trying: when plants face pathogens under heat stress. *New Phytol* **229**: 712–734
- Devos S, Laukens K, Deckers P, Van Der Straeten D, Beeckman T, Inzé D, Van Onckelen H, Witters E, Prinsen E** (2006) A Hormone and Proteome Approach to Picturing the Initial Metabolic Events During *Plasmodiophora brassicae* Infection on *Arabidopsis*. *MPMI* **19**: 1431–1443

- Devos S, Vissenberg K, Verbelen J-P, Prinsen E** (2005) Infection of Chinese cabbage by *Plasmodiophora brassicae* leads to a stimulation of plant growth: impacts on cell wall metabolism and hormone balance. *New Phytologist* **166**: 241–250
- Díaz-Manzano FE, Cabrera J, Ripoll J-J, del Olmo I, Andrés MF, Silva AC, Barcala M, Sánchez M, Ruíz-Ferrer V, de Almeida-Engler J, et al** (2018) A role for the gene regulatory module microRNA172/TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED 1/FLOWERING LOCUS T (miRNA172/TOE1/FT) in the feeding sites induced by *Meloidogyne javanica* in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **217**: 813–827
- Diener AC, Ausubel FM** (2005) RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM 1, a Dominant *Arabidopsis* Disease-Resistance Gene, Is Not Race Specific. *Genetics* **171**: 305–321
- Diouf I, Derivot L, Koussevitzky S, Carretero Y, Bitton F, Moreau L, Causse M** (2020) Genetic basis of phenotypic plasticity and genotype × environment interactions in a multi-parental tomato population. *Journal of Experimental Botany* **71**: 5365–5376
- Dixon GR** (2009a) The Occurrence and Economic Impact of *Plasmodiophora brassicae* and Clubroot Disease. *J Plant Growth Regul* **28**: 194–202
- Dixon GR** (2009b) *Plasmodiophora brassicae* in its Environment. *J Plant Growth Regul* **28**: 212–228
- Dobin A, Davis CA, Schlesinger F, Drenkow J, Zaleski C, Jha S, Batut P, Chaisson M, Gingeras TR** (2013) STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**: 15–21
- Dobson RL** (1983) Effects of Lime Particle Size and Distribution and Fertilizer Formulation on Clubroot Disease Caused by *Plasmodiophora brassicae*. *Plant Dis* **67**: 50
- Donald C, Porter I** (2009) Integrated Control of Clubroot. *J Plant Growth Regul* **28**: 289–303
- Dong Q, Hu B, Zhang C** (2022) microRNAs and Their Roles in Plant Development. *Frontiers in Plant Science* **13**:
- Downen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Downen JM, Nery JR, Dixon JE, Ecker JR** (2012) Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**: E2183–E2191
- Duncan EJ, Gluckman PD, Dearden PK** (2014) Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype? *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution* **322**: 208–220
- Durand M, Porcheron B, Hennion N, Maurousset L, Lemoine R, Pourtau N** (2016) Water Deficit Enhances C Export to the Roots in *Arabidopsis thaliana* Plants with Contribution of Sucrose Transporters in Both Shoot and Roots. *Plant Physiology* **170**: 1460–1479
- Eamens AL, Smith NA, Curtin SJ, Wang M-B, Waterhouse PM** (2009) The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA* **15**: 2219–2235


- Earl HJ** (2003) A Precise Gravimetric Method for Simulating Drought Stress in Pot Experiments. *Crop Science* **43**: 1868–1873
- Ehrenhofer-Murray AE** (2021) Increased CG, CHG and CHH methylation at the cycloidea gene in the “Peloria” mutant of *Linaria vulgaris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **573**: 112–116
- Elad Y, Pertot I** (2014) Climate Change Impacts on Plant Pathogens and Plant Diseases. *Journal of Crop Improvement* **28**: 99–139
- Erwin JE, Heins RD, Karlsson MG** (1989) THERMOMORPHOGENESIS IN LILIUM LONGIFLORUM. *American Journal of Botany* **76**: 47–52
- Evans JL, Scholes JD** (1995) How does clubroot alter the regulation of carbon metabolism in its host? *Aspects of Applied Biology* 125–132
- Eysholdt-Derzso E, Sauter M** (2019) Hypoxia and the group VII ethylene response transcription factor HRE2 promote adventitious root elongation in *Arabidopsis*. *Plant Biology* **21**: 103–108
- Eysholdt-Derzso E, Sauter M** (2017) Root Bending Is Antagonistically Affected by Hypoxia and ERF-Mediated Transcription via Auxin Signaling. *Plant Physiology* **175**: 412–423
- Faggian R, Strelkov SE** (2009) Detection and Measurement of *Plasmodiophora brassicae*. *J Plant Growth Regul* **28**: 282–288
- Fahling M, Graf H, Siemens J** (2003) Pathotype Separation of *Plasmodiophora brassicae* by the Host Plant. *J Phytopathol* **151**: 425–430
- Fan S, Liu H, Liu J, Hua W, Xu S, Li J** (2020) Systematic Analysis of the DNA Methylase and Demethylase Gene Families in Rapeseed (*Brassica napus* L.) and Their Expression Variations After Salt and Heat stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **21**: 953
- Fang X, Cui Y, Li Y, Qi Y** (2015) Transcription and processing of primary microRNAs are coupled by Elongator complex in *Arabidopsis*. *Nature Plants* **1**: 1–9
- Feng L, Wu B, Chen S, Zhang C, He Y** (2022) Application of visible/near-infrared hyperspectral imaging with convolutional neural networks to phenotype aboveground parts to detect cabbage *Plasmodiophora brassicae* (clubroot). *Infrared Physics & Technology* **121**: 104040
- Fernández-Calvo P, Chini A, Fernández-Barbero G, Chico J-M, Gimenez-Ibanez S, Geerinck J, Eeckhout D, Schweizer F, Godoy M, Franco-Zorrilla JM, et al** (2011) The *Arabidopsis* bHLH Transcription Factors MYC3 and MYC4 Are Targets of JAZ Repressors and Act Additively with MYC2 in the Activation of Jasmonate Responses. *The Plant Cell* **23**: 701–715
- Fink GR** (1998) *Anatomy of a Revolution*. *Genetics* **149**: 473–477

- Fiorucci A-S, Galvão VC, Ince YÇ, Boccaccini A, Goyal A, Allenbach Petrolati L, Trevisan M, Fankhauser C** (2020) PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 7 is important for early responses to elevated temperature in Arabidopsis seedlings. *New Phytologist* **226**: 50–58
- Fitz-James MH, Cavalli G** (2022) Molecular mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Nat Rev Genet* **23**: 325–341
- Flor HH** (1956) The Complementary Genic Systems in Flax and Flax Rust. *Advances in Genetics*. Elsevier, pp 29–54
- Floyd SK, Bowman JL** (2004) Ancient microRNA target sequences in plants. *Nature* **428**: 485–486
- Foroozani M, Holder DH, Deal RB** (2022) Histone variants in the specialization of plant chromatin. *Annu Rev Plant Biol* **73**: 149–172
- Foroozani M, Vandal MP, Smith AP** (2021) H3K4 trimethylation dynamics impact diverse developmental and environmental responses in plants. *Planta* **253**: 4
- Forsyth A, Mansfield JW, Grabov N, de Torres M, Sinapidou E, Grant MR** (2010) Genetic Dissection of Basal Resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in Accessions of Arabidopsis. *MPMI* **23**: 1545–1552
- Franco-Zorrilla JM, Valli A, Todesco M, Mateos I, Puga MI, Rubio-Somoza I, Leyva A, Weigel D, García JA, Paz-Ares J** (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat Genet* **39**: 1033–1037
- Franklin KA, Lee SH, Patel D, Kumar SV, Spartz AK, Gu C, Ye S, Yu P, Breen G, Cohen JD, et al** (2011) PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 4 (PIF4) regulates auxin biosynthesis at high temperature. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**: 20231–20235
- Fredua-Agyeman R, Hwang S-F, Zhang H, Falak I, Huang X, Strelkov SE** (2021) Clubroot resistance derived from the European Brassica napus cv. “Tosca” is not effective against virulent *Plasmodiophora brassicae* isolates from Alberta, Canada. *Sci Rep* **11**: 14472
- Fredua-Agyeman R, Yu Z, Hwang S-F, Strelkov SE** (2020) Genome-Wide Mapping of Loci Associated With Resistance to Clubroot in Brassica napus ssp. napobrassica (Rutabaga) Accessions From Nordic Countries. *Frontiers in Plant Science* **11**:
- French E, Kim B-S, Iyer-Pascuzzi AS** (2016) Mechanisms of quantitative disease resistance in plants. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **56**: 201–208
- Friberg H, Lagerlöf J, Rämert B** (2005) Germination of *Plasmodiophora brassicae* resting spores stimulated by a non-host plant. *Eur J Plant Pathol* **113**: 275
- Friedländer MR, Mackowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N** (2012) miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Research* **40**: 37–52

- Fu J, Liu H, Li Y, Yu H, Li X, Xiao J, Wang S** (2011) Manipulating Broad-Spectrum Disease Resistance by Suppressing Pathogen-Induced Auxin Accumulation in Rice. *Plant Physiology* **155**: 589–602
- Fu ZQ, Dong X** (2013) Systemic Acquired Resistance: Turning Local Infection into Global Defense. *Annual Review of Plant Biology* **64**: 839–863
- Fuchs H** (1996) Identification of a Gene in *Arabidopsis thaliana* Controlling Resistance to Clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) and Characterization of the Resistance Response. *MPMI* **9**: 091
- Fujita Y, Fujita M, Satoh R, Maruyama K, Parvez MM, Seki M, Hiratsu K, Ohme-Takagi M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2005) AREB1 Is a Transcription Activator of Novel ABRE-Dependent ABA Signaling That Enhances Drought Stress Tolerance in Arabidopsis. *The Plant Cell* **17**: 3470–3488
- Fujita Y, Nakashima K, Yoshida T, Katagiri T, Kidokoro S, Kanamori N, Umezawa T, Fujita M, Maruyama K, Ishiyama K, et al** (2009) Three SnRK2 Protein Kinases are the Main Positive Regulators of Abscisic Acid Signaling in Response to Water Stress in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology* **50**: 2123–2132
- Fukagawa T, Earnshaw WC** (2014) The Centromere: Chromatin Foundation for the Kinetochores Machinery. *Developmental Cell* **30**: 496–508
- Furci L, Jain R, Stassen J, Berkowitz O, Whelan J, Roquis D, Baillet V, Colot V, Johannes F, Ton J** (2019) Identification and characterisation of hypomethylated DNA loci controlling quantitative resistance in Arabidopsis. *eLife* **8**: e40655
- Gahatraj S, Shrestha SM, Devkota TR, Rai HH** (2019) A review on clubroot of crucifers: symptoms, life-cycle of pathogen, factors affecting severity, and management strategies.
- Gahlaut V, Samtani H, Khurana P** (2020a) Genome-wide identification and expression profiling of cytosine-5 DNA methyltransferases during drought and heat stress in wheat (*Triticum aestivum*). *Genomics* **112**: 4796–4807
- Gahlaut V, Zinta G, Jaiswal V, Kumar S** (2020b) Quantitative Epigenetics: A New Avenue for Crop Improvement. *Epigenomes* **4**: 25
- Galiano-Carneiro AL, Kessel B, Presterl T, Miedaner T** (2021) Intercontinental trials reveal stable QTL for Northern corn leaf blight resistance in Europe and in Brazil. *Theor Appl Genet* **134**: 63–79
- Gan X, Stegle O, Behr J, Steffen JG, Drewe P, Hildebrand KL, Lyngsoe R, Schultheiss SJ, Osborne EJ, Sreedharan VT, et al** (2011) Multiple reference genomes and transcriptomes for *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **477**: 419–423
- Gandikota M, Birkenbihl RP, Höhmann S, Cardon GH, Saedler H, Huijser P** (2007) The miRNA156/157 recognition element in the 3' UTR of the Arabidopsis SBP box gene SPL3 prevents early flowering by translational inhibition in seedlings. *The Plant Journal* **49**: 683–693

- Gao G, Li J, Li H, Li F, Xu K, Yan G, Chen B, Qiao J, Wu X** (2014) Comparison of the heat stress induced variations in DNA methylation between heat-tolerant and heat-sensitive rapeseed seedlings. *Breeding Science* **64**: 125–133
- Gao S, Wang J, Jiang N, Zhang S, Wang Y, Zhang J, Li N, Fang Y, Yang L, Chen S, et al** (2020) Hyponastic Leaves 1 protects pri-miRNAs from nuclear exosome attack. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**: 17429–17437
- Gao Z, Nie J, Wang H** (2021) MicroRNA biogenesis in plant. *Plant Growth Regul* **93**: 1–12
- Gaspar T, Franck T, Bisbis B, Kevers C, Jouve L, Hausman JF, Dommes J** (2002) Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation* **37**: 263–285
- Georgii E, Jin M, Zhao J, Kanawati B, Schmitt-Kopplin P, Albert A, Winkler JB, Schäffner AR** (2017) Relationships between drought, heat and air humidity responses revealed by transcriptome-metabolome co-analysis. *BMC Plant Biol* **17**: 120
- Ghozlan MH, EL-Argawy E, Tokgöz S, Lakshman DK, Mitra A** (2020) Plant Defense against Necrotrophic Pathogens. *American Journal of Plant Sciences* **11**: 2122–2138
- Gil K, Park C** (2019) Thermal adaptation and plasticity of the plant circadian clock. *New Phytol* **221**: 1215–1229
- Gilly A, Etcheverry M, Madoui M-A, Guy J, Quadrana L, Alberti A, Martin A, Heitkam T, Engelen S, Labadie K, et al** (2014) TE-Tracker: systematic identification of transposition events through whole-genome resequencing. *BMC Bioinformatics* **15**: 377
- Glazebrook J** (2005) Contrasting Mechanisms of Defense Against Biotrophic and Necrotrophic Pathogens. *Annu Rev Phytopathol* **43**: 205–227
- Głowacki S, Macioszek VK, Kononowicz AK** (2010) R proteins as fundamentals of plant innate immunity. *Cell Mol Biol Lett* **16**: 1–24
- Gohlke J, Scholz C-J, Kneitz S, Weber D, Fuchs J, Hedrich R, Deeken R** (2013) DNA Methylation Mediated Control of Gene Expression Is Critical for Development of Crown Gall Tumors. *PLoS Genet* **9**: e1003267
- Gong Z, Morales-Ruiz T, Ariza RR, Roldán-Arjona T, David L, Zhu J-K** (2002) ROS1, a Repressor of Transcriptional Gene Silencing in Arabidopsis, Encodes a DNA Glycosylase/Lyase. *Cell* **111**: 803–814
- González RM, Ricardi MM, Iusem ND** (2013) Epigenetic marks in an adaptive water stress-responsive gene in tomato roots under normal and drought conditions. *Epigenetics* **8**: 864–872
- Gossen BD, Adhikari KKC, McDonald MR** (2012) Effects of temperature on infection and subsequent development of clubroot under controlled conditions: Effects of temperature on clubroot. *Plant Pathology* **61**: 593–599

- Gossen BD, Al-Daoud F, Dumonceaux T, Dalton JA, Peng G, Pageau D, McDonald MR** (2019) Comparison of techniques for estimation of resting spores of *Plasmodiophora brassicae* in soil. *Plant Pathology* **68**: 954–961
- Gossen BD, Kasinathan H, Cao T, Manolii VP, Strelkov SE, Hwang S-F, McDonald MR** (2013) Interaction of pH and temperature affect infection and symptom development of *Plasmodiophora brassicae* in canola. *Canadian Journal of Plant Pathology* **35**: 294–303
- Gou M, Balint-Kurti P, Xu M, Yang Q** (2023) Quantitative disease resistance: Multifaceted players in plant defense. *Journal of Integrative Plant Biology* **65**: 594–610
- van der Graaf A, Wardenaar R, Neumann DA, Taudt A, Shaw RG, Jansen RC, Schmitz RJ, Colomé-Tatché M, Johannes F** (2015) Rate, spectrum, and evolutionary dynamics of spontaneous epimutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **112**: 6676–6681
- Graf H, Föhling M, Siemens J** (2004) Chromosome Polymorphism of the Obligate Biotrophic Parasite *Plasmodiophora brassicae*: Chromosome polymorphism. *Journal of Phytopathology* **152**: 86–91
- Grant M, Brown I, Adams S, Knight M, Ainslie A, Mansfield J** (2000) The RPM1 plant disease resistance gene facilitates a rapid and sustained increase in cytosolic calcium that is necessary for the oxidative burst and hypersensitive cell death. *Plant J* **23**: 441–450
- Gravot A, Deleu C, Wagner G, Lariagon C, Lugan R, Todd C, Wendehenne D, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ** (2012) Arginase Induction Represses Gall Development During Clubroot Infection in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology* **53**: 901–911
- Gravot A, Grillet L, Wagner G, Jubault M, Lariagon C, Baron C, Deleu C, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ** (2011) Genetic and physiological analysis of the relationship between partial resistance to clubroot and tolerance to trehalose in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **191**: 1083–1094
- Gravot A, Lemarié S, Richard G, Lime T, Lariagon C, Manzanares-Dauleux MJ** (2016a) Flooding affects the development of *Plasmodiophora brassicae* in *Arabidopsis* roots during the secondary phase of infection. *Plant Pathol* **65**: 1153–1160
- Gravot A, Richard G, Lime T, Lemarié S, Jubault M, Lariagon C, Lemoine J, Vicente J, Robert-Seilaniantz A, Holdsworth MJ, et al** (2016b) Hypoxia response in *Arabidopsis* roots infected by *Plasmodiophora brassicae* supports the development of clubroot. *BMC Plant Biol* **16**: 251
- Gray WM, Östin A, Sandberg G, Romano CP, Estelle M** (1998) High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 7197–7202
- Griffiths-Jones S** (2006) miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research* **34**: D140–D144

- Grsic S, Kirchheim B, Pieper K, Fritsch M, Hilgenberg W, Ludwig-Müller J** (1999) Induction of auxin biosynthetic enzymes by jasmonic acid and in clubroot diseased Chinese cabbage plants. *Physiologia Plantarum* **105**: 521–531
- Grsic-Rausch S, Kobelt P, Siemens JM, Bischoff M, Ludwig-Müller J** (2000) Expression and Localization of Nitrilase during Symptom Development of the Clubroot Disease in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **122**: 369–378
- Guan L, Haider MS, Khan N, Nasim M, Jiu S, Fiaz M, Zhu X, Zhang K, Fang J** (2018) Transcriptome Sequence Analysis Elaborates a Complex Defensive Mechanism of Grapevine (*Vitis vinifera* L.) in Response to Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 4019
- Guo H-S, Xie Q, Fei J-F, Chua N-H** (2005) MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor *NAC1* to Downregulate Auxin Signals for *Arabidopsis* Lateral Root Development. *Plant Cell* **17**: 1376–1386
- Guo Z, Miyoshi H, Komyoji T, Haga T, Fujita T** (1991) Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chloro-2,6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1056**: 89–92
- Gupta A, Sarkar AK, Senthil-Kumar M** (2016) Global Transcriptional Analysis Reveals Unique and Shared Responses in *Arabidopsis thaliana* Exposed to Combined Drought and Pathogen Stress. *Frontiers in Plant Science* **7**:
- Gustafsson**  (1979) Linnaeus' Peloria: The history of a monster. *Theoret Appl Genetics* **54**: 241–248
- Gutierrez L, Bussell JD, Păcurar DI, Schwambach J, Păcurar M, Bellini C** (2009) Phenotypic Plasticity of Adventitious Rooting in *Arabidopsis* Is Controlled by Complex Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR Transcripts and MicroRNA Abundance. *The Plant Cell* **21**: 3119–3132
- Habibpourmehraban F, Wu Y, Wu JX, Hamzelou S, Masoomi-Aladizgeh F, Kamath KS, Amirkhani A, Atwell BJ, Haynes PA** (2022) Multiple Abiotic Stresses Applied Simultaneously Elicit Distinct Responses in Two Contrasting Rice Cultivars. *IJMS* **23**: 1739
- Halter T, Wang J, Amesefe D, Lastrucci E, Charvin M, Singla Rastogi M, Navarro L** (2021) The *Arabidopsis* active demethylase ROS1 cis-regulates defence genes by erasing DNA methylation at promoter-regulatory regions. *eLife* **10**: e62994
- Hamilton HA, Crête R** (1978) INFLUENCE OF SOIL MOISTURE, SOIL pH, AND LIMING SOURCES ON THE INCIDENCE OF CLUBROOT, THE GERMINATION AND GROWTH OF CABBAGE PRODUCED IN MINERAL AND ORGANIC SOILS UNDER CONTROLLED CONDITIONS. *Can J Plant Sci* **58**: 45–53
- Han M-H, Goud S, Song L, Fedoroff N** (2004) The *Arabidopsis* double-stranded RNA-binding protein HYL1 plays a role in microRNA-mediated gene regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* **101**: 1093–1098

- Han T-S, Hur K, Cho H-S, Ban HS** (2020) Epigenetic Associations between lncRNA/circRNA and miRNA in Hepatocellular Carcinoma. *Cancers (Basel)* **12**: 2622
- Hanzawa T, Shibasaki K, Numata T, Kawamura Y, Gaude T, Rahman A** (2013) Cellular Auxin Homeostasis under High Temperature Is Regulated through a SORTING NEXIN1–Dependent Endosomal Trafficking Pathway. *The Plant Cell* **25**: 3424–3433
- Hasanuzzaman M, Bhuyan MHMB, Zulfiqar F, Raza A, Mohsin SM, Mahmud JA, Fujita M, Fotopoulos V** (2020) Reactive Oxygen Species and Antioxidant Defense in Plants under Abiotic Stress: Revisiting the Crucial Role of a Universal Defense Regulator. *Antioxidants* **9**: 681
- Hatakeyama K, Suwabe K, Tomita RN, Kato T, Nunome T, Fukuoka H, Matsumoto S** (2013) Identification and characterization of Crr1a, a gene for resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *PLoS One* **8**: e54745
- Havko NE, Das MR, McClain AM, Kapali G, Sharkey TD, Howe GA** (2020) Insect herbivory antagonizes leaf cooling responses to elevated temperature in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA* **117**: 2211–2217
- He L, Huang H, Bradai M, Zhao C, You Y, Ma J, Zhao L, Lozano-Durán R, Zhu J-K** (2022) DNA methylation-free Arabidopsis reveals crucial roles of DNA methylation in regulating gene expression and development. *Nat Commun* **13**: 1335
- He X-F, Fang Y-Y, Feng L, Guo H-S** (2008) Characterization of conserved and novel microRNAs and their targets, including a TuMV-induced TIR–NBS–LRR class R gene-derived novel miRNA in *Brassica*. *FEBS Letters* **582**: 2445–2452
- He X-J, Chen T, Zhu J-K** (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Res* **21**: 442–465
- He X-J, Hsu Y-F, Zhu S, Wierzbicki AT, Pontes O, Pikaard CS, Liu H-L, Wang C-S, Jin H, Zhu J-K** (2009) An effector of RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell* **137**: 498–508
- Heard E, Martienssen RA** (2014) Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. *Cell* **157**: 95–109
- Herr AJ, Jensen MB, Dalmay T, Baulcombe DC** (2005) RNA Polymerase IV Directs Silencing of Endogenous DNA. *Science* **308**: 118–120
- Hewezi T, Lane T, Piya S, Rambani A, Rice JH, Staton M** (2017) Cyst Nematode Parasitism Induces Dynamic Changes in the Root Epigenome. *Plant Physiol* **174**: 405–420
- Hinz M, Wilson IW, Yang J, Buerstenbinder K, Llewellyn D, Dennis ES, Sauter M, Dolferus R** (2010) Arabidopsis RAP2.2: An Ethylene Response Transcription Factor That Is Important for Hypoxia Survival. *Plant Physiology* **153**: 757–772
- Hirai M, Harada T, Kubo N, Tsukada M, Suwabe K, Matsumoto S** (2004) A novel locus for clubroot resistance in *Brassica rapa* and its linkage markers. *Theor Appl Genet* **108**: 639–643

- Hirsch J, Lefort V, Vankersschaver M, Boualem A, Lucas A, Thermes C, d'Aubenton-Carafa Y, Crespi M** (2006) Characterization of 43 Non-Protein-Coding mRNA Genes in Arabidopsis, Including the MIR162a-Derived Transcripts. *Plant Physiology* **140**: 1192–1204
- Hoegh-Guldberg O, Jacob D, Taylor M, Bindi M, Brown S, Camilloni I, Diedhiou A, Djalante R, Ebi KL, Engelbrecht F, et al** (2018) Impacts of 1.5°C of Global Warming on Natural and Human Systems. 138
- Holemon H, Korshunova Y, Ordway J m., Bedell J a., Citek R w., Lakey N, Leon J, Finney M, McPherson J d., Jeddelloh J a.** (2007) MethylScreen: DNA methylation density monitoring using quantitative PCR. *BioTechniques* **43**: 683–693
- Holliday R** (1987) The Inheritance of Epigenetic Defects. *Science, New Series* **238**: 163–170
- Horbach R, Navarro-Quesada AR, Knogge W, Deising HB** (2011) When and how to kill a plant cell: Infection strategies of plant pathogenic fungi. *Journal of Plant Physiology* **168**: 51–62
- Hossain MM, Pérez-López E, Todd CD, Wei Y, Bonham-Smith PC** (2021) Endomembrane-Targeting Plasmodiophora brassicae Effectors Modulate PAMP Triggered Immune Responses in Plants. *Frontiers in Microbiology* **12**:
- Hossain R, Quispe C, Saikat ASM, Jain D, Habib A, Janmeda P, Islam MT, Radha U, Daştan SD, Kumar M, et al** (2022) Biosynthesis of Secondary Metabolites Based on the Regulation of MicroRNAs. *BioMed Research International* **2022**: e9349897
- Hotchkiss RD** (1948) THE QUANTITATIVE SEPARATION OF PURINES, PYRIMIDINES, AND NUCLEOSIDES BY PAPER CHROMATOGRAPHY. *Journal of Biological Chemistry* **175**: 315–332
- Hou J, Lu D, Mason AS, Li B, Xiao M, An S, Fu D** (2019) Non-coding RNAs and transposable elements in plant genomes: emergence, regulatory mechanisms and roles in plant development and stress responses. *Planta* **250**: 23–40
- Hsu F-C, Chou M-Y, Peng H-P, Chou S-J, Shih M-C** (2011) Insights into Hypoxic Systemic Responses Based on Analyses of Transcriptional Regulation in Arabidopsis. *PLoS ONE* **6**: e28888
- Hu G, Lei Y, Liu J, Hao M, Zhang Z, Tang Y, Chen A, Wu J** (2020) The ghr-miR164 and GhNAC100 modulate cotton plant resistance against Verticillium dahlia. *Plant Science* **293**: 110438
- Hu M, Xi Z, Wang J** (2023) Epigenetic Regulation of Subgenomic Gene Expression in Allo-tetraploid Brassica napus. *Plants* **12**: 2608
- Huang B, Wang P, Jin L, Yv X, Wen M, Wu S, Liu F, Xu J** (2023) Methylome and transcriptome analysis of flowering branches building of Citrus plants induced by drought stress. *Gene* **880**: 147595

- Huard-Chauveau C, Percepied L, Debieu M, Rivas S, Kroj T, Kars I, Bergelson J, Roux F, Roby D** (2013) An Atypical Kinase under Balancing Selection Confers Broad-Spectrum Disease Resistance in Arabidopsis. *PLoS Genet* **9**: e1003766
- Huettel B, Kanno T, Daxinger L, Aufsatz W, Matzke AJM, Matzke M** (2006) Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in Arabidopsis. *EMBO J* **25**: 2828–2836
- Huot B, Castroverde CDM, Velásquez AC, Hubbard E, Pulman JA, Yao J, Childs KL, Tsuda K, Montgomery BL, He SY** (2017) Dual impact of elevated temperature on plant defence and bacterial virulence in Arabidopsis. *Nat Commun* **8**: 1808
- Hutvágner G, Zamore PD** (2002) A microRNA in a Multiple-Turnover RNAi Enzyme Complex. *Science* **297**: 2056–2060
- Hwang G, Zhu J-Y, Lee YK, Kim S, Nguyen TT, Kim J, Oh E** (2017) PIF4 Promotes Expression of LNG1 and LNG2 to Induce Thermomorphogenic Growth in Arabidopsis. *Front Plant Sci* **8**: 1320
- Hwang SF, Ahmed HU, Zhou Q, Turnbull GD, Strelkov SE, Gossen BD, Peng G** (2015) Effect of host and non-host crops on *Plasmodiophora brassicae* resting spore concentrations and clubroot of canola. *Plant Pathology* **64**: 1198–1206
- Hwang S-F, Strelkov SE, Feng J, Gossen BD, Howard RJ** (2012) *Plasmodiophora brassicae*: a review of an emerging pathogen of the Canadian canola (*Brassica napus*) crop. *Molecular Plant Pathology* **13**: 105–113
- Ibañez C, Delker C, Martinez C, Bürstenbinder K, Janitza P, Lippmann R, Ludwig W, Sun H, James GV, Klecker M, et al** (2018) Brassinosteroids Dominate Hormonal Regulation of Plant Thermomorphogenesis via BZR1. *Current Biology* **28**: 303-310.e3
- Ibañez C, Poeschl Y, Peterson T, Bellstädt J, Denk K, Gogol-Döring A, Quint M, Delker C** (2017) Ambient temperature and genotype differentially affect developmental and phenotypic plasticity in Arabidopsis thaliana. *BMC Plant Biol* **17**: 114
- Ibarra CA, Feng X, Schoft VK, Hsieh T-F, Uzawa R, Rodrigues JA, Zemach A, Chumak N, Machlicova A, Nishimura T, et al** (2012) Active DNA demethylation in plant companion cells reinforces transposon methylation in gametes. *Science* **337**: 1360–1364
- Iki T, Yoshikawa M, Nishikiori M, Jaudal MC, Matsumoto-Yokoyama E, Mitsuahara I, Meshi T, Ishikawa M** (2010) In Vitro Assembly of Plant RNA-Induced Silencing Complexes Facilitated by Molecular Chaperone HSP90. *Molecular Cell* **39**: 282–291
- Ingouff M, Selles B, Michaud C, Vu TM, Berger F, Schorn AJ, Autran D, Durme MV, Nowack MK, Martienssen RA, et al** (2017) Live-cell analysis of DNA methylation during sexual reproduction in Arabidopsis reveals context and sex-specific dynamics controlled by noncanonical RdDM. *Genes Dev* **31**: 72–83
- IPCC** (2023) IPCC, 2023: Summary for Policymakers. Climate Change 2023: Synthesis Report. A Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. Contribution of Working Groups I, II and III to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental

Panel on Climate Change, [Core Writing Team, H. Lee and J. Romero (eds.)]. IPCC, Geneva, Switzerland, 36 pages. (in press)., p 36

- Irani S, Trost B, Waldner M, Nayidu N, Tu J, Kusalik AJ, Todd CD, Wei Y, Bonham-Smith PC** (2018) Transcriptome analysis of response to *Plasmodiophora brassicae* infection in the Arabidopsis shoot and root. *BMC Genomics* **19**: 23
- Irvine RA, Lin IG, Hsieh C-L** (2002) DNA Methylation Has a Local Effect on Transcription and Histone Acetylation. *Mol Cell Biol* **22**: 6689–6696
- Islam TM, Toyota K** (2004) Effect of Moisture Conditions and Pre-Incubation at Low Temperature on Bacterial Wilt of Tomato Caused by *Ralstonia solanacearum*. *Microb Environ* **19**: 244–247
- Iwama H, Kubota T, Ushiroda T, Osozawa S, Katou H** (1991) Control of soil water potential using negative pressure water circulation technique. *Soil Science and Plant Nutrition* **37**: 7–14
- Iwama H, Osozawa S, Ushiroda T, Kubota T** (1994) Analysis of soil water matric potential requirement for infection of turnip with *Plasmodiophora brassicae* using negative pressure water circulation technique. *Soil Science and Plant Nutrition* **40**: 293–299
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X, Jacobsen SE** (2002) Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature* **416**: 556–560
- Jackson RB, Quéré CL, Andrew RM, Canadell JG, Korsbakken JI, Liu Z, Peters GP, Zheng B** (2018) Global energy growth is outpacing decarbonization. *Environ Res Lett* **13**: 120401
- Jahn L, Mucha S, Bergmann S, Horn C, Staswick P, Steffens B, Siemens J, Ludwig-Müller J** (2013) The Clubroot Pathogen (*Plasmodiophora brassicae*) Influences Auxin Signaling to Regulate Auxin Homeostasis in Arabidopsis. *Plants* **2**: 726–749
- Janeway Jr. CA, Medzhitov R** (1998) Introduction: The role of innate immunity in the adaptive immune response. *Seminars in Immunology* **10**: 349–350
- Javed MA, Schwelm A, Zamani-Noor N, Salih R, Silvestre Vañó M, Wu J, González García M, Heick TM, Luo C, Prakash P, et al** (2023) The clubroot pathogen *Plasmodiophora brassicae* : A profile update. *Molecular Plant Pathology* **24**: 89–106
- Jayasinghe CPA, Ozga JA, Manolii VP, Hwang S-F, Strelkov SE** (2023) Impact of Susceptibility on Plant Hormonal Composition during Clubroot Disease Development in Canola (*Brassica napus*). *Plants* **12**: 2899
- Jeddeloh JA, Stokes TL, Richards EJ** (1999) Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nat Genet* **22**: 94–97
- Jiang D, Berger F** (2017) Histone variants in plant transcriptional regulation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* **1860**: 123–130
- Jiang K, Guo H, Zhai J** (2023) Interplay of phytohormones and epigenetic regulation: A recipe for plant development and plasticity. *Journal of Integrative Plant Biology* **65**: 381–398

- Jin B, Wang L, Wang J, Jiang K-Z, Wang Y, Jiang X-X, Ni C-Y, Wang Y-L, Teng N-J** (2011) The effect of experimental warming on leaf functional traits, leaf structure and leaf biochemistry in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol* **11**: 35
- Jin D, Wang Y, Zhao Y, Chen M** (2013) MicroRNAs and Their Cross-Talks in Plant Development. *Journal of Genetics and Genomics* **40**: 161–170
- Johannes F, Porcher E, Teixeira FK, Saliba-Colombani V, Simon M, Agier N, Bulski A, Albuissou J, Heredia F, Audigier P, et al** (2009) Assessing the Impact of Transgenerational Epigenetic Variation on Complex Traits. *PLoS Genet* **5**: e1000530
- Johnson LM, Law JA, Khattar A, Henderson IR, Jacobsen SE** (2008) SRA-Domain Proteins Required for DRM2-Mediated De Novo DNA Methylation. *PLoS Genet* **4**: e1000280
- Jones JDG, Dangl JL** (2006) The plant immune system. *Nature* **444**: 323–329
- Jones JDG, Vance RE, Dangl JL** (2016) Intracellular innate immune surveillance devices in plants and animals. *Science* **354**: aaf6395
- Jones-Rhoades MW** (2012) Conservation and divergence in plant microRNAs. *Plant Mol Biol* **80**: 3–16
- Jubault M, Hamon C, Gravot A, Lariagon C, Delourme R, Bouchereau A, Manzanares-Dauleux MJ** (2008a) Differential Regulation of Root Arginine Catabolism and Polyamine Metabolism in Clubroot-Susceptible and Partially Resistant *Arabidopsis* Genotypes. *Plant Physiol* **146**: 2008–2019
- Jubault M, Lariagon C, Simon M, Delourme R, Manzanares-Dauleux MJ** (2008b) Identification of quantitative trait loci controlling partial clubroot resistance in new mapping populations of *Arabidopsis thaliana*. *Theor Appl Genet* **117**: 191–202
- Jubault M, Lariagon C, Taconnat L, Renou J-P, Gravot A, Delourme R, Manzanares-Dauleux MJ** (2013) Partial resistance to clubroot in *Arabidopsis* is based on changes in the host primary metabolism and targeted cell division and expansion capacity. *Funct Integr Genomics* **13**: 191–205
- Kageyama K, Asano T** (2009) Life Cycle of *Plasmodiophora brassicae*. *J Plant Growth Regul* **28**: 203–211
- Kaikkonen MU, Lam MTY, Glass CK** (2011) Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovasc Res* **90**: 430–440
- Kakutani T, Jeddloh JA, Flowers SK, Munakata K, Richards EJ** (1996) Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 12406–12411
- Kakutani T, Jeddloh JA, Richards EJ** (1995) Characterization of an *Arabidopsis thaliana* DNA hypomethylation mutant. *Nucl Acids Res* **23**: 130–137

- Kakutani T, Kato M, Kinoshita T, Miura A** (2004) Control of Development and Transposon Movement by DNA Methylation in *Arabidopsis thaliana*. Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology **69**: 139–43
- Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddloh JA, Riddle NC, Verbsky ML, Richards EJ** (2003) *Arabidopsis MET1* Cytosine Methyltransferase Mutants. Genetics **163**: 1109–1122
- Kapadia C, Datta R, Mahammad SM, Tomar RS, Kheni JK, Ercisli S** (2023) Genome-Wide Identification, Quantification, and Validation of Differentially Expressed miRNAs in Eggplant (*Solanum melongena* L.) Based on Their Response to *Ralstonia solanacearum* Infection. ACS Omega **8**: 2648–2657
- Kassambara A, Mundt F** (2020) factoextra: Extract and Visualize the Results of Multivariate Data Analyses.
- Kato M, Takashima K, Kakutani T** (2004) Epigenetic Control of CACTA Transposon Mobility in *Arabidopsis thaliana*. Genetics **168**: 961–969
- Kawakatsu T, Huang SC, Jupe F, Sasaki E, Schmitz RJ, Urich MA, Castanon R, Nery JR, Barragan C, He Y, et al** (2016a) Epigenomic Diversity in a Global Collection of *Arabidopsis thaliana* Accessions. Cell **166**: 492–505
- Kawakatsu T, Huang SC, Jupe F, Sasaki E, Schmitz RJ, Urich MA, Castanon R, Nery JR, Barragan C, He Y, et al** (2016b) Epigenomic Diversity in a Global Collection of *Arabidopsis thaliana* Accessions. Cell **166**: 492–505
- Kawanabe T, Ishikura S, Miyaji N, Sasaki T, Wu LM, Itabashi E, Takada S, Shimizu M, Takasaki-Yasuda T, Osabe K, et al** (2016) Role of DNA methylation in hybrid vigor in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences **113**: E6704–E6711
- Kawashima T, Lorković ZJ, Nishihama R, Ishizaki K, Axelsson E, Yelagandula R, Kohchi T, Berger F** (2015) Diversification of histone H2A variants during plant evolution. Trends in Plant Science **20**: 419–425
- Kim JH, Castroverde CDM, Huang S, Li C, Hilleary R, Seroka A, Sohrabi R, Medina-Yerena D, Huot B, Wang J, et al** (2022) Increasing the resilience of plant immunity to a warming climate. Nature **607**: 339–344
- Kim JJ, Lee JH, Kim W, Jung HS, Huijser P, Ahn JH** (2012) The microRNA156-SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE3 Module Regulates Ambient Temperature-Responsive Flowering via FLOWERING LOCUS T in *Arabidopsis*. Plant Physiology **159**: 461–478
- Kim S, Kang J, Cho D-I, Park JH, Kim SY** (2004) ABF2, an ABRE-binding bZIP factor, is an essential component of glucose signaling and its overexpression affects multiple stress tolerance. The Plant Journal **40**: 75–87
- Kim VN, Nam J-W** (2006) Genomics of microRNA. Trends in Genetics **22**: 165–173

- Knaust A, Ludwig-Müller J** (2013) The Ethylene Signaling Pathway is Needed to Restrict Root Gall Growth in *Arabidopsis* after Infection with the Obligate Biotrophic Protist *Plasmodiophora brassicae*. *J Plant Growth Regul* **32**: 9–21
- Kobelt P, Siemens J, Sacristán MD** (2000) Histological characterisation of the incompatible interaction between *Arabidopsis thaliana* and the obligate biotrophic pathogen *Plasmodiophora brassicae*. *Mycological Research* **104**: 220–225
- Koch E, Cox R, Williams PH** (1991) Infection of *Arabidopsis thaliana* by *Plasmodiophora brassicae*. *J Phytopathol* **132**: 99–104
- Koini MA, Alvey L, Allen T, Tilley CA, Harberd NP, Whitelam GC, Franklin KA** (2009) High Temperature-Mediated Adaptations in Plant Architecture Require the bHLH Transcription Factor PIF4. *Current Biology* **19**: 408–413
- Komivi D, Marie AM, Rong Z, Qi Z, Mei Y, Ndiaga C, Diaga D, Linhai W, Xiurong Z** (2018) The contrasting response to drought and waterlogging is underpinned by divergent DNA methylation programs associated with transcript accumulation in sesame. *Plant Science* **277**: 207–217
- Kong X, Yang M, Le BH, He W, Hou Y** (2022) The master role of siRNAs in plant immunity. *Mol Plant Pathol* **23**: 1565–1574
- Kooke R, Johannes F, Wardenaar R, Becker F, Etcheverry M, Colot V, Vreugdenhil D, Keurentjes JJB** (2015) Epigenetic Basis of Morphological Variation and Phenotypic Plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **27**: 337–348
- Koroban NV, Kudryavtseva AV, Krasnov GS, Sadritdinova AF, Fedorova MS, Snezhkina AV, Bolsheva NL, Muravenko OV, Dmitriev AA, Melnikova NV** (2016) The role of microRNA in abiotic stress response in plants. *Mol Biol* **50**: 337–343
- Korotko U, Chwiałkowska K, Sańko-Sawczenko I, Kwasniewski M** (2021) DNA Demethylation in Response to Heat Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mol Sci* **22**: 1555
- Kourelis J, van der Hoorn RAL** (2018) Defended to the Nines: 25 Years of Resistance Gene Cloning Identifies Nine Mechanisms for R Protein Function. *The Plant Cell* **30**: 285–299
- Koyama T, Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K, Ohme-Takagi M** (2010) TCP Transcription Factors Regulate the Activities of *ASYMMETRIC LEAVES1* and miR164, as Well as the Auxin Response, during Differentiation of Leaves in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **22**: 3574–3588
- Koyama T, Sato F, Ohme-Takagi M** (2017) Roles of miR319 and TCP Transcription Factors in Leaf Development. *Plant Physiol* **175**: 874–885
- Kozomara A, Griffiths-Jones S** (2014) miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucl Acids Res* **42**: D68–D73
- Kranner I, Minibayeva FV, Beckett RP, Seal CE** (2010) What is stress? Concepts, definitions and applications in seed science. *New Phytologist* **188**: 655–673

- Kumari VV, Banerjee P, Verma VC, Sukumaran S, Chandran MAS, Gopinath KA, Venkatesh G, Yadav SK, Singh VK, Awasthi NK** (2022) Plant Nutrition: An Effective Way to Alleviate Abiotic Stress in Agricultural Crops. *Int J Mol Sci* **23**: 8519
- Kurihara Y, Watanabe Y** (2004) Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 12753–12758
- Kurokawa Y, Nagai K, Huan PD, Shimazaki K, Qu H, Mori Y, Toda Y, Kuroha T, Hayashi N, Aiga S, et al** (2018) Rice leaf hydrophobicity and gas films are conferred by a wax synthesis gene (LGF1) and contribute to flood tolerance. *New Phytologist* **218**: 1558–1569
- Kushalappa AC, Yogendra KN, Karre S** (2016) Plant Innate Immune Response: Qualitative and Quantitative Resistance. *Critical Reviews in Plant Sciences* **35**: 38–55
- Kusmec A, Srinivasan S, Nettleton D, Schnable PS** (2017) Distinct genetic architectures for phenotype means and plasticities in *Zea mays*. *Nature Plants* **3**: 715–723
- Laila R, Robin AHK, Park J-I, Saha G, Kim H-T, Kayum MdA, Nou I-S** (2020) Expression and Role of Response Regulating, Biosynthetic and Degrading Genes for Cytokinin Signaling during Clubroot Disease Development. *IJMS* **21**: 3896
- Lal NK, Nagalakshmi U, Hurlburt NK, Flores R, Bak A, Sone P, Ma X, Song G, Walley J, Shan L, et al** (2018) The Receptor-like Cytoplasmic Kinase BIK1 Localizes to the Nucleus and Regulates Defense Hormone Expression during Plant Innate Immunity. *Cell Host & Microbe* **23**: 485-497.e5
- Lanciano S, Cristofari G** (2020) Measuring and interpreting transposable element expression. *Nat Rev Genet* **21**: 721–736
- Lannou C, Roby D, Ravigné V, Hannachi M, Moury B** (2021) L'immunité des plantes. Pour des cultures résistances aux maladies., Quæ. Versailles
- Laperche A, Aigu Y, Jubault M, Ollier M, Guichard S, Glory P, Strelkov Se, Gravot A, Manzanares-Dauleux Mj** (2017a) Clubroot resistance QTL are modulated by nitrogen input in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* **130**: 669–684
- Lau S-E, Hamdan MF, Pua T-L, Saidi NB, Tan BC** (2021) Plant Nitric Oxide Signaling under Drought Stress. *Plants (Basel)* **10**: 360
- Laufs P, Peaucelle A, Morin H, Traas J** (2004) MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in Arabidopsis meristems. *Development* **131**: 4311–4322
- Law JA, Vashisht AA, Wohlschlegel JA, Jacobsen SE** (2011) SHH1, a Homeodomain Protein Required for DNA Methylation, As Well As RDR2, RDM4, and Chromatin Remodeling Factors, Associate with RNA Polymerase IV. *PLOS Genetics* **7**: e1002195
- Lê S, Josse J, Husson F** (2008) **FactoMineR** : An R Package for Multivariate Analysis. *J Stat Soft.* doi: 10.18637/jss.v025.i01

- Lebreton L, Guillerm-Erckelboudt A-Y, Gazengel K, Linglin J, Ourry M, Glory P, Sarniguet A, Daval S, Manzanares-Dauleux MJ, Mougel C** (2019) Temporal dynamics of bacterial and fungal communities during the infection of *Brassica rapa* roots by the protist *Plasmodiophora brassicae*. *PLoS One* **14**: e0204195
- Lee J, Izzah NK, Choi B-S, Joh HJ, Lee S-C, Perumal S, Seo J, Ahn K, Jo EJ, Choi GJ, et al** (2015) Genotyping-by-sequencing map permits identification of clubroot resistance QTLs and revision of the reference genome assembly in cabbage (*Brassica oleracea* L.). *DNA Res* dsv034
- Lee M-H, Jeon HS, Kim HG, Park OK** (2017) An Arabidopsis NAC transcription factor NAC4 promotes pathogen-induced cell death under negative regulation by microRNA164. *New Phytologist* **214**: 343–360
- Lee S, Choi J, Park J, Hong CP, Choi D, Han S, Choi K, Roh T-Y, Hwang D, Hwang I** (2023) DDM1-mediated gene body DNA methylation is associated with inducible activation of defense-related genes in Arabidopsis. *Genome Biol* **24**: 106
- Lee S-U, Mun B-G, Bae E-K, Kim J-Y, Kim H-H, Shahid M, Choi Y-I, Hussain A, Yun B-W** (2021) Drought Stress-Mediated Transcriptome Profile Reveals NCED as a Key Player Modulating Drought Tolerance in *Populus davidiana*. *Front Plant Sci* **12**: 755539
- Lee Y, Ahn C, Han J, Choi H, Kim J, Yim J, Lee J, Provost P, Rådmark O, Kim S, et al** (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**: 415–419
- Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, Kim VN** (2004) MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J* **23**: 4051–4060
- Lei B, Berger F** (2019) H2A Variants in Arabidopsis: Versatile Regulators of Genome Activity. *Plant Commun* **1**: 100015
- Leisner CP, Potnis N, Sanz-Saez A** (2023) Crosstalk and trade-offs: Plant responses to climate change-associated abiotic and biotic stresses. *Plant, Cell & Environment* **46**: 2946–2963
- Lemarié S, Robert-Seilaniantz A, Lariagon C, Lemoine J, Marnet N, Jubault M, Manzanares-Dauleux MJ, Gravot A** (2015a) Both the Jasmonic Acid and the Salicylic Acid Pathways Contribute to Resistance to the Biotrophic Clubroot Agent *Plasmodiophora brassicae* in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol* pcv127
- Lemarié S, Robert-Seilaniantz A, Lariagon C, Lemoine J, Marnet N, Levrel A, Jubault M, Manzanares-Dauleux MJ, Gravot A** (2015b) Camalexin contributes to the partial resistance of Arabidopsis thaliana to the biotrophic soilborne protist *Plasmodiophora brassicae*. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2015.00539
- Leon-Reyes A, Van der Does D, De Lange ES, Delker C, Wasternack C, Van Wees SCM, Ritsema T, Pieterse CMJ** (2010) Salicylate-mediated suppression of jasmonate-responsive gene expression in Arabidopsis is targeted downstream of the jasmonate biosynthesis pathway. *Planta* **232**: 1423–1432

- Lermontova I, Schubert V, Fuchs J, Klatte S, Macas J, Schubert I** (2006) Loading of Arabidopsis Centromeric Histone CENH3 Occurs Mainly during G2 and Requires the Presence of the Histone Fold Domain. *Plant Cell* **18**: 2443–2451
- Levine A, Tenhaken R, Dixon R, Lamb C** (1994) H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* **79**: 583–593
- Li B, Gao K, Ren H, Tang W** (2018a) Molecular mechanisms governing plant responses to high temperatures. *Journal of Integrative Plant Biology* **60**: 757–779
- Li C, Xu M, Cai X, Han Z, Si J, Chen D** (2022) Jasmonate Signaling Pathway Modulates Plant Defense, Growth, and Their Trade-Offs. *Int J Mol Sci* **23**: 3945
- Li H, Li X, Xuan Y, Jiang J, Wei Y, Piao Z** (2018b) Genome Wide Identification and Expression Profiling of SWEET Genes Family Reveals Its Role During Plasmodiophora brassicae-Induced Formation of Clubroot in Brassica rapa. *Front Plant Sci* **9**: 207
- Li J, Huang Q, Sun M, Zhang T, Li H, Chen B, Xu K, Gao G, Li F, Yan G, et al** (2016a) Global DNA methylation variations after short-term heat shock treatment in cultured microspores of Brassica napus cv. Topas. *Sci Rep* **6**: 38401
- Li J, Philp J, Li J, Wei Y, Li H, Yang K, Ryder M, Toh R, Zhou Y, Denton MD, et al** (2020) Trichoderma harzianum Inoculation Reduces the Incidence of Clubroot Disease in Chinese Cabbage by Regulating the Rhizosphere Microbial Community. *Microorganisms* **8**: 1325
- Li J, Yang Z, Yu B, Liu J, Chen X** (2005) Methylation Protects miRNAs and siRNAs from a 3'-End Uridylation Activity in Arabidopsis. *Current Biology* **15**: 1501–1507
- Li K, Liu Z, Xing L, Wei Y, Mao J, Meng Y, Bao L, Han M, Zhao C, Zhang D** (2019a) miRNAs associated with auxin signaling, stress response, and cellular activities mediate adventitious root formation in apple rootstocks. *Plant Physiology and Biochemistry* **139**: 66–81
- Li L, Luo Y, Chen B, Xu K, Zhang F, Li H, Huang Q, Xiao X, Zhang T, Hu J, et al** (2016b) A Genome-Wide Association Study Reveals New Loci for Resistance to Clubroot Disease in Brassica napus. *Frontiers in Plant Science* **7**:
- Li LX, Agborbesong E, Zhang L, Li X** (2019b) Investigation of epigenetics in kidney cell biology. *Methods in Cell Biology*. Elsevier, pp 255–278
- Li M, Yu B** (2021) Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis. *RNA Biol* **18**: 2087–2096
- Li N, Euring D, Cha JY, Lin Z, Lu M, Huang L-J, Kim WY** (2021a) Plant Hormone-Mediated Regulation of Heat Tolerance in Response to Global Climate Change. *Frontiers in Plant Science* **11**:
- Li N, Han X, Feng D, Yuan D, Huang L-J** (2019c) Signaling Crosstalk between Salicylic Acid and Ethylene/Jasmonate in Plant Defense: Do We Understand What They Are Whispering? *Int J Mol Sci* **20**: 671

- Li Q, Shah N, Zhou X, Wang H, Yu W, Luo J, Liu Y, Li G, Liu C, Zhang C, et al** (2021b) Identification of Micro Ribonucleic Acids and Their Targets in Response to *Plasmodiophora brassicae* Infection in *Brassica napus*. *Front Plant Sci* **12**: 734419
- Li T, Li H, Zhang Y-X, Liu J-Y** (2011) Identification and analysis of seven H₂O₂-responsive miRNAs and 32 new miRNAs in the seedlings of rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica). *Nucleic Acids Research* **39**: 2821–2833
- Li X, Wang X, Zhang S, Liu D, Duan Y, Dong W** (2012) Identification of Soybean MicroRNAs Involved in Soybean Cyst Nematode Infection by Deep Sequencing. *PLOS ONE* **7**: e39650
- Liao R, Wei X, Zhao Y, Xie Z, Nath UK, Yang S, Su H, Wang Z, Li L, Tian B, et al** (2023) bra-miR167a Targets ARF8 and Negatively Regulates *Arabidopsis thaliana* Immunity against *Plasmodiophora brassicae*. *International Journal of Molecular Sciences* **24**: 11850
- Liao Y, Smyth GK, Shi W** (2014) featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics* **30**: 923–930
- Licausi F, Weits DA, Pant BD, Scheible W-R, Geigenberger P, van Dongen JT** (2011) Hypoxia responsive gene expression is mediated by various subsets of transcription factors and miRNAs that are determined by the actual oxygen availability. *New Phytologist* **190**: 442–456
- Lichtenthaler HK** (1998) The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Annals NY Acad Sci* **851**: 187–198
- Lichtenthaler HK** (1996) Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *Journal of Plant Physiology* **148**: 4–14
- Liégard B, Baillet V, Etcheverry M, Joseph E, Lariagon C, Lemoine J, Evrard A, Colot V, Gravot A, Manzanares-Dauleux MJ, et al** (2019a) Quantitative resistance to clubroot infection mediated by transgenerational epigenetic variation in *Arabidopsis*. *New Phytol* **222**: 468–479
- Liégard B, Gravot A, Quadrana L, Aigu Y, Bénéjam J, Lariagon C, Lemoine J, Colot V, Manzanares-Dauleux MJ, Jubault M** (2019b) Natural Epiallelic Variation is Associated with Quantitative Resistance to the Pathogen *Plasmodiophora brassicae*. doi: 10.1101/776989
- Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S, Jacobsen SE** (2001) Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for Maintenance of CpXpG Methylation. *Science* **292**: 2077–2080
- Lisch D** (2013) How important are transposons for plant evolution? *Nat Rev Genet* **14**: 49–61
- Liu B, Martre P, Ewert F, Porter JR, Challinor AJ, Müller C, Ruane AC, Waha K, Thornburn PJ, Aggarwal PK, et al** (2019) Global wheat production with 1.5 and 2.0°C above pre-industrial warming. *Global Change Biology* **25**: 1428–1444

- Liu B, Sun L, Ma L, Hao F-S** (2017) Both AtrbohD and AtrbohF are essential for mediating responses to oxygen deficiency in Arabidopsis. *Plant Cell Rep* **36**: 947–957
- Liu D, Song Y, Chen Z, Yu D** (2009) Ectopic expression of miR396 suppresses GRF target gene expression and alters leaf growth in Arabidopsis. *Physiologia Plantarum* **136**: 223–236
- Liu G, Xia Y, Liu T, Dai S, Hou X** (2018) The DNA Methylome and Association of Differentially Methylated Regions with Differential Gene Expression during Heat Stress in Brassica rapa. *International Journal of Molecular Sciences* **19**: 1414
- Liu H, Nwafor CC, Piao Y, Li X, Zhan Z, Piao Z** (2022) Identification and Characterization of Circular RNAs in Brassica rapa in Response to Plasmodiophora brassicae. *Int J Mol Sci* **23**: 5369
- Liu J, Feng L, Li J, He Z** (2015) Genetic and epigenetic control of plant heat responses. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2015.00267
- Liu J, He Y, Amasino R, Chen X** (2004) siRNAs targeting an intronic transposon in the regulation of natural flowering behavior in Arabidopsis. *Genes Dev* **18**: 2873–2878
- Liu L, Qin L, Cheng X, Zhang Y, Xu L, Liu F, Tong C, Huang J, Liu S, Wei Y** (2020a) Comparing the Infection Biology of Plasmodiophora brassicae in Clubroot Susceptible and Resistant Hosts and Non-hosts. *Front Microbiol* **11**: 507036
- Liu L, Qin L, Zhou Z, Hendriks WGHM, Liu S, Wei Y** (2020b) Refining the Life Cycle of Plasmodiophora brassicae. *Phytopathology®* **110**: 1704–1712
- Liu R, Lang Z** (2020) The mechanism and function of active DNA demethylation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **62**: 148–159
- Liu Y, Sun T, Sun Y, Zhang Y, Radojčić A, Ding Y, Tian H, Huang X, Lan J, Chen S, et al** (2020c) Diverse Roles of the Salicylic Acid Receptors NPR1 and NPR3/NPR4 in Plant Immunity. *Plant Cell* **32**: 4002–4016
- Liu Y, Zhang Y-M, Tang Y, Chen J-Q, Shao Z-Q** (2023) The evolution of plant NLR immune receptors and downstream signal components. *Current Opinion in Plant Biology* **73**: 102363
- Lobell DB, Schlenker W, Costa-Roberts J** (2011) Climate Trends and Global Crop Production Since 1980. *Science* **333**: 616–620
- Long Y, Xia W, Li R, Wang J, Shao M, Feng J, King GJ, Meng J** (2011) Epigenetic QTL Mapping in Brassica napus. *Genetics* **189**: 1093–1102
- López A, Ramírez V, García-Andrade J, Flors V, Vera P** (2011) The RNA Silencing Enzyme RNA Polymerase V Is Required for Plant Immunity. *PLoS Genet* **7**: e1002434
- Loreti E, Betti F, Ladera-Carmona MJ, Fontana F, Novi G, Valeri MC, Perata P** (2020) ARGONAUTE1 and ARGONAUTE4 Regulate Gene Expression and Hypoxia Tolerance1[OPEN]. *Plant Physiol* **182**: 287–300

- Lovelock DA, Donald CE, Conlan XA, Cahill DM** (2013) Salicylic acid suppression of clubroot in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) caused by the obligate biotroph *Plasmodiophora brassicae*. *Australasian Plant Pathol* **42**: 141–153
- Lu D, Wu S, Gao X, Zhang Y, Shan L, He P** (2010) A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proc Natl Acad Sci USA* **107**: 496–501
- Lu W, Xiao L, Quan M, Wang Q, El-Kassaby YA, Du Q, Zhang D** (2020) Linkage-linkage disequilibrium dissection of the epigenetic quantitative trait loci (epiQTLs) underlying growth and wood properties in *Populus*. *New Phytol* **225**: 1218–1233
- Ludwig-Müller J** (2009) Glucosinolates and the clubroot disease: defense compounds or auxin precursors? *Phytochem Rev* **8**: 135–148
- Ludwig-Müller J, Bendel U, Thermann P, Ruppel M, Epstein E, Hilgenberg W** (1993) Concentrations of indole-3-acetic acid in plants of tolerant and susceptible varieties of Chinese cabbage infected with *Plasmodiophora brassicae* Woron. *New Phytologist* **125**: 763–769
- Ludwig-Müller J, Pieper K, Ruppel M, Cohen JD, Epstein E, Kiddle G, Bennett R** (1999) Indole glucosinolate and auxin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. glucosinolate mutants and the development of clubroot disease. *Planta* **208**: 409–419
- Ludwig-Müller J, Schubert B, Pieper K, Ihmig S, Hilgenberg W** (1997) Glucosinolate content in susceptible and resistant chinese cabbage varieties during development of clubroot disease. *Phytochemistry* **44**: 407–414
- Luger K, Mäder AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ** (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature* **389**: 251–260
- Luo D, Carpenter R, Vincent C, Copsey L, Coen E** (1996) Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*. *Nature* **383**: 794–799
- Luo H-T, Zhang J-Y, Wang G, Jia Z-H, Huang S-N, Wang T, Guo Z-R** (2017) Functional Characterization of Waterlogging and Heat Stresses Tolerance Gene Pyruvate decarboxylase 2 from *Actinidia deliciosa*. *International Journal of Molecular Sciences* **18**: 2377
- Ma B, Wang S, Wu W, Shan P, Chen Y, Meng J, Xing L, Yun J, Hao L, Wang X, et al** (2023) Mechanisms of circRNA/lncRNA-miRNA interactions and applications in disease and drug research. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **162**: 114672
- Ma S, Churkina G, Trusilova K** (2012) Investigating the impact of climate change on crop phenological events in Europe with a phenology model. *Int J Biometeorol* **56**: 749–763
- Macfarlane I** (1952) FACTORS AFFECTING THE SURVIVAL OF PLASMODIOPHORA BRASSICAE WOR. IN THE SOIL AND ITS ASSESSMENT BY A HOST TEST. *Ann Applied Biology* **39**: 239–256
- Macho AP, Zipfel C** (2014) Plant PRRs and the Activation of Innate Immune Signaling. *Molecular Cell* **54**: 263–272

- Macioszek VK, Jęcz T, Ciereszko I, Kononowicz AK** (2023) Jasmonic Acid as a Mediator in Plant Response to Necrotrophic Fungi. *Cells* **12**: 1027
- Malagnac F, Bartee L, Bender J** (2002) An Arabidopsis SET domain protein required for maintenance but not establishment of DNA methylation. *The EMBO Journal* **21**: 6842–6852
- Malinowski R, Novák O, Borhan MH, Spíchal L, Strnad M, Rolfe SA** (2016) The role of cytokinins in clubroot disease. *Eur J Plant Pathol* **145**: 543–557
- Mallory AC, Dugas DV, Bartel DP, Bartel B** (2004) MicroRNA Regulation of NAC-Domain Targets Is Required for Proper Formation and Separation of Adjacent Embryonic, Vegetative, and Floral Organs. *Current Biology* **14**: 1035–1046
- Manavella PA, Hagmann J, Ott F, Laubinger S, Franz M, Macek B, Weigel D** (2012) Fast-Forward Genetics Identifies Plant CPL Phosphatases as Regulators of miRNA Processing Factor HYL1. *Cell* **151**: 859–870
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson AJ, King GJ, Giovannoni JJ, Seymour GB** (2006) A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet* **38**: 948–952
- Manzanares-Dauleux MJ, Delourme R, Baron F, Thomas G** (2000a) Mapping of one major gene and of QTLs involved in resistance to clubroot in *Brassica napus*. *Theor Appl Genet* **101**: 885–891
- Manzanares-Dauleux MJ, Divaret I, Baron F, Thomas G** (2000b) Evaluation of French *Brassica oleracea* landraces for resistance to *Plasmodiophora brassicae*. 8
- Marchadier E, Hanemian M, Tisné S, Bach L, Bazakos C, Gilbault E, Haddadi P, Virlovet L, Loudet O** (2019) The complex genetic architecture of shoot growth natural variation in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS Genetics* **15**: e1007954
- Marchin RM, Ossola A, Leishman MR, Ellsworth DS** (2020) A Simple Method for Simulating Drought Effects on Plants. *Frontiers in Plant Science* 10:
- Mareri L, Parrotta L, Cai G** (2022) Environmental Stress and Plants. *IJMS* **23**: 5416
- Marin E, Jouannet V, Herz A, Lokerse AS, Weijers D, Vaucheret H, Nussaume L, Crespi MD, Maizel A** (2010) miR390, *Arabidopsis TAS3* tasiRNAs, and Their *AUXIN RESPONSE FACTOR* Targets Define an Autoregulatory Network Quantitatively Regulating Lateral Root Growth. *The Plant Cell* **22**: 1104–1117
- Martin A, Troadec C, Boualem A, Rajab M, Fernandez R, Morin H, Pitrat M, Dogimont C, Bendahmane A** (2009) A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* **461**: 1135–1138
- Mathieu J, Yant LJ, Mürdter F, Küttner F, Schmid M** (2009) Repression of Flowering by the miR172 Target SMZ. *PLOS Biology* **7**: e1000148

- Matsumoto E, Yasui C, Ohi M, Tsukada M** (1998) Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Euphytica* **104**: 79–86
- Maugarny-Calès A, Cortizo M, Adroher B, Borrega N, Gonçalves B, Brunoud G, Vernoux T, Arnaud N, Laufs P** (2019) Dissecting the pathways coordinating patterning and growth by plant boundary domains. *PLoS Genet* **15**: e1007913
- Mayek-Pérez N, García-Espinosa R, López-Castañeda Cá, Acosta-Gallegos JA, Simpson J** (2002) Water relations, histopathology and growth of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) during pathogenesis of *Macrophomina phaseolina* under drought stress. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **60**: 185–195
- McKay JK, Richards JH, Nemali KS, Sen S, Mitchell-Olds T, Boles S, Stahl EA, Wayne T, Juenger TE** (2008) GENETICS OF DROUGHT ADAPTATION IN *ARABIDOPSIS THALIANA* II. QTL ANALYSIS OF A NEW MAPPING POPULATION, KAS-1 × TSU-1. *Evolution* **62**: 3014–3026
- Medina C, Rocha M, Magliano M, Ratpopoulo A, Revel B, Marteu N, Magnone V, Lebrigand K, Cabrera J, Barcala M, et al** (2017) Characterization of microRNAs from *Arabidopsis* galls highlights a role for miR159 in the plant response to the root-knot nematode *Meloidogyne incognita*. *New Phytol* **216**: 882–896
- Megraw M, Baev V, Rusinov V, Jensen ST, Kalantidis K, Hatzigeorgiou AG** (2006) MicroRNA promoter element discovery in *Arabidopsis*. *RNA* **12**: 1612–1619
- Melotto M, Underwood W, Koczan J, Nomura K, He SY** (2006) Plant Stomata Function in Innate Immunity against Bacterial Invasion. *Cell* **126**: 969–980
- de Mendoza A, Nguyen TV, Ford E, Poppe D, Buckberry S, Pflueger J, Grimmer MR, Stolzenburg S, Bogdanovic O, Oshlack A, et al** (2022) Large-scale manipulation of promoter DNA methylation reveals context-specific transcriptional responses and stability. *Genome Biology* **23**: 163
- Meng X, Xu J, He Y, Yang K-Y, Mordorski B, Liu Y, Zhang S** (2013) Phosphorylation of an ERF Transcription Factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 Regulates Plant Defense Gene Induction and Fungal Resistance. *The Plant Cell* **25**: 1126–1142
- Mexal J, Fisher JT, Osteryoung J, Reid CPP** (1975) Oxygen Availability in Polyethylene Glycol Solutions and Its Implications in Plant-Water Relations 1. *Plant Physiology* **55**: 20–24
- Mi S, Cai T, Hu Y, Chen Y, Hodges E, Ni F, Wu L, Li S, Zhou H, Long C, et al** (2008) Sorting of Small RNAs into *Arabidopsis* Argonaute Complexes Is Directed by the 5' Terminal Nucleotide. *Cell* **133**: 116–127
- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz S, Mittler R** (2010) Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant, Cell & Environment* **33**: 453–467

- Miura K, Agetsuma M, Kitano H, Yoshimura A, Matsuoka M, Jacobsen SE, Ashikari M** (2009) A metastable DWARF1 epigenetic mutant affecting plant stature in rice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11218–11223
- Moglia A, Gianoglio S, Acquadro A, Valentino D, Milani AM, Lanteri S, Comino C** (2019) Identification of DNA methyltransferases and demethylases in *Solanum melongena* L., and their transcription dynamics during fruit development and after salt and drought stresses. *PLOS ONE* **14**: e0223581
- Moldovan D, Spriggs A, Yang J, Pogson BJ, Dennis ES, Wilson IW** (2010) Hypoxia-responsive microRNAs and trans-acting small interfering RNAs in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **61**: 165–177
- Mondal S, Singh RP, Crossa J, Huerta-Espino J, Sharma I, Chatrath R, Singh GP, Sohu VS, Mavi GS, Sukuru VSP, et al** (2013) Earliness in wheat: A key to adaptation under terminal and continual high temperature stress in South Asia. *Field Crops Research* **151**: 19–26
- Monteiro F, Nishimura MT** (2018) Structural, Functional, and Genomic Diversity of Plant NLR Proteins: An Evolved Resource for Rational Engineering of Plant Immunity. *Annual Review of Phytopathology* **56**: 243–267
- Morales-Ruiz T, Ortega-Galisteo AP, Ponferrada-Marín MI, Martínez-Macías MI, Ariza RR, Roldán-Arjona T** (2006) DEMETER and REPRESSOR OF SILENCING 1 encode 5-methylcytosine DNA glycosylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 6853–6858
- Morrison MJ, Stewart DW** (2002) Heat Stress during Flowering in Summer Brassica. *Crop Sci* **42**: 797–803
- Mosa KA, Ismail A, Helmy M** (2017) Introduction to Plant Stresses. *In* KA Mosa, A Ismail, M Helmy, eds, *Plant Stress Tolerance: An Integrated Omics Approach*. Springer International Publishing, Cham, pp 1–19
- Moxham SE, Buczacki ST** (1983) Chemical composition of the resting spore wall of *Plasmodiophora brassicae*. *Transactions of the British Mycological Society* **80**: 297–304
- Mühlenbock P, Plaszczyca M, Plaszczyca M, Mellerowicz E, Karpinski S** (2007) Lysigenous Aerenchyma Formation in *Arabidopsis* Is Controlled by LESION SIMULATING DISEASE1. *The Plant Cell* **19**: 3819–3830
- Müller P, Hilgenberg W** (1986) Isomers of zeatin and zeatin riboside in clubroot tissue: evidence for trans-zeatin biosynthesis by *Plasmodiophora brassicae*. *Physiologia Plantarum* **66**: 245–250
- Müller R, Morant M, Jarmer H, Nilsson L, Nielsen TH** (2007) Genome-Wide Analysis of the *Arabidopsis* Leaf Transcriptome Reveals Interaction of Phosphate and Sugar Metabolism. *Plant Physiology* **143**: 156–171
- Munns R, James RA, Sirault XRR, Furbank RT, Jones HG** (2010) New phenotyping methods for screening wheat and barley for beneficial responses to water deficit. *Journal of Experimental Botany* **61**: 3499–3507

- Muyle AM, Seymour DK, Lv Y, Huettel B, Gaut BS** (2022) Gene Body Methylation in Plants: Mechanisms, Functions, and Important Implications for Understanding Evolutionary Processes. *Genome Biology and Evolution* **14**: evac038
- Myers DF** (1985) Lime and the Control of Clubroot of Crucifers: Effects of pH, Calcium, Magnesium, and Their Interactions. *Phytopathology* **75**: 670
- Mysore KS, Ryu C-M** (2004) Nonhost resistance: how much do we know? *Trends in Plant Science* **9**: 97–104
- Nagaoka T, Doullah MAU, Matsumoto S, Kawasaki S, Ishikawa T, Hori H, Okazaki K** (2010) Identification of QTLs that control clubroot resistance in *Brassica oleracea* and comparative analysis of clubroot resistance genes between *B. rapa* and *B. oleracea*. *Theor Appl Genet* **120**: 1335–1346
- Nakabayashi R, Yonekura-Sakakibara K, Urano K, Suzuki M, Yamada Y, Nishizawa T, Matsuda F, Kojima M, Sakakibara H, Shinozaki K, et al** (2014) Enhancement of oxidative and drought tolerance in *Arabidopsis* by overaccumulation of antioxidant flavonoids. *The Plant Journal* **77**: 367–379
- Navarro L, Dunoyer P, Jay F, Arnold B, Dharmasiri N, Estelle M, Voinnet O, Jones JDG** (2006) A Plant miRNA Contributes to Antibacterial Resistance by Repressing Auxin Signaling. *Science* **312**: 436–439
- Navarro L, Zipfel C, Rowland O, Keller I, Robatzek S, Boller T, Jones JDG** (2004) The Transcriptional Innate Immune Response to flg22. Interplay and Overlap with Avr Gene-Dependent Defense Responses and Bacterial Pathogenesis. *Plant Physiology* **135**: 1113–1128
- Naydenov M, Baev V, Apostolova E, Gospodinova N, Sablok G, Gozmanova M, Yabubyan G** (2015) High-temperature effect on genes engaged in DNA methylation and affected by DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **87**: 102–108
- Ngou BPM, Ahn H-K, Ding P, Jones JDG** (2021) Mutual potentiation of plant immunity by cell-surface and intracellular receptors. *Nature* **592**: 110–115
- Niki T, Mitsuhashi I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y** (1998) Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-Related (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves. *Plant and Cell Physiology* **39**: 500–507
- Nikovics K, Blein T, Peaucelle A, Ishida T, Morin H, Aida M, Laufs P** (2006) The Balance between the *MIR164A* and *CUC2* Genes Controls Leaf Margin Serration in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **18**: 2929–2945
- Niu Y, Figueroa P, Browse J** (2011) Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **62**: 2143–2154
- Niu Y, Wang Y, Li P, Zhang F, Liu H, Zheng G** (2013) Drought stress induces oxidative stress and the antioxidant defense system in ascorbate-deficient *vtc1* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Acta Physiol Plant* **35**: 1189–1200

- Niwa R, Kumei T, Nomura Y, Yoshida S, Osaki M, Ezawa T** (2007) Increase in soil pH due to Ca-rich organic matter application causes suppression of the clubroot disease of crucifers. *Soil Biology and Biochemistry* **39**: 778–785
- Nomoto Y, Kubozono S, Miyachi M, Yamashino T, Nakamichi N, Mizuno T** (2012) A Circadian Clock- and PIF4-Mediated Double Coincidence Mechanism is Implicated in the Thermosensitive Photoperiodic Control of Plant Architectures in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **53**: 1965–1973
- Noureddine Y, Mejias J, da Rocha M, Thomine S, Quentin M, Abad P, Favery B, Jaubert-Possamai S** (2022) Copper microRNAs modulate the formation of giant feeding cells induced by the root knot nematode *Meloidogyne incognita* in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **236**: 283–295
- Nussey DH, Wilson AJ, Brommer JE** (2007) The evolutionary ecology of individual phenotypic plasticity in wild populations. *Journal of Evolutionary Biology* **20**: 831–844
- O'Brien P, Kral-O'Brien K, Hatfield JL** (2021) Agronomic approach to understanding climate change and food security. *Agronomy Journal* **113**: 4616–4626
- Ochoa JC, Mukhopadhyay S, Bieluszewski T, Jędryczka M, Malinowski R, Truman W** (2023) Natural variation in *Arabidopsis* responses to *Plasmodiophora brassicae* reveals an essential role for Resistance to *Plasmodiophora brassicae* 1 (RPB1). *The Plant Journal*. doi: 10.1111/tpj.16438
- Olszak M, Truman W, Stefanowicz K, Sliwiska E, Ito M, Walerowski P, Rolfe S, Malinowski R** (2019) Transcriptional profiling identifies critical steps of cell cycle reprogramming necessary for *Plasmodiophora brassicae* -driven gall formation in *Arabidopsis*. *Plant J* **97**: 715–729
- Omony J, Nussbaumer T, Gutzat R** (2020) DNA methylation analysis in plants: review of computational tools and future perspectives. *Brief Bioinform* **21**: 906–918
- Ong-Abdullah M, Ordway JM, Jiang N, Ooi S-E, Kok S-Y, Sarpan N, Azimi N, Hashim AT, Ishak Z, Rosli SK, et al** (2015) Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. *Nature* **525**: 533–537
- Onodera Y, Haag JR, Ream T, Nunes PC, Pontes O, Pikaard CS** (2005) Plant Nuclear RNA Polymerase IV Mediates siRNA and DNA Methylation-Dependent Heterochromatin Formation. *Cell* **120**: 613–622
- Orgeur G, Hestin C, Delaunay A, Lebourg D, Bagot P, Corbel A, Perrot S, Manzanares-Dauleux MJ, Grimault V** (2016) Vol50-13-Grimault.pdf. *Innovations Agronomiques* 145–155
- Otero S, Desvoyes B, Peiró R, Gutierrez C** (2016) Histone H3 Dynamics Reveal Domains with Distinct Proliferation Potential in the *Arabidopsis* Root. *The Plant Cell* **28**: 1361–1371
- Padrón-Rodríguez L, Cerdán Cabrera CR, Sánchez Coello NG, Luna-Rodríguez M, Pérez-López E** (2022) *Plasmodiophora brassicae* in Mexico: From Anecdote to Fact. *Plant Disease* **106**: 1832–1836

- Palatnik JF, Wollmann H, Schommer C, Schwab R, Boisbouvier J, Rodriguez R, Warthmann N, Allen E, Dezulian T, Huson D, et al** (2007) Sequence and Expression Differences Underlie Functional Specialization of Arabidopsis MicroRNAs miR159 and miR319. *Developmental Cell* **13**: 115–125
- Pan J, Sharif R, Xu X, Chen X** (2021) Mechanisms of Waterlogging Tolerance in Plants: Research Progress and Prospects. *Front Plant Sci* **11**: 627331
- Pan Q, Wendel J, Fluhr R** (2000) Divergent Evolution of Plant NBS-LRR Resistance Gene Homologues in Dicot and Cereal Genomes. *J Mol Evol* **50**: 203–213
- Pandey P, Ramegowda V, Senthil-Kumar M** (2015) Shared and unique responses of plants to multiple individual stresses and stress combinations: physiological and molecular mechanisms. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2015.00723
- Pang W, Liang Y, Zhan Z, Li X, Piao Z** (2020) Development of a Sinitic Clubroot Differential Set for the Pathotype Classification of *Plasmodiophora brassicae*. *Frontiers in Plant Science* **11**:
- Panstruga R, Moscou MJ** (2020) What is the Molecular Basis of Nonhost Resistance? *MPMI* **33**: 1253–1264
- Park MY, Wu G, Gonzalez-Sulser A, Vaucheret H, Poethig RS** (2005) Nuclear processing and export of microRNAs in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**: 3691–3696
- Park S-W, Kaimoyo E, Kumar D, Mosher S, Klessig DF** (2007) Methyl Salicylate Is a Critical Mobile Signal for Plant Systemic Acquired Resistance. *Science* **318**: 113–116
- Park S-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, et al** (2009) Abscisic acid inhibits PP2Cs via the PYR/PYL family of ABA-binding START proteins. *Science* **324**: 1068–1071
- Park Y-J, Lee H-J, Gil K-E, Kim JY, Lee J-H, Lee H, Cho H-T, Vu LD, De Smet I, Park C-M** (2019) Developmental Programming of Thermonastic Leaf Movement. *Plant Physiol* **180**: 1185–1197
- Parkin IA, Koh C, Tang H, Robinson SJ, Kagale S, Clarke WE, Town CD, Nixon J, Krishnakumar V, Bidwell SL, et al** (2014) Transcriptome and methylome profiling reveals relics of genome dominance in the mesopolyploid *Brassica oleracea*. *Genome Biology* **15**: R77
- Päsold S, Siegel I, Seidel C, Ludwig-Müller J** (2010) Flavonoid accumulation in Arabidopsis thaliana root galls caused by the obligate biotrophic pathogen *Plasmodiophora brassicae*: Flavonoids in Arabidopsis clubroots. *Molecular Plant Pathology* **11**: 545–562
- Pasquinelli AE, Ruvkun G** (2002) Control of Developmental Timing by MicroRNAs and Their Targets. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 495–513
- Paul P, Chhapekar SS, Rameneni JJ, Oh SH, Dhandapani V, Subburaj S, Shin S-Y, Ramchiary N, Shin C, Choi SR, et al** (2021) MiR1885 Regulates Disease Tolerance Genes in *Brassica rapa* during Early Infection with *Plasmodiophora brassicae*. *IJMS* **22**: 9433

- Pedro DLF, Amorim TS, Varani A, Guyot R, Domingues DS, Paschoal AR** (2021) An Atlas of Plant Transposable Elements. *F1000Res* **10**: 1194
- Peláez-Vico MÁ, Tukuli A, Singh P, Mendoza-Cózatl DG, Joshi T, Mittler R** (2023) Rapid systemic responses of *Arabidopsis* to waterlogging stress. doi: 10.1101/2023.03.22.533859
- Peng G, Lahlali R, Hwang S-F, Pageau D, Hynes RK, McDonald MR, Gossen BD, Strelkov SE** (2014) Crop rotation, cultivar resistance, and fungicides/biofungicides for managing clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) on canola. *Canadian Journal of Plant Pathology* **36**: 99–112
- Peng G, McGregor L, Lahlali R, Gossen BD, Hwang SF, Adhikari KK, Strelkov SE, McDonald MR** (2011) Potential biological control of clubroot on canola and crucifer vegetable crops. *Plant Pathology* **60**: 566–574
- Penninckx IAMA, Thomma BPHJ, Buchala A, Métraux J-P, Broekaert WF** (1998) Concomitant Activation of Jasmonate and Ethylene Response Pathways Is Required for Induction of a Plant Defensin Gene in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **10**: 2103–2113
- Pereira G, Pereira J, Santos RB, Figueiredo A** (2022) Uncovering the role of DNA methyltransferases in grapevine – *Plasmopara viticola* interaction: From genome-wide characterization to global methylation patterns. *Gene* **837**: 146693
- Pérez-López E, Hossain MM, Tu J, Waldner M, Todd CD, Kusalik AJ, Wei Y, Bonham-Smith PC** (2020) Transcriptome Analysis Identifies *Plasmodiophora brassicae* Secondary Infection Effector Candidates. *Journal of Eukaryotic Microbiology* **67**: 337–351
- Petell CJ, Loiseau G, Gandy R, Pradhan S, Gowher H** (2017) A refined DNA methylation detection method using MspJI coupled quantitative PCR. *Anal Biochem* **533**: 1–9
- Pfaffl MW** (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research* **29**: e45
- Piao ZY, Deng YQ, Choi SR, Park YJ, Lim YP** (2004) SCAR and CAPS mapping of CRb, a gene conferring resistance to *Plasmodiophora brassicae* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Theor Appl Genet* **108**: 1458–1465
- Pieterse CMJ, Zamioudis C, Berendsen RL, Weller DM, Van Wees SCM, Bakker PAHM** (2014) Induced Systemic Resistance by Beneficial Microbes. *Annu Rev Phytopathol* **52**: 347–375
- Piggott JJ, Townsend CR, Matthaei CD** (2015) Reconceptualizing synergism and antagonism among multiple stressors. *Ecol Evol* **5**: 1538–1547
- Pigliucci M** (2002) Phenotypic Plasticity and Integration in Response to Flooded Conditions in Natural Accessions of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (*Brassicaceae*). *Annals of Botany* **90**: 199–207
- Pilet-Nayel M-L, Moury B, Caffier V, Montarry J, Kerlan M-C, Fournet S, Durel C-E, Delourme R** (2017) Quantitative Resistance to Plant Pathogens in Pyramiding Strategies for Durable Crop Protection. *Front Plant Sci* **8**: 1838

- Plotnikova O, Baranova A, Skoblov M** (2019) Comprehensive Analysis of Human mi-croRNA–mRNA Interactome. *Frontiers in Genetics* **10**:
- Poland JA, Balint-Kurti PJ, Wisser RJ, Pratt RC, Nelson RJ** (2009) Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Science* **14**: 21–29
- Poleshko A, Smith CL, Nguyen SC, Sivaramakrishnan P, Wong KG, Murray JI, Lakadamyali M, Joyce EF, Jain R, Epstein JA** (2019) H3K9me2 orchestrates inheritance of spatial positioning of peripheral heterochromatin through mitosis. *eLife* **8**: e49278
- Poorter H, Fiorani F, Stitt M, Schurr U, Finck A, Gibon Y, Usadel B, Munns R, Atkin OK, Tardieu F, et al** (2012) The art of growing plants for experimental purposes: a practical guide for the plant biologist. *Functional Plant Biol* **39**: 821
- Prakash K, Fournier D** (2017) Deciphering the histone code to build the genome structure. doi: 10.1101/217190
- Prasch CM, Sonnewald U** (2013a) Simultaneous Application of Heat, Drought, and Virus to Arabidopsis Plants Reveals Significant Shifts in Signaling Networks. *Plant Physiol* **162**: 1849–1866
- Prasch CM, Sonnewald U** (2013b) Simultaneous Application of Heat, Drought, and Virus to Arabidopsis Plants Reveals Significant Shifts in Signaling Networks. *Plant Physiol* **162**: 1849–1866
- Pré M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CMJ, Memelink J** (2008) The AP2/ERF Domain Transcription Factor ORA59 Integrates Jasmonic Acid and Ethylene Signals in Plant Defense. *Plant Physiology* **147**: 1347–1357
- Prerostova S, Dobrev P, Konradyova V, Knirsch V, Gaudinova A, Kramna B, Kazda J, Ludwig-Müller J, Vankova R** (2018) Hormonal Responses to Plasmodiophora brassicae Infection in Brassica napus Cultivars Differing in Their Pathogen Resistance. *IJMS* **19**: 4024
- Pritchard L, Birch PRJ** (2014) The zigzag model of plant–microbe interactions: is it time to move on? *Molecular Plant Pathology* **15**: 865–870
- Promchuea S, Zhu Y, Chen Z, Zhang J, Gong Z** (2017) ARF2 coordinates with PLETHORAs and PINs to orchestrate ABA-mediated root meristem activity in *Arabidopsis*: ARF2 mediates PLTs and PINs in ABA signaling. *J Integr Plant Biol* **59**: 30–43
- Provart NJ, Alonso J, Assmann SM, Bergmann D, Brady SM, Brkljacic J, Browse J, Chapple C, Colot V, Cutler S, et al** (2016) 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytologist* **209**: 921–944
- Pulido A, Laufs P** (2010) Co-ordination of developmental processes by small RNAs during leaf development. *Journal of Experimental Botany* **61**: 1277–1291
- Qi X, Li Q, Shen J, Qian C, Xu X, Xu Q, Chen X** (2020) Sugar enhances waterlogging-induced adventitious root formation in cucumber by promoting auxin transport and signalling. *Plant, Cell & Environment* **43**: 1545–1557

- Qian L, Wang X, Luo Y, Sun H, Luo W** (2018) Responses of Cotton at Different Growth Stages to Aeration Stress under the Influence of High Temperature. *Crop Science* **58**: 342–353
- Qian Y, Hu W, Liao J, Zhang J, Ren Q** (2019) The Dynamics of DNA methylation in the maize (*Zea mays* L.) inbred line B73 response to heat stress at the seedling stage. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **512**: 742–749
- Qin L, Zhao L, Wu C, Qu S, Wang S** (2021) Identification of microRNA transcriptome in apple response to *Alternaria alternata* infection and evidence that miR390 is negative regulator of defense response. *Scientia Horticulturae* **289**: 110435
- Qiu D, Morgan C, Shi J, Long Y, Liu J, Li R, Zhuang X, Wang Y, Tan X, Dietrich E, et al** (2006) A comparative linkage map of oilseed rape and its use for QTL analysis of seed oil and erucic acid content. *Theor Appl Genet* **114**: 67–80
- Qu L, Sun M, Li X, He R, Zhong M, Luo D, Liu X, Zhao X** (2020) The Arabidopsis F-box protein FOF2 regulates ABA-mediated seed germination and drought tolerance. *Plant Science* **301**: 110643
- Quadrana L, Bortolini Silveira A, Mayhew GF, LeBlanc C, Martienssen RA, Jeddelloh JA, Colot V** (2016) The Arabidopsis thaliana mobilome and its impact at the species level. *eLife* **5**: e15716
- Quadrana L, Colot V** (2016) Plant Transgenerational Epigenetics. *Annu Rev Genet* **50**: 467–491
- Quan W, Liu X, Wang H, Chan Z** (2016) Comparative Physiological and Transcriptional Analyses of Two Contrasting Drought Tolerant Alfalfa Varieties. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2015.01256
- R Core Team** (2022) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing.
- Rahman TAE, Oirdi ME, Gonzalez-Lamothe R, Bouarab K** (2012) Necrotrophic Pathogens Use the Salicylic Acid Signaling Pathway to Promote Disease Development in Tomato. *MPMI* **25**: 1584–1593
- Raja V, Qadir SU, Alyemni MN, Ahmad P** (2020) Impact of drought and heat stress individually and in combination on physio-biochemical parameters, antioxidant responses, and gene expression in *Solanum lycopersicum*. *3 Biotech* **10**: 208
- Rakei A, Maali-Amiri R, Zeinali H, Ranjbar M** (2016) DNA methylation and physio-biochemical analysis of chickpea in response to cold stress. *Protoplasma* **253**: 61–76
- Raman S, Greb T, Peaucelle A, Blein T, Laufs P, Theres K** (2008) Interplay of miR164, *CUP-SHAPED COTYLEDON* genes and *LATERAL SUPPRESSOR* controls axillary meristem formation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **55**: 65–76
- Rani P, Saini I, Singh N, Kaushik P, Wijaya L, Al-Barty A, Darwish H, Noureldeen A** (2021) Effect of potassium fertilizer on the growth, physiological parameters, and water

status of Brassica juncea cultivars under different irrigation regimes. PLOS ONE **16**: e0257023

- Raschke A, Ibañez C, Ullrich KK, Anwer MU, Becker S, Glöckner A, Trenner J, Denk K, Saal B, Sun X, et al** (2015) Natural variants of ELF3 affect thermomorphogenesis by transcriptionally modulating PIF4-dependent auxin response genes. BMC Plant Biology **15**: 197
- Rasmussen S, Barah P, Suarez-Rodriguez MC, Bressendorff S, Friis P, Costantino P, Bones AM, Nielsen HB, Mundy J** (2013) Transcriptome Responses to Combinations of Stresses in Arabidopsis. Plant Physiology **161**: 1783–1794
- Raudvere U, Kolberg L, Kuzmin I, Arak T, Adler P, Peterson H, Vilo J** (2019) g:Profiler: a web server for functional enrichment analysis and conversions of gene lists (2019 update). Nucleic Acids Research **47**: W191–W198
- Rauf M, Arif M, Fisahn J, Xue G-P, Balazadeh S, Mueller-Roeber B** (2013) NAC Transcription Factor SPEEDY HYPOPLASTIC GROWTH Regulates Flooding-Induced Leaf Movement in Arabidopsis. Plant Cell **25**: 4941–4955
- Raza A, Hafeez MB, Zahra N, Shaukat K, Umbreen S, Tabassum J, Charagh S, Khan RSA, Hasanuzzaman M** (2020) The Plant Family Brassicaceae: Introduction, Biology, And Importance. In M Hasanuzzaman, ed, The Plant Family Brassicaceae. Springer Singapore, Singapore, pp 1–43
- Raza A, Razzaq A, Mehmood S, Zou X, Zhang X, Lv Y, Xu J** (2019) Impact of Climate Change on Crops Adaptation and Strategies to Tackle Its Outcome: A Review. Plants **8**: 34
- Reinders J, Wulff BBH, Mirouze M, Mari-Ordóñez A, Dapp M, Rozhon W, Bucher E, Theiler G, Paszkowski J** (2009) Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic Arabidopsis epigenomes. Genes Dev **23**: 939–950
- Ren G, Xie M, Zhang S, Vinovskis C, Chen X, Yu B** (2014) Methylation protects microRNAs from an AGO1-associated activity that uridylylates 5' RNA fragments generated by AGO1 cleavage. Proceedings of the National Academy of Sciences **111**: 6365–6370
- Richards EJ** (2011) Natural epigenetic variation in plant species: a view from the field. Current Opinion in Plant Biology **14**: 204–209
- Rizhsky L, Liang H, Shuman J, Shulaev V, Davletova S, Mittler R** (2004a) When Defense Pathways Collide. The Response of Arabidopsis to a Combination of Drought and Heat Stress. Plant Physiology **134**: 1683–1696
- Robin AHK, Saha G, Laila R, Park J-I, Kim H-T, Nou I-S** (2020) Expression and Role of Biosynthetic, Transporter, Receptor, and Responsive Genes for Auxin Signaling during Clubroot Disease Development. Int J Mol Sci **21**: 5554
- Rocherieux J, Glory P, Giboulot A, Boury S, Barbeyron G, Thomas G, Manzanares-Dauleux MJ** (2004) Isolate-specific and broad-spectrum QTLs are involved in the control of clubroot in Brassica oleracea. Theor Appl Genet **108**: 1555–1563

- Rodriguez RE, Ercoli MF, Debernardi JM, Breakfield NW, Mecchia MA, Sabatini M, Cools T, De Veylder L, Benfey PN, Palatnik JF** (2015) MicroRNA miR396 Regulates the Switch between Stem Cells and Transit-Amplifying Cells in Arabidopsis Roots. *Plant Cell* **27**: 3354–3366
- Rodriguez RE, Mecchia MA, Debernardi JM, Schommer C, Weigel D, Palatnik JF** (2010) Control of cell proliferation in *Arabidopsis thaliana* by microRNA miR396. *Development* **137**: 103–112
- Rodriguez RE, Schommer C, Palatnik JF** (2016) Control of cell proliferation by microRNAs in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **34**: 68–76
- Röhl U, Bralower TJ, Norris RD, Wefer G** (2000) New chronology for the late Paleocene thermal maximum and its environmental implications. *Geology* **28**: 927–930
- Röhl U, Westerhold T, Bralower TJ, Zachos JC** (2007) On the duration of the Paleocene-Eocene thermal maximum (PETM): PALEOCENE-EOCENE THERMAL MAXIMUM. *Geochem Geophys Geosyst* **8**: n/a-n/a
- Rolfe SA, Strelkov SE, Links MG, Clarke WE, Robinson SJ, Djavaheri M, Malinowski R, Haddadi P, Kagale S, Parkin IAP, et al** (2016) The compact genome of the plant pathogen *Plasmodiophora brassicae* is adapted to intracellular interactions with host *Brassica* spp. *BMC Genomics* **17**: 272
- Roudier F, Ahmed I, Bérard C, Sarazin A, Mary-Huard T, Cortijo S, Bouyer D, Caillieux E, Duvernois-Berthet E, Al-Shikhley L, et al** (2011) Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in Arabidopsis. *The EMBO Journal* **30**: 1928–1938
- Rousseau-Gueutin M, Belser C, Da Silva C, Richard G, Istace B, Cruaud C, Falentin C, Boideau F, Boutte J, Delourme R, et al** (2020) Long-read assembly of the *Brassica napus* reference genome Darmor-bzh. *Gigascience* **9**: gaaa137
- Roux F, Voisin D, Badet T, Balagué C, Barlet X, Huard-Chauveau C, Roby D, Raffaele S** (2014) Resistance to phytopathogens *e tutti quanti*: placing plant quantitative disease resistance on the map: Quantitative disease resistance in plants. *Molecular Plant Pathology* **15**: 427–432
- Rovenich H, Boshoven JC, Thomma BP** (2014) Filamentous pathogen effector functions: of pathogens, hosts and microbiomes. *Current Opinion in Plant Biology* **20**: 96–103
- Rubio-Somoza I, Weigel D** (2011) MicroRNA networks and developmental plasticity in plants. *Trends in Plant Science* **16**: 258–264
- Rutowicz K, Puzio M, Halibart-Puzio J, Lirski M, Kotliński M, Kroteń MA, Knizewski L, Lange B, Muszewska A, Śniegowska-Świerk K, et al** (2015) A Specialized Histone H1 Variant Is Required for Adaptive Responses to Complex Abiotic Stress and Related DNA Methylation in Arabidopsis. *Plant Physiology* **169**: 2080–2101
- Sakamoto K, Saito A, Hayashida N, Taguchi G, Matsumoto E** (2008) Mapping of isolate-specific QTLs for clubroot resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Theor Appl Genet* **117**: 759–767

- Salehin M, Li B, Tang M, Katz E, Song L, Ecker JR, Kliebenstein DJ, Estelle M** (2019) Auxin-sensitive Aux/IAA proteins mediate drought tolerance in Arabidopsis by regulating glucosinolate levels. *Nat Commun* **10**: 4021
- Samarah NH, Alqudah AM, Amayreh JA, McAndrews GM** (2009) The Effect of Late-terminal Drought Stress on Yield Components of Four Barley Cultivars. *Journal of Agronomy and Crop Science* **195**: 427–441
- Samuel G, Garrett SD** (1945) The infected root-hair count for estimating the activity of *Plasmodiophora brassicae* Woron. in the soil. *Annals of Applied Biology* **32**: 96–101
- Sanchez-Bermejo E, Zhu W, Tasset C, Eimer H, Sureshkumar S, Singh R, Sundaramoorthi V, Colling L, Balasubramanian S** (2015) Genetic Architecture of Natural Variation in Thermal Responses of Arabidopsis1[OPEN]. *Plant Physiol* **169**: 647–659
- Savchenko T, Rolletschek H, Heinzl N, Tikhonov K, Dehesh K** (2019) Waterlogging tolerance rendered by oxylipin-mediated metabolic reprogramming in Arabidopsis. *J Exp Bot* **70**: 2919–2932
- Saze H, Scheid OM, Paszkowski J** (2003) Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nat Genet* **34**: 65–69
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T, Preibisch S, Rueden C, Saalfeld S, Schmid B, et al** (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**: 676–682
- Schmitz RJ, Schultz MD, Lewsey MG, O'Malley RC, Urich MA, Libiger O, Schork NJ, Ecker JR** (2011) Transgenerational Epigenetic Instability Is a Source of Novel Methylation Variants. *Science* **334**: 369–373
- Schommer C, Debernardi JM, Bresso EG, Rodriguez RE, Palatnik JF** (2014) Repression of Cell Proliferation by miR319-Regulated TCP4. *Molecular Plant* **7**: 1533–1544
- Schommer C, Palatnik JF, Aggarwal P, Chételat A, Cubas P, Farmer EE, Nath U, Weigel D** (2008) Control of Jasmonate Biosynthesis and Senescence by miR319 Targets. *PLoS Biol* **6**: e230
- Schuller A, Kehr J, Ludwig-Müller J** (2014) Laser Microdissection Coupled to Transcriptional Profiling of Arabidopsis Roots Inoculated by *Plasmodiophora brassicae* Indicates a Role for Brassinosteroids in Clubroot Formation. *Plant and Cell Physiology* **55**: 392–411
- Schwelm A, Dixelius C, Ludwig-Müller J** (2016) New kid on the block – the clubroot pathogen genome moves the plasmodiophorids into the genomic era. *Eur J Plant Pathol* **145**: 531–542
- Schwelm A, Fogelqvist J, Knaust A, Jülke S, Lilja T, Bonilla-Rosso G, Karlsson M, Shevchenko A, Dhandapani V, Choi SR, et al** (2015) The *Plasmodiophora brassicae* genome reveals insights in its life cycle and ancestry of chitin synthases. *Sci Rep* **5**: 11153

- Sedaghatkish A, Gossen BD, Yu F, Torkamaneh D, McDonald MR** (2019) Whole-genome DNA similarity and population structure of *Plasmodiophora brassicae* strains from Canada. *BMC Genomics* **20**: 744
- Seiber J, Knuteson J, Woodrow J, Wolfe N** (1997) Fumigants Environmental Fate, Exposure, and Analysis. *Applied Categorical Structures - ACS*
- Sequeira-Mendes J, Aragüez I, Peiró R, Mendez-Giraldez R, Zhang X, Jacobsen SE, Bastolla U, Gutierrez C** (2014) The Functional Topography of the *Arabidopsis* Genome Is Organized in a Reduced Number of Linear Motifs of Chromatin States. *The Plant Cell* **26**: 2351–2366
- Sewelam N, Brilhaus D, Bräutigam A, Alseekh S, Fernie AR, Maurino VG** (2020) Molecular plant responses to combined abiotic stresses put a spotlight on unknown and abundant genes. *Journal of Experimental Botany* **71**: 5098–5112
- Sewelam N, El-Shetehy M, Mauch F, Maurino VG** (2021) Combined Abiotic Stresses Repress Defense and Cell Wall Metabolic Genes and Render Plants More Susceptible to Pathogen Infection. *Plants (Basel)* **10**: 1946
- Shaar-Moshe L, Blumwald E, Peleg Z** (2017) Unique Physiological and Transcriptional Shifts under Combinations of Salinity, Drought, and Heat. *Plant Physiology* **174**: 421–434
- Shani E, Salehin M, Zhang Y, Sanchez SE, Doherty C, Wang R, Mangado CC, Song L, Tal I, Pisanty O, et al** (2017) Plant Stress Tolerance Requires Auxin-Sensitive Aux/IAA Transcriptional Repressors. *Current Biology* **27**: 437–444
- Sharma K, Gossen BD, McDonald MR** (2011a) Effect of temperature on primary infection by *Plasmodiophora brassicae* and initiation of clubroot symptoms: Temperature affects primary infection by *P. brassicae*. *Plant Pathology* **60**: 830–838
- Sharma K, Gossen BD, McDonald MR** (2011b) Effect of Temperature on Cortical Infection by *Plasmodiophora brassicae* and Clubroot Severity. *Phytopathology®* **101**: 1424–1432
- Shaw RG, Byers DL, Darmo E** (2000) Spontaneous Mutational Effects on Reproductive Traits of *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **155**: 369–378
- Shaw RK, Shen Y, Yu H, Sheng X, Wang J, Gu H** (2022) Multi-Omics Approaches to Improve Clubroot Resistance in Brassica with a Special Focus on *Brassica oleracea* L. *Int J Mol Sci* **23**: 9280
- Shen X, Jonge JD, Forsberg SKG, Pettersson ME, Sheng Z, Hennig L, Carlborg Ö** (2014) Natural CMT2 Variation Is Associated With Genome-Wide Methylation Changes and Temperature Seasonality. *PLOS Genetics* **10**: e1004842
- Shen Y, Diener AC** (2013) *Arabidopsis thaliana* RESISTANCE TO FUSARIUM OXYSPORUM 2 Implicates Tyrosine-Sulfated Peptide Signaling in Susceptibility and Resistance to Root Infection. *PLoS Genet* **9**: e1003525

- Shi J, Jiang Q, Zhang S, Dai X, Wang F, Ma Y** (2022) MIR390 Is Involved in Regulating Anthracnose Resistance in Apple. *Plants* **11**: 3299
- Shim S, Lee HG, Park O-S, Shin H, Lee K, Lee H, Huh JH, Seo PJ** (2022) Dynamic changes in DNA methylation occur in TE regions and affect cell proliferation during leaf-to-callus transition in Arabidopsis. *Epigenetics* **17**: 41–58
- Shukla V, Lombardi L, Iacopino S, Pencik A, Novak O, Perata P, Giuntoli B, Licausi F** (2019) Endogenous Hypoxia in Lateral Root Primordia Controls Root Architecture by Antagonizing Auxin Signaling in Arabidopsis. *Molecular Plant* **12**: 538–551
- Sieber P, Wellmer F, Gheyselinck J, Riechmann JL, Meyerowitz EM** (2007) Redundancy and specialization among plant microRNAs: role of the *MIR164* family in developmental robustness. *Development* **134**: 1051–1060
- Siemens J, González M-C, Wolf S, Hofmann C, Greiner S, Du Y, Rausch T, Roitsch T, Ludwig-Müller J** (2011) Extracellular invertase is involved in the regulation of clubroot disease in Arabidopsis thaliana. *Molecular Plant Pathology* **12**: 247–262
- Siemens J, Keller I, Sarx J, Kunz S, Schuller A, Nagel W, Schmülling T, Parniske M, Ludwig-Müller J** (2006) Transcriptome Analysis of Arabidopsis Clubroots Indicate a Key Role for Cytokinins in Disease Development. *MPMI* **19**: 480–494
- Silveira AB, Trontin C, Cortijo S, Barau J, Del Bem LEV, Loudet O, Colot V, Vincentz M** (2013) Extensive Natural Epigenetic Variation at a De Novo Originated Gene. *PLoS Genet* **9**: e1003437
- Singer T, Yordan C, Martienssen RA** (2001) Robertson's Mutator transposons in *A. thaliana* are regulated by the chromatin-remodeling gene *Decrease in DNA Methylation (DDM1)*. *Genes Dev* **15**: 591–602
- Singh BK, Delgado-Baquerizo M, Egidi E, Guirado E, Leach JE, Liu H, Trivedi P** (2023) Climate change impacts on plant pathogens, food security and paths forward. *Nat Rev Microbiol* 1–17
- Sinha R, Gupta A, Senthil-Kumar M** (2016) Understanding the Impact of Drought on Foliar and Xylem Invading Bacterial Pathogen Stress in Chickpea. *Frontiers in Plant Science* **7**:
- Skalsky RL, Cullen BR** (2010) Viruses, microRNAs, and Host Interactions. *Annu Rev Microbiol* **64**: 123–141
- Smale ST, Kadonaga JT** (2003) The RNA Polymerase II Core Promoter. *Annual Review of Biochemistry* **72**: 449–479
- Smith LM, Pontes O, Searle I, Yelina N, Yousafzai FK, Herr AJ, Pikaard CS, Baulcombe DC** (2007) An SNF2 Protein Associated with Nuclear RNA Silencing and the Spread of a Silencing Signal between Cells in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**: 1507–1521
- Some A, Manzanares MJ, Laurens F, Baron F, Thomas G, Rouxel F** (1996) Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathology* **45**: 432–439

- Son S, Park SR** (2022) Climate change impedes plant immunity mechanisms. *Frontiers in Plant Science* **13**:
- Soto-Suárez M, Baldrich P, Weigel D, Rubio-Somoza I, San Segundo B** (2017) The *Arabidopsis* miR396 mediates pathogen-associated molecular pattern-triggered immune responses against fungal pathogens. *Sci Rep* **7**: 44898
- Spartz AK, Lee SH, Wenger JP, Gonzalez N, Itoh H, Inzé D, Peer WA, Murphy AS, Overvoorde PJ, Gray WM** (2012) The SAUR19 subfamily of SMALL AUXIN UP RNA genes promote cell expansion. *The Plant Journal* **70**: 978–990
- Sperdouli I, Moustakas M** (2012) Spatio-temporal heterogeneity in *Arabidopsis thaliana* leaves under drought stress. *Plant Biology* **14**: 118–128
- Sreekanta S, Bethke G, Hatsugai N, Tsuda K, Thao A, Wang L, Katagiri F, Glazebrook J** (2015) The receptor-like cytoplasmic kinase PCRK1 contributes to pattern-triggered immunity against *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **207**: 78–90
- Sriden N, Charoensawan V** (2022) Large-scale comparative transcriptomic analysis of temperature-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* **110**: 425–443
- St.Clair DA** (2010) Quantitative Disease Resistance and Quantitative Resistance Loci in Breeding. *Annu Rev Phytopathol* **48**: 247–268
- Steffens B, Rasmussen A** (2016) The Physiology of Adventitious Roots. *Plant Physiology* **170**: 603–617
- Stjelja S, Fogelqvist J, Tellgren-Roth C, Dixelius C** (2019) The architecture of the *Plasmodiophora brassicae* nuclear and mitochondrial genomes. *Sci Rep* **9**: 15753
- Stocker TF, Qin D, Plattner G-K, Tignor MMB, Allen SK, Boschung J, Nauels A, Xia Y, Bex V, Midgley PM** (2013) Résumé à l'intention des décideurs.
- Strelkov SE, Hwang S-F, Manolii VP, Cao T, Fredua-Agyeman R, Harding MW, Peng G, Gossen BD, McDonald MR, Feindel D** (2018) Virulence and pathotype classification of *Plasmodiophora brassicae* populations collected from clubroot resistant canola (*Brassica napus*) in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* **40**: 284–298
- Striker G** (2012) Flooding Stress On Plants: Anatomical, Morphological And Physiological Responses. *Botany*
- Stroud H, Do T, Du J, Zhong X, Feng S, Johnson L, Patel DJ, Jacobsen SE** (2014) The roles of non-CG methylation in *Arabidopsis*. *Nat Struct Mol Biol* **21**: 64–72
- Stroud H, Greenberg MVC, Feng S, Bernatavichute YV, Jacobsen SE** (2013) Comprehensive Analysis of Silencing Mutants Reveals Complex Regulation of the *Arabidopsis* Methylome. *Cell* **152**: 352–364
- Su J, Yang L, Zhu Q, Wu H, He Y, Liu Y, Xu J, Jiang D, Zhang S** (2018) Active photosynthetic inhibition mediated by MPK3/MPK6 is critical to effector-triggered immunity. *PLOS Biology* **16**: e2004122

- Summanwar A, Basu U, Rahman H, Kav N** (2019) Identification of lncRNAs Responsive to Infection by *Plasmodiophora brassicae* in Clubroot-Susceptible and -Resistant *Brassica napus* Lines Carrying Resistance Introgressed from *Rutabaga*. *MPMI* **32**: 1360–1377
- Sun J, Qi L, Li Y, Chu J, Li C** (2012) PIF4-Mediated Activation of YUCCA8 Expression Integrates Temperature into the Auxin Pathway in Regulating *Arabidopsis* Hypocotyl Growth. *PLoS Genet* **8**: e1002594
- Sun Y, Li L, Macho AP, Han Z, Hu Z, Zipfel C, Zhou J-M, Chai J** (2013) Structural Basis for flg22-Induced Activation of the *Arabidopsis* FLS2-BAK1 Immune Complex. *Science* **342**: 624–628
- Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Fujimura M, Nunome T, Fukuoka H, Matsumoto S, Hirai M** (2003) Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. *Theor Appl Genet* **107**: 997–1002
- Suzuki H, Zuo Y, Wang J, Zhang MQ, Malhotra A, Mayeda A** (2006) Characterization of RNase R-digested cellular RNA source that consists of lariat and circular RNAs from pre-mRNA splicing. *Nucleic Acids Research* **34**: e63
- Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R** (2014) Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytol* **203**: 32–43
- Svensen H, Planke S, Malthe-Sørensen A, Jamtveit B, Myklebust R, Rasmussen Eidem T, Rey SS** (2004) Release of methane from a volcanic basin as a mechanism for initial Eocene global warming. *Nature* **429**: 542–545
- Taji T, Ohsumi C, Iuchi S, Seki M, Kasuga M, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K** (2002) Important roles of drought- and cold-inducible genes for galactinol synthase in stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **29**: 417–426
- Takahashi K** (1994) Influences of Some Environmental Factors on the Viability of Resting Spores of *Plasmodiophora brassicae* Wor. Incubated in Sterile Soil. *Jpn J Phytopathol* **60**: 658–666
- Takuno S, Gaut BS** (2012) Body-Methylated Genes in *Arabidopsis thaliana* Are Functionally Important and Evolve Slowly. *Molecular Biology and Evolution* **29**: 219–227
- Tanaka S, Ito S** (2013) Pathogenic and genetic diversity in *Plasmodiophora brassicae* (clubroot) from Japan. *J Gen Plant Pathol* **79**: 297–306
- Tang D, Simonich MT, Innes RW** (2007) Mutations in LACS2, a Long-Chain Acyl-Coenzyme A Synthetase, Enhance Susceptibility to Avirulent *Pseudomonas syringae* But Confer Resistance to *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **144**: 1093–1103
- Thines B, Katsir L, Melotto M, Niu Y, Mandaokar A, Liu G, Nomura K, He SY, Howe GA, Browse J** (2007) JAZ repressor proteins are targets of the SCFCOII complex during jasmonate signalling. *Nature* **448**: 661–665

- Tian W, Hou C, Ren Z, Wang C, Zhao F, Dahlbeck D, Hu S, Zhang L, Niu Q, Li L, et al** (2019) A calmodulin-gated calcium channel links pathogen patterns to plant immunity. *Nature* **572**: 131–135
- Tisné S, Serrand Y, Bach L, Gilbault E, Ben Ameer R, Balasse H, Voisin R, Bouchez D, Durand-Tardif M, Guerche P, et al** (2013) Phenoscope: an automated large-scale phenotyping platform offering high spatial homogeneity. *Plant J* **74**: 534–544
- Toreti A, Belward A, Perez-Dominguez I, Naumann G, Luterbacher J, Cronie O, Seguíni L, Manfron G, Lopez-Lozano R, Baruth B, et al** (2019) The Exceptional 2018 European Water Seesaw Calls for Action on Adaptation. *Earth's Future* **7**: 652–663
- Torres-Perez JV, Irfan J, Febrianto MR, Giovanni SD, Nagy I** (2021) Histone post-translational modifications as potential therapeutic targets for pain management. *Trends in Pharmacological Sciences* **42**: 897–911
- Trivedi P, Batista BD, Bazany KE, Singh BK** (2022) Plant–microbiome interactions under a changing world: responses, consequences and perspectives. *New Phytologist* **234**: 1951–1959
- Truman W, Sreekanta S, Lu Y, Bethke G, Tsuda K, Katagiri F, Glazebrook J** (2013) The CALMODULIN-BINDING PROTEIN60 Family Includes Both Negative and Positive Regulators of Plant Immunity1[W][OPEN]. *Plant Physiol* **163**: 1741–1751
- Tso HH, Galindo-González L, Locke T, Strelkov SE** (2022) Protocol: rhPCR and SNaPshot assays to distinguish *Plasmodiophora brassicae* pathotype clusters. *Plant Methods* **18**: 91
- Ueno H, Matsumoto E, Aruga D, Kitagawa S, Matsumura H, Hayashida N** (2012) Molecular characterization of the CRA gene conferring clubroot resistance in *Brassica rapa*. *Plant Mol Biol* **80**: 621–629
- Unver T, Li F, Han Y, Zhang Z** (2021) Response of Root Growth and Development to Nitrogen and Potassium Deficiency as well as microRNA-Mediated Mechanism in Peanut (*Arachis hypogaea* L.). *Frontiers in Plant Science* **12**:
- Urano K, Maruyama K, Ogata Y, Morishita Y, Takeda M, Sakurai N, Suzuki H, Saito K, Shibata D, Kobayashi M, et al** (2009) Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *The Plant Journal* **57**: 1065–1078
- Vashisht D, Hesselink A, Pierik R, Ammerlaan JMH, Bailey-Serres J, Visser EJW, Pedersen O, van Zanten M, Vreugdenhil D, Jamar DCL, et al** (2011) Natural variation of submergence tolerance among *Arabidopsis thaliana* accessions. *New Phytologist* **190**: 299–310
- van Veen H, Vashisht D, Akman M, Girke T, Muströph A, Reinen E, Hartman S, Kooiker M, van Tienderen P, Schranz ME, et al** (2016) Transcriptomes of Eight *Arabidopsis thaliana* Accessions Reveal Core Conserved, Genotype- and Organ-Specific Responses to Flooding Stress1[OPEN]. *Plant Physiol* **172**: 668–689

- Velásquez AC, Castroverde CDM, He SY** (2018) Plant–Pathogen Warfare under Changing Climate Conditions. *Current Biology* **28**: R619–R634
- Verhoeven A, Kloth KJ, Kupczok A, Oymans GH, Damen J, Rijnsburger K, Jiang Z, Deelen C, Sasidharan R, van Zanten M, et al** (2023) Arabidopsis latent virus 1, a comovirus widely spread in Arabidopsis thaliana collections. *New Phytologist* **237**: 1146–1153
- Verma SS, Rahman MH, Deyholos MK, Basu U, Kav NNV** (2014) Differential Expression of miRNAs in Brassica napus Root following Infection with Plasmodiophora brassicae. *PLoS ONE* **9**: e86648
- Via S, Gomulkiewicz R, Jong GD, Scheiner SM, Schlichting CD, Tienderen PHV** (1995) Adaptive phenotypic plasticity: consensus and controversy. *Trends in Ecology & Evolution* **10**: 212–217
- Vile D, Pervent M, Belluau M, Vasseur F, Bresson J, Muller B, Granier C, Simonneau T** (2012) Arabidopsis growth under prolonged high temperature and water deficit: independent or interactive effects?: Plant responses to high temperature and water deficit. *Plant, Cell & Environment* **35**: 702–718
- Villalba-Bermell P, Marquez-Molins J, Marques M-C, Hernandez-Azurdia AG, Corell-Sierra J, Picó B, Monforte AJ, Elena SF, Gomez GG** (2021) Combined Stress Conditions in Melon Induce Non-additive Effects in the Core miRNA Regulatory Network. *Frontiers in Plant Science* **12**:
- Vongs A, Kakutani T, Martienssen RA, Richards EJ** (1993) Arabidopsis thaliana DNA Methylation Mutants. *Science* **260**: 1926–1928
- Waddington CH** (1959) Canalization of Development and Genetic Assimilation of Acquired Characters. *Nature* **183**: 1654–1655
- Waddington CH** (1942) Canalization of Development and the Inheritance of Acquired Characters. *Nature* **150**: 563–565
- Walker JC** (1965) Use of Environmental Factors in Screening for Disease Resistance. *Annu Rev Phytopathol* **3**: 197–208
- Wallenhammar A -C.** (1996) **Prevalence of Plasmodiophora brassicae in a spring oilseed rape growing area in central Sweden and factors influencing soil infestation levels** . *Plant Pathology* **45**: 710–719
- Wang C, Chen W, Aili M, Zhu L, Chen Y** (2023) tRNA-derived small RNAs in plant response to biotic and abiotic stresses. *Front Plant Sci* **14**: 1131977
- Wang H, Hou J, Ye P, Hu L, Huang J, Dai Z, Zhang B, Dai S, Que J, Min H, et al** (2021a) A teosinte-derived allele of a MYB transcription repressor confers multiple disease resistance in maize. *Molecular Plant* **14**: 1846–1863
- Wang H-LV, Chekanova JA** (2017) Long Noncoding RNAs in Plants. *Adv Exp Med Biol* **1008**: 133–154

- Wang J, Mei J, Ren G** (2019) Plant microRNAs: Biogenesis, Homeostasis, and Degradation. *Frontiers in Plant Science* 10:
- Wang J-W, Wang L-J, Mao Y-B, Cai W-J, Xue H-W, Chen X-Y** (2005) Control of Root Cap Formation by MicroRNA-Targeted Auxin Response Factors in Arabidopsis. *The Plant Cell* 17: 2204–2216
- Wang K, Shi Y, Sun Q, Lu M, Zheng L, Aldiyar B, Yu C, Yu F, Xu A, Huang Z** (2022) Ethylene Plays a Dual Role during Infection by *Plasmodiophora brassicae* of Arabidopsis thaliana. *Genes (Basel)* 13: 1299
- Wang L, Gu X, Xu D, Wang W, Wang H, Zeng M, Chang Z, Huang H, Cui X** (2011) miR396-targeted AtGRF transcription factors are required for coordination of cell division and differentiation during leaf development in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 62: 761–773
- Wang Q, Liu Y, He J, Zheng X, Hu J, Liu Y, Dai H, Zhang Y, Wang B, Wu W, et al** (2014) STV11 encodes a sulphotransferase and confers durable resistance to rice stripe virus. *Nat Commun* 5: 4768
- Wang Q, Wang L, Chandrasekaran U, Luo X, Zheng C, Shu K** (2021b) ABA Biosynthesis and Signaling Cascades Under Hypoxia Stress. *Frontiers in Plant Science* 12:
- Wang R, Lammers M, Tikunov Y, Bovy AG, Angenent GC, de Maagd RA** (2020) The rin, nor and Cnr spontaneous mutations inhibit tomato fruit ripening in additive and epistatic manners. *Plant Science* 294: 110436
- Wang X, Komatsu S** (2022) The Role of Phytohormones in Plant Response to Flooding. *International Journal of Molecular Sciences* 23: 6383
- Wang Y, Bao Z, Zhu Y, Hua J** (2009) Analysis of Temperature Modulation of Plant Defense Against Biotrophic Microbes. *MPMI* 22: 498–506
- Wang Z, Ma Z, Castillo-González C, Sun D, Li Y, Yu B, Zhao B, Li P, Zhang X** (2018a) SWI2/SNF2 ATPase CHR2 remodels pri-miRNAs via Serrate to impede miRNA production. *Nature* 557: 516–521
- Wang Z, Xia Y, Lin S, Wang Y, Guo B, Song X, Ding S, Zheng L, Feng R, Chen S, et al** (2018b) Osa-miR164a targets OsNAC60 and negatively regulates rice immunity against the blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *The Plant Journal* 95: 584–597
- Waseem M, Huang F, Wang Q, Aslam MM, Abbas F, Ahmad F, Ashraf U, Hassan W, Fiaz S, Ye X, et al** (2021) Identification, methylation profiling, and expression analysis of stress-responsive cytochrome P450 genes in rice under abiotic and phytohormones stresses. *GM Crops Food* 12: 551–563
- Webb KM, Oña I, Bai J, Garrett KA, Mew T, Vera Cruz CM, Leach JE** (2010) A benefit of high temperature: increased effectiveness of a rice bacterial blight disease resistance gene. *New Phytologist* 185: 568–576
- Webster MA, Dixon GR** (1991) Boron, pH and inoculum concentration influencing colonization by *Plasmodiophora brassicae*. *Mycological Research* 95: 74–79

- van der Weele CM, Spollen WG, Sharp RE, Baskin TI** (2000) Growth of *Arabidopsis thaliana* seedlings under water deficit studied by control of water potential in nutrient-agar media. *Journal of Experimental Botany* **51**: 1555–1562
- Wei J-W, Huang K, Yang C, Kang C-S** (2017) Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncology Reports* **37**: 3–9
- Wei X, Ke H, Wen A, Gao B, Shi J, Feng Y** (2021a) Structural basis of microRNA processing by Dicer-like 1. *Nat Plants* **7**: 1389–1396
- Wei X, Liao R, Zhang X, Zhao Y, Xie Z, Yang S, Su H, Wang Z, Zhang L, Tian B, et al** (2023) Integrative Transcriptome, miRNAs, Degradome, and Phytohormone Analysis of *Brassica rapa* L. in Response to *Plasmodiophora brassicae*. *Int J Mol Sci* **24**: 2414
- Wei X, Xu W, Yuan Y, Yao Q, Zhao Y, Wang Z, Jiang W, Zhang X** (2016) Genome-wide Investigation of microRNAs and Their Targets in *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* Root with *Plasmodiophora brassicae* Infection. *Horticultural Plant Journal* **2**: 209–216
- Wei X, Zhang Y, Zhao Y, Xie Z, Hossain MR, Yang S, Shi G, Lv Y, Wang Z, Tian B, et al** (2021b) Root Transcriptome and Metabolome Profiling Reveal Key Phytohormone-Related Genes and Pathways Involved Clubroot Resistance in *Brassica rapa* L. *Front Plant Sci* **12**: 759623
- Weits DA, Giuntoli B, Kosmacz M, Parlanti S, Hubberten H-M, Riegler H, Hoefgen R, Perata P, van Dongen JT, Licausi F** (2014) Plant cysteine oxidases control the oxygen-dependent branch of the N-end-rule pathway. *Nat Commun* **5**: 3425
- Weng M-L, Becker C, Hildebrandt J, Neumann M, Rutter MT, Shaw RG, Weigel D, Fenster CB** (2019) Fine-Grained Analysis of Spontaneous Mutation Spectrum and Frequency in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **211**: 703–714
- Weraduwege SM, Chen J, Anozie FC, Morales A, Weise SE, Sharkey TD** (2015) The relationship between leaf area growth and biomass accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2015.00167
- Werner S, Diederichsen E, Frauen M, Schondelmaier J, Jung C** (2008) Genetic mapping of clubroot resistance genes in oilseed rape. *Theor Appl Genet* **116**: 363–372
- Wheeler T, von Braun J** (2013) Climate Change Impacts on Global Food Security. *Science* **341**: 508–513
- Wierzbicki AT** (2012) The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 517–522
- Winkel A, Visser EJW, Colmer TD, Brodersen KP, Voeselek LACJ, Sand-Jensen K, Pedersen O** (2016) Leaf gas films, underwater photosynthesis and plant species distributions in a flood gradient. *Plant, Cell & Environment* **39**: 1537–1548
- Wiszniewski A, Uberegui E, Messer M, Sultanova G, Borghi M, Duarte GT, Vicente R, Sageman-Furnas K, Fernie AR, Nikoloski Z, et al** (2022) Temperature-mediated flower size plasticity in *Arabidopsis*. *iScience* **25**: 105411

- Woo HR, Dittmer TA, Richards EJ** (2008) Three SRA-Domain Methylcytosine-Binding Proteins Cooperate to Maintain Global CpG Methylation and Epigenetic Silencing in Arabidopsis. *PLOS Genetics* **4**: e1000156
- Woo HR, Pontes O, Pikaard CS, Richards EJ** (2007) VIM1, a methylcytosine-binding protein required for centromeric heterochromatinization. *Genes Dev* **21**: 267–277
- Woodward AW, Bartel B** (2018) Biology in Bloom: A Primer on the Arabidopsis thaliana Model System. *Genetics* **208**: 1337–1349
- Wu C -t., Morris JR** (2001) Genes, Genetics, and Epigenetics: A Correspondence. *Science* **293**: 1103–1105
- Wu G, Park MY, Conway SR, Wang J-W, Weigel D, Poethig RS** (2009) The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in Arabidopsis. *Cell* **138**: 750–759
- Wu L, Mao L, Qi Y** (2012a) Roles of DICER-LIKE and ARGONAUTE Proteins in TAS-Derived Small Interfering RNA-Triggered DNA Methylation1[W]. *Plant Physiol* **160**: 990–999
- Wu Y, Zhang D, Chu JY, Boyle P, Wang Y, Brindle ID, De Luca V, Després C** (2012b) The Arabidopsis NPR1 Protein Is a Receptor for the Plant Defense Hormone Salicylic Acid. *Cell Reports* **1**: 639–647
- Xi D, Li X, Gao L, Zhang Z, Zhu Y, Zhu H** (2021) Application of exogenous salicylic acid reduces disease severity of Plasmodiophora brassicae in pakchoi (Brassica campestris ssp. chinensis Makino). *PLOS ONE* **16**: e0248648
- Xiao D, Zhou K, Yang X, Yang Y, Ma Y, Wang Y** (2021) Crosstalk of DNA Methylation Triggered by Pathogen in Poplars With Different Resistances. *Front Microbiol* **12**: 750089
- Xie Z, Allen E, Fahlgren N, Calamar A, Givan SA, Carrington JC** (2005) Expression of Arabidopsis MIRNA Genes. *Plant Physiol* **138**: 2145–2154
- Xin M, Wang Y, Yao Y, Xie C, Peng H, Ni Z, Sun Q** (2010) Diverse set of microRNAs are responsive to powdery mildew infection and heat stress in wheat (Triticum aestivum L.). *BMC Plant Biology* **10**: 123
- Xu J, Zhou S, Gong X, Song Y, van Nocker S, Ma F, Guan Q** (2018) Single-base methylome analysis reveals dynamic epigenomic differences associated with water deficit in apple. *Plant Biotechnology Journal* **16**: 672–687
- Xu L, Jiang H** (2020) Writing and Reading Histone H3 Lysine 9 Methylation in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Science* **11**:
- Xu M, Hu T, Zhao J, Park M-Y, Earley KW, Wu G, Yang L, Poethig RS** (2016) Developmental Functions of miR156-Regulated SQUAMOSA PROMOTER BINDING PROTEIN-LIKE (SPL) Genes in Arabidopsis thaliana. *PLOS Genetics* **12**: e1006263

- Xu W, Xu M, Wang L, Zhou W, Xiang R, Shi Y, Zhang Y, Piao Y** (2019) Integrative analysis of DNA methylation and gene expression identified cervical cancer-specific diagnostic biomarkers. *Signal Transduct Target Ther* **4**: 55
- Xue S, Cao T, Howard RJ, Hwang SF, Strelkov SE** (2008) Isolation and Variation in Virulence of Single-Spore Isolates of *Plasmodiophora brassicae* from Canada. *Plant Disease* **92**: 456–462
- Yamauchi T, Yoshioka M, Fukazawa A, Mori H, Nishizawa NK, Tsutsumi N, Yoshioka H, Nakazono M** (2017) An NADPH Oxidase RBOH Functions in Rice Roots during Lysigenous Aerenchyma Formation under Oxygen-Deficient Conditions. *The Plant Cell* **29**: 775–790
- Yan J, Zhang C, Gu M, Bai Z, Zhang W, Qi T, Cheng Z, Peng W, Luo H, Nan F, et al** (2009) The Arabidopsis CORONATINE INSENSITIVE1 Protein Is a Jasmonate Receptor. *The Plant Cell* **21**: 2220–2236
- Yan K, Zhao S, Cui M, Han G, Wen P** (2018) Vulnerability of photosynthesis and photosystem I in Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) exposed to waterlogging. *Plant Physiology and Biochemistry* **125**: 239–246
- Yan X, Liu X, Cui H, Zhao M** (2022) The roles of microRNAs in regulating root formation and growth in plants. *Journal of Integrative Agriculture* **21**: 901–916
- Yang L, Jue D, Li W, Zhang R, Chen M, Yang Q** (2013) Identification of MiRNA from Eggplant (*Solanum melongena* L.) by Small RNA Deep Sequencing and Their Response to *Verticillium dahliae* Infection. *PLOS ONE* **8**: e72840
- Yang L, Liu Z, Lu F, Dong A, Huang H** (2006) SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in Arabidopsis. *The Plant Journal* **47**: 841–850
- Yang L-N, Ren M, Zhan J** (2023) Modeling plant diseases under climate change: evolutionary perspectives. *Trends in Plant Science* **28**: 519–526
- Yang Q, Yin G, Guo Y, Zhang D, Chen S, Xu M** (2010) A major QTL for resistance to *Gibberella* stalk rot in maize. *Theor Appl Genet* **121**: 673–687
- Yang X, Li L** (2012) Analyzing the microRNA Transcriptome in Plants Using Deep Sequencing Data. *Biology* **1**: 297–310
- Yang X, Zhang H, Li L** (2011) Global analysis of gene-level microRNA expression in Arabidopsis using deep sequencing data. *Genomics* **98**: 40–46
- Yang X, Zhang L, Yang Y, Schmid M, Wang Y** (2021a) miRNA Mediated Regulation and Interaction between Plants and Pathogens. *IJMS* **22**: 2913
- Yang X, Zhong S, Zhang Q, Ren Y, Sun C, Chen F** (2021c) A loss-of-function of the dirigent gene TaDIR-B1 improves resistance to *Fusarium* crown rot in wheat. *Plant Biotechnol J* **19**: 866–868

- Yao J, Sun D, Cen H, Xu H, Weng H, Yuan F, He Y** (2018) Phenotyping of Arabidopsis Drought Stress Response Using Kinetic Chlorophyll Fluorescence and Multicolor Fluorescence Imaging. *Front Plant Sci* **9**: 603
- Ye J, Zhong T, Zhang D, Ma C, Wang L, Yao L, Zhang Q, Zhu M, Xu M** (2019) The Auxin-Regulated Protein ZmAuxRP1 Coordinates the Balance between Root Growth and Stalk Rot Disease Resistance in Maize. *Molecular Plant* **12**: 360–373
- Yoshida T, Fujita Y, Maruyama K, Mogami J, Todaka D, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2015) Four Arabidopsis AREB/ABF transcription factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, Cell & Environment* **38**: 35–49
- Yoshida T, Fujita Y, Sayama H, Kidokoro S, Maruyama K, Mizoi J, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K** (2010) AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal* **61**: 672–685
- Yoshioka H, Hino Y, Iwata K, Ogawa T, Yoshioka M, Ishihama N, Adachi H** (2023) Dynamics of plant immune MAPK activity and ROS signaling in response to invaders. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **125**: 102000
- Yu A, Lepère G, Jay F, Wang J, Bapaume L, Wang Y, Abraham A-L, Penterman J, Fischer RL, Voinnet O, et al** (2013) Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in Arabidopsis antibacterial defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**: 2389–2394
- Yu B, Yang Z, Li J, Minakhina S, Yang M, Padgett RW, Steward R, Chen X** (2005) Methylation as a Crucial Step in Plant microRNA Biogenesis. *Science* **307**: 932–935
- Yu F, Zhang X, Peng G, Falk KC, Strelkov SE, Gossen BD** (2017a) Genotyping-by-sequencing reveals three QTL for clubroot resistance to six pathotypes of *Plasmodiophora brassicae* in *Brassica rapa*. *Sci Rep* **7**: 4516
- Yu F, Zhang Y, Wang J, Chen Q, Karim MdM, Gossen BD, Peng G** (2022) Identification of Two Major QTLs in *Brassica napus* Lines With Introgressed Clubroot Resistance From Turnip Cultivar ECD01. *Frontiers in Plant Science* **12**:
- Yu X, Willmann MR, Anderson SJ, Gregory BD** (2016) Genome-Wide Mapping of Uncapped and Cleaved Transcripts Reveals a Role for the Nuclear mRNA Cap-Binding Complex in Cotranslational RNA Decay in Arabidopsis[OPEN]. *Plant Cell* **28**: 2385–2397
- Yu X-X, Zhao Y-T, Cheng J, Wang W** (2015) Biocontrol effect of *Trichoderma harzianum* T4 on brassica clubroot and analysis of rhizosphere microbial communities based on T-RFLP. *Biocontrol Science and Technology* **25**: 1493–1505
- Yu Y, Jia T, Chen X** (2017b) The ‘how’ and ‘where’ of plant micro RNA s. *New Phytol* **216**: 1002–1017

- Yu Y, Zhang Y, Chen X, Chen Y** (2019) Plant Noncoding RNAs: Hidden Players in Development and Stress Responses. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **35**: 407–431
- Yuan M, Jiang Z, Bi G, Nomura K, Liu M, Wang Y, Cai B, Zhou J-M, He SY, Xin X-F** (2021) Pattern-recognition receptors are required for NLR-mediated plant immunity. *Nature* **592**: 105–109
- Zachos J, Pagani M, Sloan L, Thomas E, Billups K** (2001) Trends, Rhythms, and Aberrations in Global Climate 65 Ma to Present. *Science* **292**: 686–693
- Zachos JC, Wara MW, Bohaty S, Delaney ML, Petrizzo MR, Brill A, Bralower TJ, Premoli-Silva I** (2003) A Transient Rise in Tropical Sea Surface Temperature During the Paleocene-Eocene Thermal Maximum. *Science* **302**: 1551–1554
- Zahr K, Sarkes A, Yang Y, Ahmed H, Zhou Q, Feindel D, Harding MW, Feng J** (2021) *Plasmodiophora brassicae* in Its Environment: Effects of Temperature and Light on Resting Spore Survival in Soil. *Phytopathology* **111**: 1743–1750
- Zamani-Noor N** (2017) Variation in pathotypes and virulence of *Plasmodiophora brassicae* populations in Germany. *Plant Pathol* **66**: 316–324
- Zamani-Noor N, Brand S, Söchtig H-P** (2022a) Effect of Pathogen Virulence on Pathogenicity, Host Range, and Reproduction of *Plasmodiophora brassicae*, the Causal Agent of Clubroot Disease. *Plant Dis* **106**: 57–64
- Zamani-Noor N, Wallenhammar A-C, Kaczmarek J, Patar UR, Zouhar M, Manasova M, Jędrzycka M** (2022b) Pathotype Characterization of *Plasmodiophora brassicae*, the Cause of Clubroot in Central Europe and Sweden (2016-2020). *Pathogens* **11**: 1440
- Zandalinas SI, Mittler R** (2022) Plant responses to multifactorial stress combination. *New Phytologist* **234**: 1161–1167
- van Zanten M, Voeselek LACJ, Peeters AJM, Millenaar FF** (2009) Hormone- and Light-Mediated Regulation of Heat-Induced Differential Petiole Growth in Arabidopsis. *Plant Physiology* **151**: 1446–1458
- Zemach A, Kim MY, Hsieh P-H, Coleman-Derr D, Eshed-Williams L, Thao K, Harmer SL, Zilberman D** (2013) The nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* **153**: 193–205
- Zhan Z, Liu H, Yang Y, Liu S, Li X, Piao Z** (2022) Identification and characterization of putative effectors from *Plasmodiophora brassicae* that suppress or induce cell death in *Nicotiana benthamiana*. *Frontiers in Plant Science* **13**:
- Zhang F, Wang L, Lim JY, Kim T, Pyo Y, Sung S, Shin C, Qiao H** (2016a) Phosphorylation of CBP20 Links MicroRNA to Root Growth in the Ethylene Response. *PLOS Genetics* **12**: e1006437
- Zhang H, Kolb FA, Jaskiewicz L, Westhof E, Filipowicz W** (2004) Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell* **118**: 57–68

- Zhang H, Lang Z, Zhu J-K** (2018a) Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**: 489–506
- Zhang H, Ma X, Liu X, Zhang S, Li F, Li G, Sun R, Zhang S** (2022a) Identification and Fine-Mapping of Clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) Resistant QTL in *Brassica rapa*. *Horticulturae* **8**: 66
- Zhang H, Ma Z-Y, Zeng L, Tanaka K, Zhang C-J, Ma J, Bai G, Wang P, Zhang S-W, Liu Z-W, et al** (2013) DTF1 is a core component of RNA-directed DNA methylation and may assist in the recruitment of Pol IV. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**: 8290–8295
- Zhang J, Li W, Xiang T, Liu Z, Laluk K, Ding X, Zou Y, Gao M, Zhang X, Chen S, et al** (2010) Receptor-like Cytoplasmic Kinases Integrate Signaling from Multiple Plant Immune Receptors and Are Targeted by a *Pseudomonas syringae* Effector. *Cell Host & Microbe* **7**: 290–301
- Zhang S, Li C, Si J, Han Z, Chen D** (2022b) Action Mechanisms of Effectors in Plant-Pathogen Interaction. *Int J Mol Sci* **23**: 6758
- Zhang W, Gao S, Zhou X, Chellappan P, Chen Z, Zhou X, Zhang X, Fromuth N, Coutino G, Coffey M, et al** (2011a) Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Mol Biol* **75**: 93–105
- Zhang X, Bao Y, Shan D, Wang Z, Song X, Wang Z, Wang J, He L, Wu L, Zhang Z, et al** (2018b) *Magnaporthe oryzae* Induces the Expression of a MicroRNA to Suppress the Immune Response in Rice. *Plant Physiology* **177**: 352–368
- Zhang X, Liu Y, Fang Z, Li Z, Yang L, Zhuang M, Zhang Y, Lv H** (2016b) Comparative Transcriptome Analysis between Broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) and Wild Cabbage (*Brassica macrocarpa* Guss.) in Response to *Plasmodiophora brassicae* during Different Infection Stages. *Frontiers in Plant Science* **7**:
- Zhang X, Shen X, Hao Y, Cai J, Ohm HW, Kong L** (2011b) A genetic map of *Lophopyrum ponticum* chromosome 7E, harboring resistance genes to *Fusarium* head blight and leaf rust. *Theor Appl Genet* **122**: 263–270
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW-L, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, et al** (2006a) Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in *Arabidopsis*. *Cell* **126**: 1189–1201
- Zhang Y, Wang L, Liu Y, Zhang Q, Wei Q, Zhang W** (2006b) Nitric oxide enhances salt tolerance in maize seedlings through increasing activities of proton-pump and Na⁺/H⁺ antiport in the tonoplast. *Planta* **224**: 545–555
- Zhao C, Liu B, Piao S, Wang X, Lobell DB, Huang Y, Huang M, Yao Y, Bassu S, Ciais P, et al** (2017a) Temperature increase reduces global yields of major crops in four independent estimates. *Proc Natl Acad Sci U S A* **114**: 9326–9331
- Zhao J, Bindi M, Eitzinger J, Ferrise R, Gaile Z, Gobin A, Holzkämper A, Kersebaum K-C, Kozyra J, Kriaučiūnienė Z, et al** (2022) Priority for climate adaptation measures in European crop production systems. *European Journal of Agronomy* **138**: 126516

- Zhao W, Li Z, Fan J, Hu C, Yang R, Qi X, Chen H, Zhao F, Wang S** (2015) Identification of jasmonic acid-associated microRNAs and characterization of the regulatory roles of the miR319/TCP4 module under root-knot nematode stress in tomato. *EXBOTJ* **66**: 4653–4667
- Zhao Y, Bi K, Gao Z, Chen T, Liu H, Xie J, Cheng J, Fu Y, Jiang D** (2017b) Transcriptome Analysis of *Arabidopsis thaliana* in Response to *Plasmodiophora brassicae* during Early Infection. *Front Microbiol* **8**: 673
- Zheng B, Wang Z, Li S, Yu B, Liu J-Y, Chen X** (2009) Intergenic transcription by RNA Polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes Dev* **23**: 2850–2860
- Zheng G, Dong X, Wei J, Liu Z, Aslam A, Cui J, Li H, Wang Y, Tian H, Cao X** (2022) Integrated methylome and transcriptome analysis unravel the cold tolerance mechanism in winter rapeseed (*Brassica napus* L.). *BMC Plant Biol* **22**: 414
- Zheng X, Zhu J, Kapoor A, Zhu J-K** (2007) Role of *Arabidopsis* AGO6 in siRNA accumulation, DNA methylation and transcriptional gene silencing. *The EMBO Journal* **26**: 1691–1701
- Zheng Y** (2019) Chapter 6 - Identification of miRNA and siRNA Targets in Plants. *In* Y Zheng, ed, *Computational Non-coding RNA Biology*. Academic Press, pp 177–205
- Zhong X, Hale CJ, Law JA, Johnson LM, Feng S, Tu A, Jacobsen SE** (2012) DDR complex facilitates global association of RNA Polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 870–875
- Zhou Q, Galindo-González L, Manolii V, Hwang S-F, Strelkov SE** (2020) Comparative Transcriptome Analysis of Rutabaga (*Brassica napus*) Cultivars Indicates Activation of Salicylic Acid and Ethylene-Mediated Defenses in Response to *Plasmodiophora brassicae*. *Int J Mol Sci* **21**: 8381
- Zhou Q, Hwang SF, Strelkov SE, Fredua-Agyeman R, Manolii VP** (2018) A molecular marker for the specific detection of new pathotype 5-like strains of *Plasmodiophora brassicae* in canola. *Plant Pathology* **67**: 1582–1588
- Zhou Q, Shi J, Li Z, Zhang S, Zhang S, Zhang J, Bao M, Liu G** (2021) miR156/157 Targets SPLs to Regulate Flowering Transition, Plant Architecture and Flower Organ Size in *Petunia*. *Plant and Cell Physiology* **62**: 839–857
- Zhu M, He Y, Li Y, Ren T, Liu H, Huang J, Jiang D, Hsiang T, Zheng L** (2020) Two New Biocontrol Agents Against Clubroot Caused by *Plasmodiophora brassicae*. *Front Microbiol* **10**: 3099
- Zhuang Y, Wei M, Ling C, Liu Y, Amin AK, Li P, Li P, Hu X, Bao H, Huo H, et al** (2021) EGY3 mediates chloroplastic ROS homeostasis and promotes retrograde signaling in response to salt stress in *Arabidopsis*. *Cell Reports* **36**: 109384

Annexes

ANNEXES

1. Annexe Chapitre III:

Environmental conditions modulate the effect of epigenetic factors controlling the response of *Arabidopsis thaliana* to *Plasmodiophora brassicae*

Key words: DNA methylation, temperature rise, flood, drought, clubroot, plasticity

Mathilde Petitpas¹, Romane Lapous¹, Mathieu Le Duc¹, Christine Lariagon¹, Jocelyne Lemoine¹, Christophe Langrume¹, Maria J. Manzanares-Dauleux¹ and Mélanie Jubault¹

¹ IGEPP, Institut Agro Rennes-Angers – INRAE – Université de Rennes, F-35000 Rennes, France

Running title: Epigenetic plasticity of *Arabidopsis* response to clubroot

Supp. Data Tables:

Supp. Table 1: Experimental design (rep/block) and epigenotype effects for each trait and abiotic condition. They were calculated as followed: $Y_{ijk} = \mu + EG_i + R_j + Bk(R_j) + e_{ijk}$ where μ in the mean general effect, EG_i is the epigenotype effect of the i line, R_j , differential effect between replicates; $Bk(R_j)$ is the block in the repetition effect and e_{ijk} the residual variance. Significant value at p -value < 0.05 are indicated in grey.

Supp. Table 2: Genetic variants located within the QTL^{epi} detected. Statistical analysis of TE and sequence variant effect compared to methylated markers on QTL^{epi} detection for each trait study. Conditions indicates the abiotic conditions under which traits were assessed. Trait indicates the phenotypic trait used for the analysis. Model I indicate the marker considered in the model (Marker, SNP, Indel, Footprint or the combination of the Marker and the sequence variant). Model II describes the model used in R regression (lm function) with the peak markers used and/or the sequence variants considered in the model. n: indicates the number of epi-lines with phenotypic data for the trait considered. p-value β_x were the p-values for each marker, TE or sequence variant used in the associated model. F-statistic Model II give the F-statistic of each model. p-value Model II indicates p-values for each model. Adjusted R2 gives the adjusted R2 for each model. Cells in bold indicate the epigenetic maker of the SNP variants that showed the greater impact at the peak of the QTL.

Supp. Table 3: Results of the differential host set put under four abiotic conditions such as standard, heat, drought and flood. For HEAT, DROUGHT and FLOOD, 2 sets were repeated under standard conditions to validate the inoculum and 2 sets were kept under the abiotic changes.

Supp. Table 4: Genetic variants located within the QTL_{epi} detected. Statistical analysis of TE and sequence variant effect compared to methylated markers on QTL_{epi} detection for each trait study. Conditions indicates the abiotic conditions under which traits were assessed. Trait indicates the phenotypic trait used for the analysis. Model I indicate the marker considered in the model (Marker, SNP, Indel, Footprint or the combination of the Marker and the sequence variant). Model II describes the model used in R regression (lm function) with the peak markers used and/or the sequence variants considered in the model. n: indicates the number of epi-lines with phenotypic data for the trait considered. p-value β_x were the p-values for each marker, TE or sequence variant used in the associated model. F-statistic Model II give the F-statistic of each model. p-value Model II indicates p-values for each model. Adjusted R² gives the adjusted R² for each model. Cells in bold indicate the epigenetic maker of the SNP variants that showed the greater impact at the peak of the QTL.

Supp Table 1: Experimental design (rep/block) and epigenotype effects for each trait and abiotic condition. They were calculated as followed: $Y_{ijk} = \mu + E_{Gi} + R_j + B_k(R_j) + e_{ijk}$ where μ in the mean general effect, E_{Gi} is the epigenotype effect of the i line, R_j , differential effect between replicates; $B_k(R_j)$ is the block in the repetition effect and e_{ijk} the residual variance. Significant value at p -value <0.05 are indicated in grey.

Conditions	Disease Related Traits	Environmental Effect (rep/block)	Epigenotype effect	h^2
STANDARD	Lfni	<2E-16	<2E-16	0.78
	Lfi	1.70E-08	2.77E-11	0.71
	DI	0.00015	0.5955	0.49
	GA	1.85E-12	1.01E-06	0.66
	GALA	2.96E-11	2.91E-07	0.67
HEAT	Lfni	1.54E-04	2.07E-14	0.72
	Lfi	2.20E-16	1.23E-07	0.68
	DI	4.44E-05	0.6492	0.48
	GA	2.00E-16	0.07338	0.55
	GALA	1.28E-06	1.66E-04	0.63
DROUGHT	Lfni	<2E-16	3.11E-05	0.64
	Lfi	1.28E-15	4.75E-07	0.66
	DI	2.00E-16	0.1614	0.57
	GA	2.00E-16	0.01116	0.58
	GALA	2.00E-16	0.792	0.47
FLOOD	Lfni	1.73E-05	8.78E-09	0.69
	Lfi	2.00E-16	2.00E-16	0.76
	DI	7.70E-14	0.2294	0.53
	GA	2.00E-16	3.73E-04	0.62
	GALA	2.00E-16	0.254	0.52

Supp. Table 2 : Genetic variants located within the QTL^{epi} detected. Statistical analysis of TE and sequence variant effect compared to methylated markers on QTL^{epi} detection for each trait study. Conditions indicates the abiotic conditions under which traits were assessed. Trait indicates the phenotypic trait used for the analysis. Model I indicates the marker considered in the model (Marker, SNP, Indel, Footprint or the combination of the Marker and the sequence variant). Model II describes the model used in R regression (lm function) with the peak markers used and/or the sequence variants considered in the model. n: indicates the number of epi-lines with phenotypic data for the trait considered. p-value β_x were the p-values for each marker, TE or sequence variant used in the associated model. F-statistic Model II give the F-statistic of each model. p-value Model II indicates p-values for each model. Adjusted R2 gives the adjusted R2 for each model. Cells in bold indicate the epigenetic maker of the SNP variants that showed the greater impact at the peak of the QTL.

Condi-tions	Trait	n	Mo-del I	Model II (lm)	<i>p</i> -va-lue β_1	<i>p</i> -va-lue β_2	<i>p</i> -va-lue β_3	<i>p</i> -va-lue β_4	<i>p</i> -va-lue β_5	F-sta-tistic Mo-del II	<i>p</i> -va-lue Model II	Ad-justed R ²
STAN-DARD	Rbi	123	Mar-ker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + e_i$	9E-04					1E+01	9E-04	8E-02
STAN-DARD	Rbi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_6617937) + e_i$	4E-01					6E-01	4E-01	-4E-03
STAN-DARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_7241579) + e_i$	2E-01					2E+00	1E-01	2E-02
STAN-DARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_9497509) + e_i$	2E-02					3E+00	5E-02	3E-02
STAN-DARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_9883998) + e_i$	1E-02					3E+00	4E-02	4E-02
STAN-DARD	Rbi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_12177658) + e_i$	3E-01					7E-01	6E-01	-1E-02
STAN-DARD	Rbi	123	Foot-print	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_12617099) + e_i$	3E-01					6E-01	6E-01	-1E-02
STAN-DARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{Foot-print}_12620247) + e_i$	3E-01					1E+00	3E-01	-2E-04
STAN-DARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_13033405) + e_i$	5E-02					2E+00	1E-01	2E-02
STAN-DARD	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{in-del}_13908828) + e_i$	1E-01					1E+00	3E-01	3E-03
STAN-DARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_13967107) + e_i$	2E-01					9E-01	4E-01	2E-03

STANDARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14023610}) + e_i$	2E-01					1E+00	4E-01	-7E-04
STANDARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14590272}) + e_i$	2E-01					1E+00	4E-01	-7E-04
STANDARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_15509104}) + e_i$	1E-01					1E+00	3E-01	2E-03
STANDARD	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_15935454}) + e_i$	9E-02					1E+00	2E-01	7E-03
STANDARD	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_15972511}) + e_i$	4E-01					4E-01	7E-01	-1E-02
STANDARD	Rbi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_16836944}) + e_i$	2E-02					5E+00	2E-02	4E-02
STANDARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_17863273}) + e_i$	2E-01					2E+00	1E-01	2E-02
STANDARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18002233}) + e_i$	2E-01					3E+00	4E-02	4E-02
STANDARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18173880}) + e_i$	1E-01					3E+00	8E-02	2E-02
STANDARD	Rbi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_20150892}) + e_i$	1E-01					3E+00	1E-01	2E-02
STANDARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_20362809}) + e_i$	9E-02					2E+00	1E-01	2E-02
STANDARD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_21675141}) + e_i$	1E-01					2E+00	2E-01	1E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{TE_6617937}) + e_i$	2E-02	9E-01				3E+00	6E-02	4E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_7241579}) + e_i$	4E-03	8E-01				4E+00	6E-03	8E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_9497509}) + e_i$	3E-02	5E-01				4E+00	1E-02	7E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_9883998}) + e_i$	2E-02	5E-01				4E+00	8E-03	7E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{TE_12177658}) + e_i$	4E-02	8E-01				2E+00	2E-01	2E-02

STANDARD	Rbi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{TE}_{12617099}) + e_i$	4E-02	9E-01				2E+00	2E-01	2E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + Footprint	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{Footprint}_{12620247}) + e_i$	1E-03	5E-01				6E+00	4E-03	7E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP}_{13033405}) + e_i$	1E-02	5E-01				4E+00	2E-02	6E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{indel}_{13908828}) + e_i$	5E-03	7E-01				4E+00	2E-02	6E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP}_{13967107}) + e_i$	4E-03	8E-01				4E+00	2E-02	6E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP}_{14023610}) + e_i$	3E-03	8E-01				4E+00	1E-02	6E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP}_{14590272}) + e_i$	5E-02	1E-01				4E+00	5E-03	8E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP}_{15509104}) + e_i$	3E-03	7E-01				4E+00	1E-02	6E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{indel}_{15935454}) + e_i$	5E-03	5E-01				4E+00	1E-02	6E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{indel}_{15972511}) + e_i$	3E-03	1E+00				3E+00	2E-02	6E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{TE}_{16836944}) + e_i$	5E-02	7E-02				5E+00	1E-02	7E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{indel}_{17863273}) + e_i$	9E-04	7E-01				5E+00	2E-03	1E-01
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP}_{18002233}) + e_i$	9E-04	6E-01				6E+00	6E-04	1E-01
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP}_{18173880}) + e_i$	1E-03	5E-01				5E+00	2E-03	1E-01

STANDARD	Rbi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{TE_20150892}) + e_i$	4E-02	2E-01				4E+00	3E-02	5E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_20362809}) + e_i$	2E-03	3E-01				5E+00	2E-03	9E-02
STANDARD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_21675141}) + e_i$	2E-03	3E-01				4E+00	6E-03	8E-02
STANDARD	Lfi	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	3E-04	2E-05	4E-05			2E+01	9E-12	3E-01
STANDARD	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_9497509}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	2E-02	1E-06	3E-05			1E+01	1E-09	3E-01
STANDARD	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_9883998}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	1E-02	5E-06	6E-05			1E+01	4E-09	3E-01
STANDARD	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_12177658}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	7E-01	2E-05	4E-05			9E+00	4E-07	3E-01
STANDARD	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_12617099}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	4E-01	2E-05	3E-05			9E+00	3E-07	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Footprint	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{Footprint_12620247}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	9E-01	4E-06	2E-05			2E+01	1E-08	3E-01
STANDARD	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_13033405}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	8E-02	2E-06	2E-05			1E+01	3E-09	3E-01

STANDARD	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{13908828}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	7E-02	6E-07	5E-05			1E+01	1E-09	3E-01
STANDARD	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{13967107}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	1E-01	4E-06	2E-05			1E+01	9E-09	3E-01
STANDARD	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14023610}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	1E-01	4E-06	2E-05			1E+01	7E-09	3E-01
STANDARD	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14590272}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	2E-02	3E-05	7E-05			1E+01	8E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{15509104}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	9E-02	5E-06	3E-05			1E+01	7E-09	3E-01
STANDARD	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{15935454}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	4E-02	7E-07	3E-05			2E+01	5E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{15972511}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	2E-01	1E-05	9E-06			1E+01	1E-08	3E-01
STANDARD	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_{16836944}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	2E-02	2E-05	1E-05			2E+01	3E-09	3E-01
STANDARD	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{17863273}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	3E-01	2E-05	4E-05			1E+01	2E-08	3E-01

STANDARD	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18002233}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	2E-01	2E-05	9E-05			1E+01	2E-08	3E-01
STANDARD	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18173880}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	3E-01	1E-05	1E-04			1E+01	1E-08	3E-01
STANDARD	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{TE_20150892}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	2E-02	2E-01	1E-04			1E+01	4E-06	2E-01
STANDARD	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{SNP_20362809}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	1E-04	3E-01	4E-04			1E+01	9E-08	3E-01
STANDARD	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{SNP_21675141}) + \beta_3(\text{MM167}) + e_i$	2E-04	1E-01	8E-04			1E+01	2E-07	2E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{SNP_9497509}) + e_i$	1E-02	7E-06	9E-05	8E-01		1E+01	2E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{SNP_9883998}) + e_i$	1E-02	3E-05	1E-04	7E-01		1E+01	7E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{TE_12177658}) + e_i$	3E-02	5E-05	1E-04	6E-01		9E+00	1E-07	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{TE_12617099}) + e_i$	2E-02	5E-05	9E-05	8E-01		9E+00	9E-08	3E-01

STANDARD	Lfi	123	Marker + Foot-print	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{Foot-print}_{12620247}) + e_i$	4E-04	3E-05	7E-05	1E+00		2E+01	9E-11	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{SNP}_{13033405}) + e_i$	5E-03	1E-05	5E-05	7E-01		1E+01	3E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{indel}_{13908828}) + e_i$	3E-03	3E-06	9E-05	6E-01		1E+01	8E-11	4E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{SNP}_{13967107}) + e_i$	1E-03	1E-05	5E-05	8E-01		1E+01	2E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{SNP}_{14023610}) + e_i$	9E-04	1E-05	4E-05	9E-01		1E+01	2E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{SNP}_{15509104}) + e_i$	2E-03	2E-05	7E-05	7E-01		1E+01	3E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{indel}_{15935454}) + e_i$	5E-03	3E-06	7E-05	3E-01		1E+01	5E-11	4E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{indel}_{15972511}) + e_i$	2E-03	3E-05	4E-05	7E-01		1E+01	6E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{TE}_{16836944}) + e_i$	7E-02	5E-05	5E-05	1E-01		1E+01	3E-09	3E-01

STANDARD	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{indel_17863273}) + e_i$	3E-04	2E-05	8E-05	9E-01		1E+01	1E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{SNP_18002233}) + e_i$	5E-04	3E-05	2E-04	8E-01		1E+01	2E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{SNP_18173880}) + e_i$	3E-04	3E-05	3E-04	1E+00		1E+01	6E-11	4E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{TE_20150892}) + e_i$	4E-02	8E-05	8E-05	3E-01		1E+01	7E-09	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{SNP_20362809}) + e_i$	3E-04	6E-05	1E-04	9E-01		1E+01	2E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{SNP_21675141}) + e_i$	5E-04	9E-05	2E-04	8E-01		1E+01	4E-10	3E-01
STANDARD	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM160}) + \beta_3(\text{MM167}) + \beta_4(\text{SNP_14590272}) + e_i$	1E-02	1E-05	6E-05	9E-01		1E+01	1E-10	3E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + e_i$	5E-07	3E-04	3E-04	1E-03		3E+01	3E-15	4E-01
STANDARD	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_17863273}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + e_i$	2E-04	5E-04	9E-06	7E-04		2E+01	6E-12	4E-01

STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18002233}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + e_i$	7E-05	8E-04	9E-06	9E-04		2E+01	2E-12	4E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18173880}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + e_i$	6E-05	7E-04	9E-06	1E-03		2E+01	2E-12	4E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP_4474111}) + \beta_4(\text{MM859}) + e_i$	1E-07	7E-04	6E-02	5E-03		2E+01	5E-12	4E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP_5115842}) + \beta_4(\text{MM859}) + e_i$	2E-08	3E-04	1E-01	2E-03		2E+01	8E-13	4E-01
STANDARD	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{indel_7214677}) + \beta_4(\text{MM859}) + e_i$	8E-08	3E-04	4E-03	5E-03		2E+01	2E-13	4E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP_7344157}) + \beta_4(\text{MM859}) + e_i$	8E-08	3E-04	3E-03	6E-03		2E+01	4E-18	4E-01
STANDARD	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{indel_7652616}) + \beta_4(\text{MM859}) + e_i$	4E-08	5E-05	2E-04	1E-03		2E+01	1E-14	4E-01
STANDARD	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{indel_7750735}) + \beta_4(\text{MM859}) + e_i$	3E-08	3E-04	4E-04	6E-03		2E+01	2E-14	4E-01

STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP_7944780}) + \beta_4(\text{MM859}) + e_i$	3E-08	7E-04	1E-04	1E-02		2E+01	6E-14	4E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{SNP_4896800}) + e_i$	2E-06	5E-04	4E-04	3E-03		2E+01	5E-14	4E-01
STANDARD	Lfni	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{TE_6357944}) + e_i$	4E-06	1E-03	2E-02	1E-04		2E+01	5E-16	5E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{SNP_7980674}) + e_i$	1E-05	1E-03	1E-04	4E-04		2E+01	4E-15	5E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{SNP_8654576}) + e_i$	1E-06	8E-04	3E-04	2E-04		2E+01	2E-15	5E-01
STANDARD	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{indel_8872537}) + e_i$	1E-06	1E-03	2E-04	5E-05		2E+01	2E-16	5E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{SNP_9381623}) + e_i$	2E-06	7E-04	4E-04	1E-03		2E+01	8E-15	5E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{SNP_10075739}) + e_i$	2E-06	6E-04	4E-04	1E-03		2E+01	3E-15	5E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{SNP_10214637}) + e_i$	3E-06	5E-04	3E-04	1E-03		2E+01	3E-15	5E-01

STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{SNP_11645737}) + e_i$	3E-06	5E-04	3E-04	2E-03		2E+01	4E-15	5E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{SNP_12506158}) + e_i$	3E-06	5E-04	3E-04	2E-03		2E+01	4E-15	5E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{SNP_14215841}) + e_i$	1E-06	5E-04	3E-04	5E-03		2E+01	4E-14	4E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{SNP_14240551}) + e_i$	1E-06	4E-04	2E-04	6E-03		2E+01	3E-14	4E-01
STANDARD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{SNP_15070083}) + e_i$	2E-06	5E-04	2E-04	4E-03		2E+01	2E-14	4E-01
STANDARD	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{indel_15431687}) + e_i$	5E-06	4E-04	3E-04	8E-03		2E+01	1E-13	4E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{indel_17863273}) + e_i$	4E-04	7E-04	2E-04	1E-03	2E-01	2E+01	6E-14	4E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_18002233}) + e_i$	6E-04	8E-04	2E-04	1E-03	9E-02	2E+01	3E-14	4E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_18173880}) + e_i$	6E-04	8E-04	2E-04	2E-03	8E-02	2E+01	3E-14	4E-01

STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_4474111}) + e_i$	1E-06	8E-04	2E-03	2E-03	7E-01	2E+01	3E-13	4E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_5115842}) + e_i$	3E-07	4E-04	4E-03	1E-03	7E-01	2E+01	7E-14	4E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{indel_7214677}) + e_i$	6E-07	5E-04	2E-02	3E-03	2E-01	2E+01	6E-14	4E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_7344157}) + e_i$	6E-07	6E-04	1E-02	3E-03	2E-01	2E+01	1E-13	4E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{indel_7652616}) + e_i$	2E-07	1E-04	1E-01	1E-03	2E-01	2E+01	2.471-E14	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{indel_7750735}) + e_i$	2E-07	5E-04	3E-02	4E-03	3E-02	2E+01	1E-14	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_7944780}) + e_i$	2E-07	1E-03	4E-02	7E-03	8E-03	2E+01	4E-14	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_4896800}) + e_i$	2E-06	4E-04	3E-04	3E-03	6E-03	2E+01	3E-15	5E-01

STANDARD	Lfni	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{TE_6357944}) + e_i$	6E-06	9E-04	2E-02	2E-03	3E-04	2E+01	3E-14	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_7980674}) + e_i$	1E-05	7E-04	1E-04	4E-03	5E-03	2E+01	3E-16	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_8654576}) + e_i$	8E-07	7E-04	4E-04	2E-02	3E-03	2E+01	5E-16	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{indel_8872537}) + e_i$	9E-07	1E-03	2E-04	3E-02	2E-03	2E+01	2E-16	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_9381623}) + e_i$	1E-06	7E-04	4E-04	2E-02	2E-02	2E+01	2E-15	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_10075739}) + e_i$	2E-06	5E-04	3E-04	1E-02	2E-02	2E+01	7E-16	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_10214637}) + e_i$	2E-06	4E-04	2E-04	1E-02	2E-02	2E+01	6E-16	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{MM859}) + \beta_6(\text{SNP_11645737}) + e_i$	2E-06	5E-04	2E-04	1E-02	3E-02	2E+01	8E-16	5E-01

STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_12506158}) + e_i$	2E-06	5E-04	2E-04	1E-02	3E-02	2E+01	8E-16	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_14215841}) + e_i$	1E-06	5E-04	2E-04	2E-02	6E-02	2E+01	2E-14	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_14240551}) + e_i$	1E-06	4E-04	2E-04	2E-02	7E-02	2E+01	1E-14	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{SNP_15070083}) + e_i$	2E-06	5E-04	2E-04	3E-02	5E-02	2E+01	9E-15	5E-01
STANDARD	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM679}) + \beta_4(\text{MM859}) + \beta_5(\text{indel_15431687}) + e_i$	4E-06	5E-04	3E-04	2E-02	1E-01	2E+01	3E-14	5E-01
STANDARD	dLf	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + e_i$	9E-05	1E-03				2E+01	1E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_4474111}) + \beta_2(\text{MM724}) + e_i$	8E-03	1E-03				7E+00	2E-04	1E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_5115842}) + \beta_2(\text{MM724}) + e_i$	8E-03	6E-04				7E+00	2E-04	1E-01
STANDARD	dLf	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_7214677}) + \beta_2(\text{MM724}) + e_i$	1E-03	1E-03				9E+00	4E-05	2E-01

STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_7344157}) + \beta_2(\text{MM724}) + e_i$	1E-03	2E-03				8E+00	6E-05	1E-01
STANDARD	dLf	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_7652616}) + \beta_2(\text{MM724}) + e_i$	1E-03	5E-04				9E+00	2E-05	2E-01
STANDARD	dLf	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_7750735}) + \beta_2(\text{MM724}) + e_i$	6E-04	2E-03				1E+01	7E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_7944780}) + \beta_2(\text{MM724}) + e_i$	1E-04	7E-03				9E+00	2E-05	2E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{SNP_4896800}) + e_i$	1E-04	6E-02				8E+00	1E-04	1E-01
STANDARD	dLf	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{TE_6357944}) + e_i$	2E-03	3E-03				1E+01	3E-05	2E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{SNP_7980674}) + e_i$	6E-04	2E-03				1E+01	6E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{SNP_8654576}) + e_i$	4E-04	1E-02				9E+00	3E-05	2E-01
STANDARD	dLf	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{indel_8872537}) + e_i$	6E-04	2E-03				1E+01	6E-07	2E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{SNP_9381623}) + e_i$	2E-04	1E-02				9E+00	2E-05	2E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{SNP_10075739}) + e_i$	3E-04	7E-03				1E+01	9E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{SNP_10214637}) + e_i$	2E-04	7E-03				1E+01	5E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{SNP_11645737}) + e_i$	2E-04	8E-03				1E+01	6E-06	2E-01

STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{SNP_12506158}) + e_i$	2E-04	8E-03				1E+01	6E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{SNP_14215841}) + e_i$	2E-04	4E-02				7E+00	1E-04	1E-01
STANDARD	dLf	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{SNP_14240551}) + e_i$	1E-04	4E-02				8E+00	8E-05	1E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_4474111}) + e_i$	1E-03	2E-03	1E-01			8E+00	5E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_5115842}) + e_i$	9E-04	9E-04	1E-01			9E+00	4E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{indel_7214677}) + e_i$	1E-02	2E-03	1E-01			8E+00	6E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_7344157}) + e_i$	9E-03	2E-03	1E-01			8E+00	9E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{indel_7652616}) + e_i$	4E-02	1E-03	8E-01			8E+00	8E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{indel_7750735}) + e_i$	3E-02	2E-03	8E-02			9E+00	2E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_7944780}) + e_i$	7E-02	7E-03	5E-02			8E+00	2E-05	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_2(\text{SNP_4896800}) + e_i$	1E-04	6E-03	4E-01			8E+00	1E-05	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{TE_6357944}) + e_i$	3E-03	4E-03	2E-02			1E+01	2E-06	2E-01

STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_7980674}) + e_i$	4E-04	1E-02	6E-01			1E+01	1E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_8654576}) + e_i$	3E-04	3E-02	5E-01			8E+00	1E-05	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{indel_8872537}) + e_i$	4E-04	1E-01	1E-01			1E+01	7E-07	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_9381623}) + e_i$	2E-04	3E-02	4E-01			8E+00	7E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_10075739}) + e_i$	3E-04	3E-02	2E-01			9E+00	4E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_10214637}) + e_i$	2E-04	4E-02	2E-01			9E+00	3E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_11645737}) + e_i$	2E-04	3E-02	2E-01			9E+00	3E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_12506158}) + e_i$	2E-04	3E-02	2E-01			9E+00	3E-06	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_14215841}) + e_i$	3E-04	6E-03	5E-01			8E+00	1E-05	2E-01
STANDARD	dLf	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM686}) + \beta_2(\text{MM724}) + \beta_3(\text{SNP_14240551}) + e_i$	1E-04	1E-02	5E-01			8E+00	1E-05	2E-01
HEAT	Lfi	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	6E-06	2E-04	3E-05			2E+01	5E-11	3E-01

HEAT	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_17863273}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	5E-03	6E-05	1E-03			1E+01	1E-07	3E-01
HEAT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18173880}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	6E-03	1E-04	1E-03			1E+01	7E-08	3E-01
HEAT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18002233}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	4E-03	1E-04	1E-03			1E+01	8E-08	3E-01
HEAT	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_2(\text{TE_20150892}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	1E-01	1E-04	2E-03			1E+01	3E-06	2E-01
HEAT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_20362809}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	5E-03	6E-05	1E-03			1E+01	7E-08	3E-01
HEAT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_21675141}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	5E-04	5E-05	1E-03			1E+01	1E-08	3E-01
HEAT	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{indel_7214677}) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	1E-05	2E-01	6E-05			1E+01	1E-07	3E-01
HEAT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{SNP_7344157}) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	1E-05	3E-01	5E-05			1E+01	2E-07	2E-01
HEAT	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{indel_7652616}) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	1E-05	6E-03	3E-05			1E+01	5E-09	3E-01

HEAT	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{indel}_7750735) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	1E-05	3E-01	7E-05			1E+01	1E-07	2E-01
HEAT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{SNP}_7944780) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	1E-05	3E-01	3E-05			1E+01	1E-07	3E-01
HEAT	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{TE}_9650119) + \beta_3(\text{MM707}) + e_i$	8E-06	5E-01	8E-04			1E+01	1E-06	2E-01
HEAT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{SNP}_4896800) + e_i$	4E-05	1E-04	5E-03			1E+01	2E-08	3E-01
HEAT	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{TE}_6357944) + e_i$	8E-05	1E-03	4E-01			1E+01	6E-07	3E-01
HEAT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{SNP}_7980674) + e_i$	1E-04	4E-05	2E-05			2E+01	1E-11	4E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{indel}_17863273) + e_i$	2E-04	2E-04	2E-04	3E-01		1E+01	5E-10	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{SNP}_18173880) + e_i$	1E-04	4E-04	1E-04	4E-01		1E+01	3E-10	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{SNP}_18002233) + e_i$	2E-04	3E-04	1E-04	3E-01		1E+01	4E-10	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{TE}_20150892) + e_i$	1E-04	5E-04	6E-04	8E-01		1E+01	1E-08	3E-01

HEAT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{SNP_20362809}) + e_i$	3E-04	3E-04	1E-04	4E-01	1E+01	5E-10	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{SNP_21675141}) + e_i$	8E-04	2E-04	2E-04	6E-02	1E+01	2E-10	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{indel_7214677}) + e_i$	7E-06	4E-04	5E-05	5E-01	1E+01	1E-09	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{SNP_7344157}) + e_i$	7E-06	3E-04	5E-05	4E-01	1E+01	1E-09	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{indel_7652616}) + e_i$	1E-05	2E-02	5E-05	1E+00	1E+01	1E-09	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{indel_7750735}) + e_i$	8E-06	4E-04	4E-05	4E-01	1E+01	1E-09	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{SNP_7944780}) + e_i$	6E-06	3E-04	2E-05	5E-01	1E+01	9E-10	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{TE_9650119}) + e_i$	6E-05	3E-04	8E-04	5E-01	1E+01	9E-09	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{SNP_4896800}) + e_i$	1E-05	2E-04	2E-03	3E-01	1E+01	7E-10	3E-01

HEAT	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{TE_6357944}) + e_i$	4E-05	5E-04	8E-04	9E-01		1E+01	1E-08	3E-01
HEAT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{MM707}) + \beta_4(\text{SNP_7980674}) + e_i$	5E-05	8E-05	9E-03	1E-03		2E+01	2E-12	4E-01
HEAT	Lfni	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	3E-09	1E-05	9E-05	2E-05		3E+01	2E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_17863273}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	3E-05	2E-04	1E-04	5E-04		2E+01	7E-13	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18002233}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	2E-05	2E-04	1E-04	4E-04		2E+01	2E-13	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18173880}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	2E-05	2E-04	9E-05	4E-04		2E+01	2E-13	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_8547929}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	4E-08	4E-04	9E-05	1E-05		2E+01	2E-15	5E-01
HEAT	Lfni	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{TE_8759468}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	1E-06	5E-01	2E-03	5E-05		2E+01	1E-10	4E-01

HEAT	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{indel_9589063}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	1E-07	2E-02	7E-04	2E-05		2E+01	3E-13	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_9858537}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	1E-07	1E-02	3E-04	1E-05		2E+01	7E-14	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_10202051}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	2E-07	8E-03	2E-04	8E-06		2E+01	7E-14	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_10743038}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	6E-08	4E-02	2E-04	1E-05		2E+01	2E-13	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_13092809}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	2E-08	1E-04	1E-04	7E-06		2E+01	2E-15	5E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_14288480}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	4E-07	1E-01	2E-04	1E-05		2E+01	5E-13	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_14509867}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	4E-07	1E-01	2E-04	1E-05		2E+01	5E-13	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_14518339}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	4E-07	1E-01	2E-04	1E-05		2E+01	5E-13	4E-01

HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_14530903}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	4E-07	1E-01	2E-04	1E-05		2E+01	5E-13	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_14545591}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	3E-07	8E-02	6E-04	4E-05		2E+01	8E-13	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_15861145}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	6E-07	2E-02	3E-04	3E-05		2E+01	1E-13	4E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_16205156}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	1E-07	3E-02	7E-04	1E-04		2E+01	3E-13	4E-01
HEAT	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{indel_7214677}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	7E-08	4E-06	2E-02	9E-05		2E+01	9E-15	5E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{SNP_7344157}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	1E-07	8E-06	2E-02	4E-05		2E+01	3E-14	4E-01
HEAT	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{indel_7652616}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	9E-08	1E-05	5E-04	2E-05		2E+01	8E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{indel_7750735}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	4E-08	5E-06	1E-02	1E-04		2E+01	8E-15	5E-01

HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{SNP_7944780}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	4E-08	6E-06	1E-02	2E-05		2E+01	3E-15	5E-01
HEAT	Lfni	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{TE_9650119}) + \beta_4(\text{MM707}) + e_i$	2E-08	3E-05	3E-03	5E-04		2E+01	5E-14	5E-01
HEAT	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{SNP_4896800}) + e_i$	1E-08	1E-06	1E-03	2E-02		2E+01	4E-14	4E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{indel_17863273}) + e_i$	2E-05	3E-05	1E-04	6E-05	2E-01	2E+01	5E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_18002233}) + e_i$	4E-05	4E-05	8E-05	5E-05	1E-01	2E+01	3E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_18173880}) + e_i$	3E-05	4E-05	6E-05	5E-05	2E-01	2E+01	2E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_8547929}) + e_i$	8E-09	5E-04	1E-04	6E-05	9E-03	2E+01	2.2E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{TE_8759468}) + e_i$	5E-08	3E-05	4E-03	7E-04	9E-01	2E+01	1E-13	5E-01

HEAT	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{indel_9589063}) + e_i$	1E-08	1E-04	8E-04	9E-05	3E-01	2E+01	1E-15	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_9858537}) + e_i$	1E-08	3E-04	3E-04	3E-05	3E-01	2E+01	7E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_10202051}) + e_i$	3E-08	4E-04	1E-04	3E-05	2E-01	2E+01	7E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_10743038}) + e_i$	8E-09	2E-04	2E-04	4E-05	5E-01	2E+01	9E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_13092809}) + e_i$	1E-08	6E-02	1E-04	2E-05	8E-01	2E+01	1E-15	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_14288480}) + e_i$	2E-08	8E-05	2E-04	4E-05	9E-01	2E+01	1E-15	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_14509867}) + e_i$	2E-08	8E-05	2E-04	4E-05	9E-01	2E+01	1E-15	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_14518339}) + e_i$	2E-08	8E-05	2E-04	4E-05	9E-01	2E+01	1E-15	5E-01

HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP}_{14530903}) + e_i$	2E-08	8E-05	2E-04	4E-05	9E-01	2E+01	1E-15	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP}_{14545591}) + e_i$	1E-08	6E-05	4E-04	1E-04	7E-01	2E+01	1E-15	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP}_{15861145}) + e_i$	4E-08	2E-04	2E-04	8E-05	3E-01	2E+01	7E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM7075}) + \beta_5(\text{SNP}_{16205156}) + e_i$	1E-08	1E-04	6E-04	3E-04	3E-01	2E+01	1E-15	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{indel}_{7214677}) + e_i$	1E-08	7E-06	3E-03	7E-05	4E-01	2E+01	5E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP}_{7344157}) + e_i$	1E-08	1E-05	1E-03	3E-05	5E-01	2E+01	9E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{indel}_{7652616}) + e_i$	2E-08	2E-05	2E-02	2E-05	2E-01	2E+01	3E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{indel}_{7750735}) + e_i$	7E-09	1E-05	4E-03	7E-05	4E-01	2E+01	7E-16	5E-01

HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_7944780}) + e_i$	8E-09	1E-05	9E-03	2E-05	4E-01	2E+01	5E-16	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{TE_9650119}) + e_i$	3E-08	3E-05	3E-01	6E-04	2E-01	2E+01	1E-13	5E-01
HEAT	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM418}) + \beta_3(\text{MM693}) + \beta_4(\text{MM707}) + \beta_5(\text{SNP_4896800}) + e_i$	4E-09	1E-05	4E-04	5E-04	6E-01	2E+01	6E-16	5E-01
HEAT	GA	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM159}) + e_i$	3E-05					2E+01	3E-05	1E-01
HEAT	GA	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_20150892}) + e_i$	5E-01					4E-01	5E-01	-6E-03
HEAT	GA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_20362809}) + e_i$	5E-03					5E+00	1E-02	6E-02
HEAT	GA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_21675141}) + e_i$	2E-03					5E+00	8E-03	6E-02
HEAT	GA	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM159}) + \beta_2(\text{TE_20150892}) + e_i$	1E-05	8E-01				1E+01	6E-05	2E-01
HEAT	GA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM159}) + \beta_2(\text{SNP_20362809}) + e_i$	5E-04	1E-01				8E+00	1E-04	1E-01
HEAT	GA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM159}) + \beta_2(\text{SNP_21675141}) + e_i$	4E-04	7E-02				8E+00	6E-05	1E-01
HEAT	GALA	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + e_i$	3E-04					1E+01	3E-04	1E-01
HEAT	GALA	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_6617937}) + e_i$	2E-01					2E+00	2E-01	8E-03
HEAT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_7241579}) + e_i$	3E-02					3E+00	4E-02	4E-02
HEAT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_9497509}) + e_i$	8E-02					2E+00	2E-01	1E-02

HEAT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_9883998}) + e_i$	8E-02					2E+00	2E-01	1E-02
HEAT	GALA	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_12177658}) + e_i$	6E-01					6E-01	6E-01	-1E-02
HEAT	GALA	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_12617099}) + e_i$	7E-01					4E-01	7E-01	-2E-02
HEAT	GALA	123	Foot-print	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{Foot-print_12620247}) + e_i$	7E-01					2E-01	7E-01	-7E-03
HEAT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_13033405}) + e_i$	4E-01					5E-01	6E-01	-9E-03
HEAT	GALA	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_13908828}) + e_i$	2E-01					1E+00	4E-01	-5E-04
HEAT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_13967107}) + e_i$	2E-01					1E+00	3E-01	5E-03
HEAT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14023610}) + e_i$	2E-01					1E+00	3E-01	5E-03
HEAT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14590272}) + e_i$	3E-02					2E+00	9E-02	2E-02
HEAT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_15509104}) + e_i$	1E-01					2E+00	1E-01	2E-02
HEAT	GALA	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_15935454}) + e_i$	6E-02					3E+00	5E-02	3E-02
HEAT	GALA	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_15972511}) + e_i$	9E-02					2E+00	2E-01	8E-03
HEAT	GALA	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_16836944}) + e_i$	1E-02					7E+00	1E-02	5E-02
HEAT	GALA	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_17863273}) + e_i$	4E-02					3E+00	8E-02	3E-02
HEAT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18002233}) + e_i$	3E-02					3E+00	8E-02	2E-02
HEAT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18173880}) + e_i$	4E-02					3E+00	7E-02	3E-02
HEAT	GALA	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{TE_6617937}) + e_i$	1E-03	6E-01				7E+00	2E-03	1E-01
HEAT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{SNP_7241579}) + e_i$	6E-03	4E-01				5E+00	3E-03	9E-02

HEAT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{SNP}_{9497509}) + e_i$	2E-03	5E-01				5E+00	5E-03	8E-02
HEAT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{SNP}_{9883998}) + e_i$	1E-03	4E-01				5E+00	3E-03	9E-02
HEAT	GALA	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{TE}_{12177658}) + e_i$	6E-04	3E-01				4E+00	8E-03	9E-02
HEAT	GALA	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{TE}_{12617099}) + e_i$	4E-04	2E-01				4E+00	7E-03	1E-01
HEAT	GALA	123	Marker + Footprint	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{Footprint}_{12620247}) + e_i$	3E-04	5E-01				7E+00	1E-03	9E-02
HEAT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{SNP}_{13033405}) + e_i$	4E-04	5E-01				5E+00	4E-03	9E-02
HEAT	GALA	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{indel}_{13908828}) + e_i$	1E-03	9E-01				5E+00	5E-03	8E-02
HEAT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{SNP}_{13967107}) + e_i$	7E-04	1E+00				5E+00	3E-03	9E-02
HEAT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{SNP}_{14023610}) + e_i$	7E-04	1E+00				5E+00	3E-03	9E-02
HEAT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{SNP}_{14590272}) + e_i$	5E-03	8E-01				4E+00	5E-03	8E-02
HEAT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{SNP}_{15509104}) + e_i$	2E-03	7E-01				5E+00	3E-03	9E-02
HEAT	GALA	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{indel}_{15935454}) + e_i$	2E-03	5E-01				5E+00	2E-03	1E-01
HEAT	GALA	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{indel}_{15972511}) + e_i$	2E-03	6E-01				5E+00	5E-03	8E-02
HEAT	GALA	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{TE}_{16836944}) + e_i$	4E-03	1E-01				8E+00	6E-04	1E-01

HEAT	GALA	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{indel_17863273}) + e_i$	1E-03	3E-01				6E+00	1E-03	1E-01
HEAT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{SNP_18002233}) + e_i$	2E-03	3E-01				5E+00	2E-03	1E-01
HEAT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM12}) + \beta_2(\text{SNP_18173880}) + e_i$	1E-03	3E-01				6E+00	1E-03	1E-01
HEAT	Rbi	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + e_i$	8E-05	3E-04				2E+01	2E-07	2E-01
HEAT	Rbi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_20150892}) + \beta_2(\text{MM679}) + e_i$	6E-01	3E-04				7E+00	1E-03	1E-01
HEAT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_20362809}) + \beta_2(\text{MM679}) + e_i$	2E-03	1E-04				1E+01	5E-06	2E-01
HEAT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_21675141}) + \beta_2(\text{MM679}) + e_i$	1E-03	9E-05				1E+01	8E-06	2E-01
HEAT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{SNP_3318778}) + e_i$	6E-05	2E-01				8E+00	7E-05	1E-01
HEAT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{SNP_4474111}) + e_i$	7E-05	1E-01				9E+00	2E-05	2E-01
HEAT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{SNP_5115842}) + e_i$	1E-04	1E-01				8E+00	1E-04	1E-01
HEAT	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{indel_7214677}) + e_i$	7E-05	1E-01				9E+00	3E-05	2E-01
HEAT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{SNP_7344157}) + e_i$	7E-05	2E-01				7E+00	2E-04	1E-01
HEAT	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{indel_7652616}) + e_i$	9E-05	2E-02				9E+00	3E-05	2E-01

HEAT	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{indel_7750735}) + e_i$	7E-05	2E-01				7E+00	2E-04	1E-01
HEAT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{SNP_7944780}) + e_i$	3E-04	3E-01				6E+00	1E-03	1E-01
HEAT	Rbi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{TE_9650119}) + e_i$	3E-05	4E-01				1E+01	1E-04	2E-01
HEAT	Rbi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{TE_20150892}) + e_i$	1E-04	1E-03	4E-01			1E+01	3E-06	2E-01
HEAT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{SNP_20362809}) + e_i$	4E-03	3E-04	1E-01			1E+01	4E-07	2E-01
HEAT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{SNP_21675141}) + e_i$	4E-03	3E-04	7E-02			1E+01	5E-07	2E-01
HEAT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{SNP_3318778}) + e_i$	7E-05	5E-04	7E-01			1E+01	7E-07	2E-01
HEAT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{SNP_4474111}) + e_i$	7E-05	2E-03	1E+00			1E+01	7E-07	2E-01
HEAT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{SNP_5115842}) + e_i$	1E-04	9E-04	1E+00			9E+00	2E-06	2E-01
HEAT	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{indel_7214677}) + e_i$	7E-05	2E-03	8E-01			1E+01	9E-07	2E-01
HEAT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{SNP_7344157}) + e_i$	6E-05	7E-04	5E-01			9E+00	3E-06	2E-01
HEAT	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{indel_7652616}) + e_i$	6E-05	5E-03	5E-01			9E+00	2E-06	2E-01

HEAT	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{indel_7750735}) + e_i$	6E-05	8E-04	6E-01			9E+00	3E-06	2E-01
HEAT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{SNP_7944780}) + e_i$	2E-04	1E-03	6E-01			8E+00	2E-05	2E-01
HEAT	Rbi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM147}) + \beta_2(\text{MM679}) + \beta_3(\text{TE_9650119}) + e_i$	2E-04	2E-03	8E-01			1E+01	4E-06	2E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	8E-06	3E-06	6E-08	3E-04		2E+01	1E-14	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_12177658}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	6E-01	2E-05	1E-04	1E-02		8E+00	6E-07	3E-01
DROUGHT	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_12617099}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	3E-01	1E-05	1E-04	6E-03		8E+00	8E-07	3E-01
DROUGHT	Lfi	123	Foot-print	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{Foot-print_12620247}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	2E-01	3E-07	5E-07	1E-03		2E+01	2E-10	3E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_13033405}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	1E-03	2E-06	1E-07	2E-03		2E+01	2E-11	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_13908828}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	9E-04	2E-06	9E-08	3E-03		2E+01	1E-11	4E-01

DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{13967107}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	1E-03	1E-06	9E-08	2E-03		2E+01	1E-11	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14023610}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	1E-03	1E-06	7E-08	2E-03		2E+01	9E-12	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14590272}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	7E-04	2E-06	4E-08	2E-03		2E+01	5E-12	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{15509104}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	1E-03	3E-06	5E-08	3E-03		2E+01	2E-11	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{15935454}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	4E-04	1E-06	2E-07	3E-03		2E+01	5E-12	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{15972511}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	5E-04	1E-06	3E-07	4E-03		2E+01	2E-11	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_{16836944}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	2E-03	2E-07	1E-04	1E-03		2E+01	1E-09	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{17863273}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	4E-03	2E-06	6E-07	2E-03		2E+01	2E-11	4E-01

DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{18002233}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_4(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	2E-03	7E-06	5E-07	3E-03		2E+01	9E-12	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{18173880}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	4E-03	8E-06	6E-07	2E-03		2E+01	4E-12	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_1(\text{SNP}_{10743038}) + \beta_2(\text{MM701}) + e_i$	1E-04	9E-05	4E-03	4E-02		1E+01	2E-09	3E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP}_{13092809}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	5E-06	2E-05	2E-06	2E-03		2E+01	1E-12	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP}_{14288480}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	1E-03	3E-05	5E-03	3E-02		1E+01	3E-09	3E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP}_{14509867}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	1E-03	3E-05	5E-03	3E-02		1E+01	3E-09	3E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP}_{14518339}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	1E-03	3E-05	5E-03	3E-02		1E+01	3E-09	3E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP}_{14530903}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	1E-03	3E-05	5E-03	3E-02		1E+01	3E-09	3E-01

DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP_14545591}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	1E-03	3E-05	5E-03	3E-02		1E+01	4E-09	3E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP_15861145}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	1E-03	3E-05	5E-03	3E-02		1E+01	4E-09	3E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP_16205156}) + \beta_4(\text{MM701}) + e_i$	7E-04	2E-05	1E-04	4E-02		1E+01	1E-10	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{TE_9650119}) + e_i$	2E-04	3E-04	6E-04	2E-03		2E+01	4E-10	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{SNP_10012411}) + e_i$	5E-05	2E-05	6E-06	2E-01		2E+01	1E-11	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{SNP_10291133}) + e_i$	2E-04	2E-05	5E-06	1E-01		2E+01	1E-11	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{TE_12177658}) + e_i$	5E-05	9E-05	5E-05	3E-03	7E-01	1E+01	1E-09	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{TE_12617099}) + e_i$	2E-04	3E-05	6E-05	1E-03	8E-01	1E+01	4E-09	4E-01

DROUGHT	Lfi	123	Marker + Foot-print	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{Foot-print}_{12620247}) + e_i$	2E-05	3E-06	1E-07	3E-04	4E-01	2E+01	9E-14	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{13033405}) + e_i$	4E-04	6E-06	1E-07	5E-04	5E-02	2E+01	2E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{indel}_{13908828}) + e_i$	3E-04	8E-06	6E-08	7E-04	1E-01	2E+01	1E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{13967107}) + e_i$	8E-04	5E-06	6E-08	6E-04	1E-01	2E+01	2E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{14023610}) + e_i$	7E-04	4E-06	5E-08	6E-04	9E-02	2E+01	1E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{14590272}) + e_i$	3E-03	7E-06	1E-07	7E-04	8E-01	2E+01	3E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{15509104}) + e_i$	1E-03	2E-05	3E-08	1E-03	1E-01	2E+01	4E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{indel}_{15935454}) + e_i$	3E-04	7E-06	7E-08	9E-04	5E-02	2E+01	4E-14	4E-01

DROUGHT	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{indel_15972511}) + e_i$	7E-04	1E-05	7E-08	2E-03	5E-02	2E+01	4E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{TE_16836944}) + e_i$	5E-03	7E-06	4E-05	5E-04	9E-02	1E+01	1E-10	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{indel_17863273}) + e_i$	7E-04	4E-06	2E-07	5E-04	5E-01	2E+01	3E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP_18002233}) + e_i$	1E-03	1E-05	2E-07	7E-04	3E-01	2E+01	2E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP_18173880}) + e_i$	7E-04	1E-05	2E-07	4E-04	5E-01	2E+01	7E-14	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP_10743038}) + e_i$	2E-05	8E-06	1E-06	1E-03	4E-01	2E+01	1E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP_13092809}) + e_i$	3E-06	1E-05	8E-03	4E-04	8E-01	2E+01	2E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP_14288480}) + e_i$	4E-05	7E-06	3E-06	6E-04	6E-01	2E+01	3E-13	4E-01

DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{14509867}) + e_i$	4E-05	7E-06	3E-06	6E-04	6E-01	2E+01	3E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{14518339}) + e_i$	4E-05	7E-06	3E-06	6E-04	6E-01	2E+01	3E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{14530903}) + e_i$	4E-05	7E-06	3E-06	6E-04	6E-01	2E+01	3E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{14545591}) + e_i$	5E-05	7E-06	3E-06	7E-04	6E-01	2E+01	5E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{15861145}) + e_i$	2E-04	4E-06	9E-05	2E-03	1E-01	2E+01	2E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{16205156}) + e_i$	6E-05	5E-06	7E-05	2E-03	1E-01	2E+01	2E-13	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{BTE}_{9650119}) + e_i$	7E-05	7E-05	1E-04	2E-02	4E-02	1E+01	1E-10	4E-01
DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP}_{10012411}) + e_i$	1E-05	5E-06	3E-07	1E-03	5E-01	2E+01	4E-13	4E-01

DROUGHT	Lfi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM515}) + \beta_4(\text{MM701}) + \beta_5(\text{SNP_10291133}) + e_i$	3E-05	4E-06	2E-07	1E-03	3E-01	2E+01	4E-13	4E-01
	Lfni	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	4E-03	1E-05				2E+01	8E-06	5E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_9497509}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	6E-03	4E-05				1E+01	4E-05	5E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_9883998}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	8E-03	4E-05				1E+01	3E-05	5E-01
	Lfni	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_12617099}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	6E-01	4E-03				5E+00	1E-02	3E-01
	Lfni	123	Foot-print	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{Foot-print_12620247}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	0E+00	9E-05				2E+01	9E-05	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_13033405}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	2E-01	1E-04				8E+00	5E-04	4E-01
	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_13908828}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	2E-01	1E-04				8E+00	4E-04	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_13967107}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	2E-01	1E-04				8E+00	4E-04	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14023610}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	2E-01	1E-04				8E+00	4E-04	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14590272}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	2E-01	8E-05				8E+00	6E-04	4E-01

	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_15509104}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	6E-01	1E-04				8E+00	8E-04	4E-01
	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_15935454}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	6E-01	2E-04				7E+00	8E-04	4E-01
	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_15972511}) + \beta_2(\text{MM432}) + e_i$	7E-01	5E-04				6E+00	2E-03	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{SNP_10202051}) + e_i$	8E-02	5E-04				1E+01	3E-04	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{SNP_10743038}) + e_i$	1E-01	7E-04				1E+01	3E-04	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{SNP_13092809}) + e_i$	7E-03	2E-05				1E+01	1E-05	6E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{SNP_14288480}) + e_i$	1E-01	2E-02				8E+00	5E-04	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{SNP_14509867}) + e_i$	1E-01	9E-04				8E+00	5E-04	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{SNP_14518339}) + e_i$	1E-01	9E-04				8E+00	5E-04	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{SNP_14530903}) + e_i$	1E-01	9E-04				8E+00	5E-04	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{SNP_14545591}) + e_i$	1E-01	9E-04				8E+00	5E-04	4E-01
	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{SNP_15861145}) + e_i$	6E-02	6E-03				7E+00	3E-03	3E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP_9497509}) + e_i$	1E-01	2E-05	1E-01			1E+01	5E-05	5E-01

	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP_9883998}) + e_i$	1E-01	3E-05	2E-01			1E+01	4E-05	6E-01
	Lfni	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{TE_12617099}) + e_i$	2E-03	7E-04	2E-01			9E+00	3E-04	5E-01
	Lfni	123	Marker + Footprint	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{Footprint_12620247}) + e_i$	4E-03	1E-05	0E+00			2E+01	8E-06	5E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP_13033405}) + e_i$	6E-03	4E-05	2E-01			1E+01	5E-05	6E-01
	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{indel_13908828}) + e_i$	1E-02	3E-05	5E-01			9E+00	8E-05	5E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP_13967107}) + e_i$	1E-02	3E-05	5E-01			9E+00	8E-05	5E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP_14023610}) + e_i$	1E-02	3E-05	5E-01			9E+00	8E-05	5E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP_14590272}) + e_i$	2E-02	2E-05	7E-01			9E+00	1E-04	5E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP_15509104}) + e_i$	3E-03	3E-05	2E-01			1E+01	4E-05	6E-01
	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{indel_15935454}) + e_i$	4E-03	2E-05	2E-01			1E+01	5E-05	5E-01
	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{indel_15972511}) + e_i$	5E-03	5E-05	2E-01			9E+00	1E-04	5E-01

	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP}_{10202051}) + e_i$	1E-02	1E-03	4E-02			2E+01	5E-06	6E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP}_{10743038}) + e_i$	2E-02	4E-04	2E-02			2E+01	3E-06	6E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP}_{13092809}) + e_i$	7E-03	2E-05	1E-01			1E+01	1E-05	6E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP}_{14288480}) + e_i$	2E-02	4E-03	3E-01			1E+01	3E-05	6E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP}_{14509867}) + e_i$	2E-02	4E-03	3E-01			1E+01	3E-05	6E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP}_{14518339}) + e_i$	2E-02	4E-03	3E-01			1E+01	3E-05	6E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP}_{14530903}) + e_i$	2E-02	4E-03	3E-01			1E+01	3E-05	6E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP}_{14545591}) + e_i$	2E-02	4E-03	3E-01			1E+01	3E-05	6E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP}_{15861145}) + e_i$	7E-03	9E-04	6E-01			1E+01	4E-05	5E-01
	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM25}) + \beta_2(\text{MM432}) + \beta_3(\text{SNP}_{16205156}) + e_i$	7E-03	8E-04	3E-05			1E+01	3E-05	5E-01
DROUGHT	GALA	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	5E-06	2E-04				2E+01	6E-09	3E-01

DROUGHT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{13092809}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	7E-06	3E-04				1E+01	6E-08	2E-01
DROUGHT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14288480}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	9E-04	3E-05				1E+01	5E-06	2E-01
DROUGHT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14509867}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	9E-04	3E-05				1E+01	5E-06	2E-01
DROUGHT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14518339}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	9E-04	3E-05				1E+01	5E-06	2E-01
DROUGHT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14530903}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	9E-04	3E-05				1E+01	5E-06	2E-01
DROUGHT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14545591}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	9E-04	3E-05				1E+01	5E-06	2E-01
DROUGHT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{15861145}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	1E-03	8E-05				1E+01	3E-06	2E-01
DROUGHT	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{16205156}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	7E-04	1E-04				1E+01	4E-06	2E-01
DROUGHT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP}_{13092809}) + e_i$	7E-06	3E-04	7E-01			1E+01	6E-08	2E-01
DROUGHT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP}_{14288480}) + e_i$	6E-04	2E-04	1E-01			1E+01	6E-08	3E-01
DROUGHT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP}_{14509867}) + e_i$	6E-04	2E-04	1E-01			1E+01	6E-08	3E-01

DROUGHT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_14518339}) + e_i$	6E-04	2E-04	1E-01			1E+01	6E-08	3E-01
DROUGHT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_14530903}) + e_i$	6E-04	2E-04	1E-01			1E+01	6E-08	3E-01
DROUGHT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_14545591}) + e_i$	7E-04	2E-04	1E-01			1E+01	7E-08	3E-01
DROUGHT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_15861145}) + e_i$	4E-04	2E-04	1E-01			1E+01	3E-08	3E-01
DROUGHT	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_16205156}) + e_i$	4E-04	2E-04	1E-01			1E+01	3E-08	3E-01
DROUGHT	GA	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	9E-03	2E-02				7E+00	1E-03	9E-02
DROUGHT	GA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_13033405}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	4E-03	2E-02				5E+00	2E-03	1E-01
DROUGHT	GA	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_13908828}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	9E-04	2E-02				6E+00	7E-04	1E-01
DROUGHT	GA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_13967107}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	7E-04	2E-02				6E+00	5E-04	1E-01
DROUGHT	GA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14023610}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	7E-04	2E-02				6E+00	5E-04	1E-01
DROUGHT	GA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14590272}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	5E-03	2E-02				5E+00	3E-03	9E-02

DROUGHT	GA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{15509104}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	2E-03	2E-02				6E+00	7E-04	1E-01
DROUGHT	GA	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{15935454}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	7E-04	2E-02				6E+00	5E-04	1E-01
DROUGHT	GA	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{15972511}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	7E-04	1E-02				7E+00	4E-04	1E-01
DROUGHT	GA	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_{16836944}) + \beta_1(\text{MM383}) + e_i$	1E-02	3E-02				6E+00	5E-03	8E-02
DROUGHT	GA	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{17863273}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	7E-03	3E-02				5E+00	3E-03	9E-02
DROUGHT	GA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{18002233}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	1E-02	4E-02				5E+00	5E-03	8E-02
DROUGHT	GA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{18173880}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	1E-02	4E-02				4E+00	5E-03	8E-02
DROUGHT	GA	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_{20150892}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	1E-01	3E-02				4E+00	3E-02	5E-02
DROUGHT	GA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{20362809}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	5E-02	3E-02				4E+00	1E-02	6E-02
DROUGHT	GA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{21675141}) + \beta_2(\text{MM383}) + e_i$	4E-03	4E-02				5E+00	2E-03	1E-01
DROUGHT	GA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{SNP}_{13033405}) + e_i$	1E-01	3E-02	6E-02			4E+00	2E-03	1E-01

DROUGHT	GA	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{indel_13908828}) + e_i$	4E-01	3E-02	2E-02			5E+00	1E-03	1E-01
DROUGHT	GA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{SNP_13967107}) + e_i$	4E-01	2E-02	2E-02			5E+00	1E-03	1E-01
DROUGHT	GA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{SNP_14023610}) + e_i$	3E-01	2E-02	2E-02			5E+00	9E-04	1E-01
DROUGHT	GA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{SNP_14590272}) + e_i$	8E-01	2E-02	3E-01			4E+00	8E-03	8E-02
DROUGHT	GA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{SNP_15509104}) + e_i$	3E-01	2E-02	4E-02			5E+00	1E-03	1E-01
DROUGHT	GA	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{indel_15935454}) + e_i$	3E-01	3E-02	2E-02			5E+00	8E-04	1E-01
DROUGHT	GA	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{indel_15972511}) + e_i$	3E-01	2E-02	2E-02			5E+00	7E-04	1E-01
DROUGHT	GA	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{TE_16836944}) + e_i$	3E-01	4E-02	6E-02			4E+00	9E-03	8E-02
DROUGHT	GA	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{indel_17863273}) + e_i$	1E-01	4E-02	1E-01			4E+00	3E-03	1E-01
DROUGHT	GA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{SNP_18002233}) + e_i$	1E-01	5E-02	2E-01			4E+00	4E-03	9E-02
DROUGHT	GA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{SNP_18173880}) + e_i$	1E-01	5E-02	2E-01			4E+00	4E-03	9E-02

DROUGHT	GA	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{TE_20150892}) + e_i$	1E-01	4E-02	3E-01			3E+00	3E-02	6E-02
DROUGHT	GA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{SNP_20362809}) + e_i$	5E-02	4E-02	5E-01			4E+00	6E-03	9E-02
DROUGHT	GA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM123}) + \beta_2(\text{MM383}) + \beta_3(\text{SNP_21675141}) + e_i$	6E-02	6E-02	3E-02			5E+00	9E-04	1E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	2E-05	2E-04				2E+01	2E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Foot-print	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{Foot-print_12620247}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	9E-01	4E-04				7E+00	2E-03	8E-02
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_13033405}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	3E-04	5E-04				9E+00	2E-05	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_13908828}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	1E-04	5E-04				1E+01	4E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_13967107}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	1E-04	2E-04				1E+01	3E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14023610}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	1E-04	3E-04				1E+01	5E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14590272}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	2E-05	5E-04				1E+01	1E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_15935454}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	3E-05	3E-04				1E+01	1E-06	2E-01

DROUGHT	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{15972511}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	7E-05	7E-04				1E+01	1E-05	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_{16836944}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	6E-04	4E-04				1E+01	1E-05	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{17863273}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	7E-04	9E-05				1E+01	8E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{18002233}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	5E-04	2E-04				1E+01	4E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{18173880}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	7E-04	2E-04				1E+01	2E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_{20150892}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	2E-02	8E-04				9E+00	3E-04	1E-01
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{20362809}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	3E-04	1E-04				1E+01	4E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{21675141}) + \beta_2(\text{MM691}) + e_i$	5E-06	2E-04				1E+01	2E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{indel}_{7214677}) + e_i$	1E-04	2E-01				7E+00	2E-04	1E-01
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP}_{7344157}) + e_i$	1E-04	2E-01				7E+00	2E-04	1E-01
DROUGHT	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{indel}_{7652616}) + e_i$	5E-05	8E-03				9E+00	1E-05	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{indel}_{7750735}) + e_i$	8E-05	1E-01				7E+00	1E-04	1E-01

DROUGHT	Rbi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{indel_7750735}) + e_i$	8E-05	1E-01				7E+00	1E-04	1E-01
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_7944780}) + e_i$	6E-05	1E-01				8E+00	9E-05	1E-01
DROUGHT	Rbi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{TE_9650119}) + e_i$	2E-05	2E-03				1E+01	2E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_10012411}) + e_i$	4E-05	3E-02				9E+00	3E-05	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{SNP_10291133}) + e_i$	2E-04	3E-02				8E+00	5E-05	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + Foot-print	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{Foot-print_12620247}) + e_i$	2E-05	3E-04	7E-01			1E+01	1E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_13033405}) + e_i$	2E-03	4E-04	2E-02			1E+01	5E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{indel_13908828}) + e_i$	3E-03	4E-04	2E-02			1E+01	2E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_13967107}) + e_i$	5E-03	2E-04	2E-02			1E+01	2E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_14023610}) + e_i$	3E-03	2E-04	2E-02			1E+01	3E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_14590272}) + e_i$	8E-02	5E-04	2E-01			1E+01	1E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_15509104}) + e_i$	4E-03	9E-04	5E-02			1E+01	1E-06	2E-01

DROUGHT	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{indel_15935454}) + e_i$	3E-03	3E-04	1E-02			1E+01	7E-08	3E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{indel_15972511}) + e_i$	3E-03	7E-04	1E-02			1E+01	6E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{TE_16836944}) + e_i$	3E-03	7E-04	3E-02			1E+01	7E-07	3E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{indel_17863273}) + e_i$	4E-03	1E-04	2E-01			1E+01	6E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_18002233}) + e_i$	7E-03	2E-04	1E-01			1E+01	4.46E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_18173880}) + e_i$	6E-03	2E-04	2E-01			1E+01	2E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_18173880}) + e_i$	6E-03	2E-04	2E-01			1E+01	2E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{TE_20150892}) + e_i$	5E-04	1E-03	2E-01			1E+01	3E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_20362809}) + e_i$	7E-03	2E-04	9E-02			1E+01	5E-07	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_21675141}) + e_i$	2E-03	1E-04	7E-04			1E+01	5E-09	3E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{indel_7214677}) + e_i$	4E-05	8E-04	9E-01			9E+00	4E-06	2E-01

DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_7344157}) + e_i$	3E-05	8E-04	1E+00			9E+00	3E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{indel_7652616}) + e_i$	1E-05	5E-03	7E-01			1E+01	1E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{indel_7750735}) + e_i$	2E-05	8E-04	1E+00			9E+00	2E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_7944780}) + e_i$	2E-05	5E-03	9E-01			8E+00	6E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{TE_9650119}) + e_i$	4E-05	2E-01	2E-01			1E+01	4E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_10012411}) + e_i$	1E-05	4E-03	1E+00			9E+00	2E-06	2E-01
DROUGHT	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM126}) + \beta_2(\text{MM691}) + \beta_3(\text{SNP_10291133}) + e_i$	5E-05	5E-03	7E-01			9E+00	4E-06	2E-01
FLOOD	Rbi	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM167}) + e_i$	4E-04					1E+01	4E-04	9E-02
FLOOD	Rbi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_10506856}) + e_i$	2E-01					1E+00	4E-01	7E-04
FLOOD	Rbi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_11434437}) + e_i$	2E-01					1E+00	3E-01	2E-03
FLOOD	Rbi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM167}) + \beta_2(\text{TE_10506856}) + e_i$	1E-03	6E-01				5E+00	5E-03	1E-01
FLOOD	Rbi	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM167}) + \beta_2(\text{SNP_11434437}) + e_i$	1E-03	3E-01				5E+00	5E-03	8E-02
FLOOD	GALA	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	5E-06	2E-04				2E+01	6E-09	3E-01

FLOOD	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{13092809}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	7E-06	3E-04				1E+01	6E-08	2E-01
FLOOD	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14288480}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	9E-04	3E-05				1E+01	5E-06	2E-01
FLOOD	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14509867}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	9E-04	3E-05				1E+01	5E-06	2E-01
FLOOD	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14518339}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	9E-04	3E-05				1E+01	5E-06	2E-01
FLOOD	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14530903}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	9E-04	3E-05				1E+01	5E-06	2E-01
FLOOD	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14545591}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	9E-04	3E-05				1E+01	5E-06	2E-01
FLOOD	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{15861145}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	1E-03	8E-05				1E+01	3E-06	2E-01
FLOOD	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{16205156}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	7E-04	1E-04				1E+01	4E-06	2E-01
FLOOD	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{18112512}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	1E-03	7E-05				1E+01	5E-06	2E-01
FLOOD	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{18253358}) + \beta_2(\text{MM863}) + e_i$	2E-03	8E-05				1E+01	8E-06	2E-01
FLOOD	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{SNP}_{10075739}) + e_i$	5E-06	3E-02				1E+01	4E-06	2E-01

FLOOD	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_13092809}) + e_i$	7E-06	3E-04	7E-01			1E+01	6E-08	2E-01
FLOOD	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_14288480}) + e_i$	6E-04	2E-04	1E-01			1E+01	6E-08	3E-01
FLOOD	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_14509867}) + e_i$	6E-04	2E-04	1E-01			1E+01	6E-08	3E-01
FLOOD	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_14518339}) + e_i$	6E-04	2E-04	1E-01			1E+01	6E-08	3E-01
FLOOD	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_14530903}) + e_i$	6E-04	2E-04	1E-01			1E+01	6E-08	3E-01
FLOOD	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_14545591}) + e_i$	7E-04	2E-04	1E-01			1E+01	7E-08	3E-01
FLOOD	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_15861145}) + e_i$	4E-04	2E-04	1E-01			1E+01	3E-08	3E-01
FLOOD	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_16205156}) + e_i$	6E-04	3E-04	7E-02			1E+01	5E-08	3E-01
FLOOD	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_18112512}) + e_i$	3E-04	2E-04	7E-02			1E+01	3E-08	3E-01
FLOOD	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_18253358}) + e_i$	2E-04	2E-04	7E-02			1E+01	4E-08	3E-01
FLOOD	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM432}) + \beta_2(\text{MM863}) + \beta_3(\text{SNP_10075739}) + e_i$	1E-05	1E-03	2E-01			1E+01	1E-07	3E-01

FLOOD	Lfni	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	7E-07	1E-05	7E-06			2E+01	2E-12	4E-01
FLOOD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_9497509) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	2E-03	5E-06	2E-05			1E+01	7E-09	3E-01
FLOOD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_9883998) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	6E-03	1E-05	6E-05			1E+01	6E-08	3E-01
FLOOD	Lfni	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_12177658) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	3E-01	3E-05	3E-03			8E+00	2E-05	2E-01
FLOOD	Lfni	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_12617099) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	2E-01	9E-05	2E-03			6E+00	1E-04	2E-01
FLOOD	Lfni	123	Foot-print	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{Foot-print}_12620247) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	4E-01	3E-06	2E-04			1E+01	4E-07	2E-01
FLOOD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_13033405) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	2E-02	5E-06	1E-04			1E+01	1E-07	3E-01
FLOOD	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_13908828) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	2E-02	2E-06	3E-05			1E+01	2E-08	3E-01
FLOOD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_13967107) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	1E-02	4E-06	5E-05			1E+01	5E-08	3E-01

FLOOD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14023610}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	7E-03	5E-06	6E-05			1E+01	5E-08	3E-01
FLOOD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_14590272}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	9E-05	4E-06	2E-05			2E+01	4E-10	3E-01
FLOOD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_15509104}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	4E-03	5E-06	7E-05			1E+01	4E-08	3E-01
FLOOD	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_15935454}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	7E-03	2E-06	6E-05			1E+01	2E-08	3E-01
FLOOD	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_15972511}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	6E-03	1E-06	1E-04			1E+01	2E-08	3E-01
FLOOD	Lfni	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_16836944}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	3E-01	7E-06	3E-03			1E+01	7E-06	2E-01
FLOOD	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_17863273}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	2E-03	1E-05	1E-04			1E+01	2E-08	3E-01
FLOOD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18002233}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	3E-03	2E-05	1E-04			1E+01	3E-08	3E-01
FLOOD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18173880}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + e_i$	2E-03	2E-05	1E-04			1E+01	2E-08	3E-01

FLOOD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP_15861145}) + e_i$	1E-04	3E-05	2E-05			2E+01	2E-11	4E-01
FLOOD	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{SNP_16205156}) + e_i$	1E-04	2E-05	2E-06			2E+01	4E-12	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{SNP_9497509}) + e_i$	5E-05	8E-06	4E-06	9E-01		2E+01	1E-11	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{SNP_9883998}) + e_i$	7E-05	3E-05	2E-05	8E-01		1E+01	1E-10	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{TE_12177658}) + e_i$	2E-05	3E-05	1E-04	5E-01		1E+01	1E-08	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{TE_12617099}) + e_i$	4E-05	7E-05	1E-04	5E-01		9E+00	1E-07	3E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + Footprint	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{Footprint_12620247}) + e_i$	1E-06	2E-05	9E-06	6E-01		2E+01	2E-11	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{SNP_13033405}) + e_i$	2E-05	2E-05	1E-05	7E-01		1E+01	8E-11	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{indel_13908828}) + e_i$	8E-06	5E-06	2E-06	7E-01		2E+01	7E-12	4E-01

FLOOD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{SNP_13967107}) + e_i$	5E-05	2E-05	9E-06	4E-01		1E+01	7E-11	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{SNP_14023610}) + e_i$	3E-05	2E-05	9E-06	3E-01		1E+01	6E-11	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{SNP_14590272}) + e_i$	1E-03	9E-06	5E-06	3E-01		2E+01	1E-11	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{SNP_15509104}) + e_i$	2E-05	2E-05	7E-06	3E-01		2E+01	3E-11	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{indel_15935454}) + e_i$	1E-05	7E-06	3E-06	3E-01		2E+01	7E-12	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{indel_15972511}) + e_i$	5E-05	9E-06	7E-06	2E-01		2E+01	3E-11	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{TE_16836944}) + e_i$	3E-05	1E-04	9E-05	7E-01		1E+01	6E-09	3E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{indel_17863273}) + e_i$	2E-05	3E-05	1E-05	7E-02		2E+01	1E-11	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{SNP_18002233}) + e_i$	2E-05	5E-05	1E-05	9E-02		2E+01	2E-11	4E-01

FLOOD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{SNP_18173880}) + e_i$	3E-05	4E-05	1E-05	8E-02		2E+01	2E-11	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{SNP_15861145}) + e_i$	9E-06	1E-05	4E-03	2E-02		2E+01	2E-12	4E-01
FLOOD	Lfni	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM11}) + \beta_2(\text{MM330}) + \beta_3(\text{MM537}) + \beta_4(\text{SNP_16205156}) + e_i$	2E-05	8E-06	1E-02	3E-03		2E+01	8E-13	4E-01

Supp Table 3: Results of the differential host set put under four abiotic conditions such as standard, heat, drought and flood. For Heat, drought and flood, 2 sets were repeated under standard conditions to validate the inoculum and 2 sets were kept under the abiotic changes.

Standard							
Set 1 put under <i>standard condition</i>							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5					6	6	100
ECD6					6	6	100
ECD10				2	3	5	90
Brutor					6	6	100
C7	6					6	0
C10	6					6	0
CB151	3					3	0

Set 2 put under <i>standard condition</i>							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5					6	6	100
ECD6					4	4	100
ECD10				2	4	6	91.66667
Brutor				3	3	6	87.5
C7	4					4	0
C10	4		1			5	10
CB151	4					4	0

Set 3 put under <i>standard condition</i>							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP

ECD5					5	5	100
ECD6					2	2	100
ECD10					4	4	100
Brutor			3	2		5	60
C7	3					3	0
C10	4					4	0
CB151	4					4	0

Set 4 put under standard condition							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5					3	3	100
ECD6					5	5	100
ECD10					5	5	100
Brutor			1	5		6	70.83333
C7	3					3	0
C10	4	1				5	5
CB151	5					5	0

Drought							
Set 1 put under standard condition							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5		1	2	2	3	8	71.875
ECD6						0	NA
ECD10	1	1	1	2		5	45
Brutor			3	3		6	62.5
C7	5	1				6	4.166667
C10	2	3				5	15
CB151	2					2	0
Set 2 put under standard condition							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5				6		6	75
ECD6				3	2	5	85
ECD10			1	1		2	62.5
Brutor				6		6	75
C7	2					2	0
C10	5					5	0
CB151	1	1				2	12.5

Set 3 put under drought condition							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5			6			6	50
ECD6			6			6	50
ECD10			5	1		6	54.16667
Brutor			6			6	50
C7	6					6	0
C10	6					6	0
CB151	5					5	0

Set 4 put under drought condition							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5			5			5	50
ECD6			5			5	50
ECD10			4			4	50
Brutor			4			4	50
C7	6					6	0
C10	5	1				6	4.166667
CB151	4					4	0

Heat							
Set 1 put under standard condition							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5					6	6	100
ECD6					4	4	100
ECD10				2	4	6	91.667
Brutor				2	4	6	91.667
C7	5					5	0
C10	4	1	2			7	17.857
CB151	4					4	0

Set 2 put under standard condition							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5					6	6	100
ECD6					4	4	100
ECD10			1		5	6	91.667
Brutor			1	3		4	68.75
C7	5					5	0
C10	4	1				5	5
CB151	5					5	0

Set 3 put under <i>heat condition</i>							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5					6	6	100
ECD6				2	3	5	90
ECD10				5		5	75
Brutor				6		6	75
C7	5					5	0
C10	6					6	0
CB151	3					3	0

Set 4 put under <i>heat condition</i>							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5					6	6	100
ECD6					3	3	100
ECD10					5	5	100
Brutor			1		3	4	87.5
C7	5					5	0
C10	6	1				7	3.5714
CB151	2					2	0

Flood							
Set 1 put under <i>standard condition</i>							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5			5			5	50
ECD6	1		2			3	33.333
ECD10			4			4	50
Brutor			6			6	50
C7	6					6	0
C10	6					6	0
CB151	3					3	0

Set 2 put under <i>standard condition</i>							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5				2	3	5	90
ECD6			1	3		4	68.75
ECD10	1	2	2			5	30
Brutor	1		2	3		6	54.167
C7	2					2	0
C10	6					6	0
CB151	1					1	0

Set 3 put under flood condition							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5			3		3	6	75
ECD6			3		1	4	62.5
ECD10			3		2	5	70
Brutor			2	4		6	66.667
C7	5					5	0
C10	4					4	0
CB151	4	1				5	5

Set 4 put under flood condition							
Classes	0	1	2	2+	3	TOT Plants	IP
ECD5					6	6	100
ECD6				2	3	5	90
ECD10	1		2	1	2	6	62.5
Brutor		2	2	2		6	50
C7	5					5	0
C10	5					5	0
CB151	2					2	0

Supp. Table 4: Genetic variants located within the QTL^{epi} detected. Statistical analysis of TE and sequence variant effect compared to methylated markers on QTL^{epi} detection for each trait study. Conditions indicates the abiotic conditions under which traits were assessed. Trait indicates the phenotypic trait used for the analysis. Model I indicate the marker considered in the model (Marker, SNP, Indel, Footprint or the combination of the Marker and the sequence variant). Model II describes the model used in R regression (lm function) with the peak markers used and/or the sequence variants considered in the model. n: indicates the number of epi-lines with phenotypic data for the trait considered. p-value β_x were the p-values for each marker, TE or sequence variant used in the associated model. F-statistic Model II give the F-statistic of each model. p-value Model II indicates p-values for each model. Adjusted R2 gives the adjusted R2 for each model. Cells in bold indicate the epigenetic maker of the SNP variants that showed the greater impact at the peak of the QTL.

Conditions	Trait	n	Model I	Model II (lm)	p-value β_1	p-value β_2	p-value β_3	p-value β_4	p-value β_5	F-statistic Model II	p-value Model II	Adjusted R ²
StdHeat	GALA	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM160}) + \beta_2(\text{MM171}) + \beta_3(\text{MM718}) + \beta_4(\text{MM160} * \text{MM718}) + e_i$	2E-08	7E-04	1E-06	5E-07		13.44	4.68E-09	0.29
StdHeat	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM160}) + \beta_2(\text{MM171}) + \beta_3(\text{SNP_4896800}) + \beta_4(\text{MM160} * \text{SNP_4896800}) + e_i$	3E-01	1E-03	6E-01	5E-01		3.74	1.95E-03	0.12
StdHeat	GALA	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM160}) + \beta_2(\text{MM171}) + \beta_3(\text{TE_6357944}) + \beta_4(\text{MM160} * \text{TE_6357944}) + e_i$	5E-03	3E-03	9E-01	1E+00		5.42	5.58E-04	0.15
StdHeat	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM160}) + \beta_2(\text{MM171}) + \beta_3(\text{SNP_7980674}) + \beta_4(\text{MM160} * \text{SNP_7980674}) + e_i$	4E-05	1E-04	1E-01	3E-02		6.36	8.79E-06	0.21

StdHeat	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM160}) + \beta_2(\text{MM171}) + \beta_3(\text{MM718}) + \beta_4(\text{MM160} * \text{MM718}) + \beta_5(\text{SNP_4896800}) + e_i$	3E-08	7E-04	1E-06	7E-07	3E-01	9.06	4.18E-08	0.29
StdHeat	GALA	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM160}) + \beta_2(\text{MM171}) + \beta_3(\text{MM718}) + \beta_4(\text{MM160} * \text{MM718}) + \beta_5(\text{TE_6357944}) + e_i$	9E-07	2E-03	5E-05	2E-05	7E-01	9.20	3.56E-07	0.29
StdHeat	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM160}) + \beta_2(\text{MM171}) + \beta_3(\text{MM718}) + \beta_4(\text{MM160} * \text{MM718}) + \beta_5(\text{SNP_7980674}) + e_i$	5E-09	5E-05	1E-07	4E-07	3E-02	12.14	1.76E-10	0.36
StdDrought	GALA	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + e_i$	7E-08	3E-07	5E-04	6E-04		12.04	3.08E-08	0.27

StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{SNP_13092809}) + \beta_4(\text{MM679}) + e_i$	1E-07	4E-07	8E-04	7E-04	9.44	1.46E-07	0.26
StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{SNP_14288480}) + \beta_4(\text{MM679}) + e_i$	3E-06	7E-06	8E-01	1E-03	6.46	2.48E-05	0.18
StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{SNP_14509867}) + \beta_4(\text{MM679}) + e_i$	3E-06	7E-06	8E-01	1E-03	6.46	2.48E-05	0.18
StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{SNP_14518339}) + \beta_4(\text{MM679}) + e_i$	3E-06	7E-06	8E-01	1E-03	6.46	2.48E-05	0.18
StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{SNP_14530903}) + \beta_4(\text{MM679}) + e_i$	3E-06	7E-06	8E-01	1E-03	6.46	2.48E-05	0.18

StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{SNP_14545591}) + \beta_4(\text{MM679}) + e_i$	3E-06	8E-06	8E-01	1E-03	6.39	2.84E-05	1.18
StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{SNP_2834559}) + e_i$	9E-07	3E-06	4E-04	9E-02	7.06	8.55E-06	0.20
StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{SNP_2920544}) + e_i$	9E-07	3E-06	4E-04	7E-02	7.17	7.08E-06	0.20
StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{SNP_3318778}) + e_i$	8E-07	3E-06	4E-04	6E-02	7.23	6.28E-06	0.20
StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{SNP_4474111}) + e_i$	1E-06	4E-06	4E-04	9E-02	7.00	9.55E-06	0.20

StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{SNP_5115842}) + e_i$	1E-06	4E-06	6E-04	1E-01	6.87	1.22E-05	0.20
StdDrought	GALA	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{indel_7214677}) + e_i$	7E-07	2E-06	6E-04	1E-02	8.19	1.21E-06	0.23
StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{SNP_7344157}) + e_i$	8E-07	2E-06	7E-04	1E-02	7.90	2.00E-06	0.22
StdDrought	GALA	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{indel_7652616}) + e_i$	8E-07	2E-06	1E-03	3E-03	8.63	5.56E-07	0.24
StdDrought	GALA	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{indel_7750735}) + e_i$	9E-07	3E-06	9E-04	2E-02	7.71	2.77E-06	0.22

StdDrought	GALA	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{SNP_7944780}) + e_i$	4E-07	1E-06	6E-04	3E-02		7.72	2.80E-06	0.22
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_13092809}) + e_i$	1E-07	4E-07	8E-04	7E-04	NA	9.44	1.46E-07	0.26
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_14288480}) + e_i$	4E-08	2E-07	8E-05	2E-04	4E-02	8.92	5.45E-08	0.28
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_14509867}) + e_i$	4E-08	2E-07	8E-05	2E-04	4E-02	8.92	5.45E-08	0.28

StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_14518339}) + e_i$	4E-08	2E-07	8E-05	2E-04	4E-02	8.92	5.45E-08	0.28
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_14530903}) + e_i$	4E-08	2E-07	8E-05	2E-04	4E-02	8.92	5.45E-08	0.28
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_14545591}) + e_i$	4E-08	2E-07	8E-05	2E-04	4E-02	8.83	6.57E-08	0.28
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_15861145}) + e_i$	3E-08	1E-07	5E-05	1E-04	4E-02	9.16	3.47E-08	0.29

StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_16205156}) + e_i$	4E-08	2E-07	1E-04	2E-04	8E-02	8.67	9.22E-08	0.28
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_18112512}) + e_i$	1E-07	4E-07	5E-04	7E-04	4E-01	7.96	3.42E-07	0.26
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_18253358}) + e_i$	1E-07	4E-07	6E-04	8E-04	4E-01	7.93	3.64E-07	0.26
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_20306786}) + e_i$	1E-07	4E-07	1E-03	8E-04	1E+00	7.79	4.84E-07	0.25

StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_2834559}) + e_i$	1E-07	4E-07	7E-04	3E-03	9E-01	7.77	5.02E-07	0.25
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_2920544}) + e_i$	1E-07	4E-07	6E-04	5E-03	7E-01	7.74	5.40E-07	0.25
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_3318778}) + e_i$	9E-08	4E-07	6E-04	4E-03	7E-01	7.83	4.47E-07	0.25
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_4474111}) + e_i$	1E-07	4E-07	7E-04	4E-03	9E-01	7.71	5.73E-07	0.25

StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_5115842}) + e_i$	1E-07	5E-07	7E-04	3E-03	8E-01	7.64	6.70E-07	0.25
StdDrought	GALA	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{indel_7214677}) + e_i$	1E-07	4E-07	6E-04	2E-02	3E-01	8.01	3.22E-07	0.26
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP_7344157}) + e_i$	1E-07	4E-07	6E-04	1E-02	3E-01	7.91	3.86E-07	0.26
StdDrought	GALA	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{indel_7652616}) + e_i$	2E-07	5E-07	1E-03	6E-02	7E-01	7.96	3.48E-07	0.26

StdDrought	GALA	123	Marker + indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{indel}_7750735) + e_i$	1E-07	4E-07	8E-04	1E-02	4E-01	7.89	4.03E-07	0.26
StdDrought	GALA	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM373}) + \beta_2(\text{MM374}) + \beta_3(\text{MM432}) + \beta_4(\text{MM679}) + \beta_5(\text{SNP}_7944780) + e_i$	8E-08	4E-07	6E-04	1E-02	4E-01	7.81	4.92E-07	0.26
StdHeat	DI	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM2}) + e_i$	4E-04					13.20	4.12E-04	0.09
StdHeat	DI	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_6617937) + e_i$	2E-01					1.46	2.30E-01	0.00
StdHeat	DI	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_7241579) + e_i$	3E-02					2.41	9.43E-02	0.02
StdHeat	DI	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_9497509) + e_i$	7E-03					3.72	2.72E-02	0.04
StdHeat	DI	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_9883998) + e_i$	9E-03					3.52	3.27E-02	0.04
StdHeat	DI	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM2}) + \beta_2(\text{TE}_6617937) + e_i$	2E-02	4E-01				3.47	3.50E-02	0.05

StdHeat	DI	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM2}) + \beta_2(\text{SNP_7241579}) + e_i$	5E-03	5E-01				4.49	5.09E-03	0.08
StdHeat	DI	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM2}) + \beta_2(\text{SNP_9497509}) + e_i$	9E-03	2E-01				4.95	2.85E-03	0.09
StdHeat	DI	123	Marker + SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM2}) + \beta_2(\text{SNP_9883998}) + e_i$	2E-02	1E-01				4.44	5.46E-03	0.08
StdDrought	Lfni	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + e_i$	3E-07					29.49	2.95E-07	0.19
StdDrought	Lfni	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_16836944}) + e_i$	2E-02					5.87	1.72E-02	0.05
StdDrought	Lfni	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel_17863273}) + e_i$	3E-03					5.12	7.34E-03	0.06
StdDrought	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18002233}) + e_i$	2E-03					5.32	6.13E-03	0.07
StdDrought	Lfni	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_18173880}) + e_i$	1E-03					5.59	4.80E-03	0.04
StdDrought	Lfni	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{TE_16836944}) + e_i$	2E-05	6E-01				13.64	5.85E-06	0.20

StdDrought	Lfni	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{indel_17863273}) + e_i$	4E-05	7E-01				9.95	6.72E-06	0.18
StdDrought	Lfni	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{SNP_18002233}) + e_i$	6E-05	6E-01				9.75	8.54E-06	0.18
StdDrought	Lfni	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM128}) + \beta_2(\text{SNP_18173880}) + e_i$	8E-05	5E-01				0.98	8.33E-06	0.18
StdDrought	Lfi	123	Marker	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + e_i$	4E-04					13.37	3.80E-04	0.09
StdDrought	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_9497509}) + e_i$	1E-02					3.60	3.02E-02	0.04
StdDrought	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_9883998}) + e_i$	5E-03					4.21	1.72E-02	0.05
StdDrought	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_12177658}) + e_i$	2E-01					1.98	1.21E-01	0.08
StdDrought	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE_12617099}) + e_i$	6E-01					0.90	4.45E-01	0.00
StdDrought	Lfi	123	Footprint	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{Footprint_12620247}) + e_i$	2E-01					2.08	1.52E-01	0.01
StdDrought	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP_13033405}) + e_i$	5E-01					0.20	8.18E-01	-0.01

StdDrought	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{13908828}) + e_i$	7E-01					0.09	9.11E-01	-0.02
StdDrought	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{13967107}) + e_i$	8E-01					0.21	8.08E-01	-0.01
StdDrought	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14023610}) + e_i$	8E-01					0.22	8.04E-01	-0.01
StdDrought	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{14590272}) + e_i$	3E-02					2.94	5.69E-02	0.03
StdDrought	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{15509104}) + e_i$	6E-01					0.34	7.13E-01	-0.01
StdDrought	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{15935454}) + e_i$	7E-01					0.13	8.79E-01	-0.01
StdDrought	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{15935454}) + e_i$	7E-01					0.13	8.79E-01	-0.01
StdDrought	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{15972511}) + e_i$	1E+00					0.00	9.99E-01	-0.02
StdDrought	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_{16836944}) + e_i$	3E-01					0.91	3.41E-01	0.00
StdDrought	Lfi	123	indel	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{indel}_{17863273}) + e_i$	6E-01					0.29	7.49E-01	-0.01

StdDrought	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{18002233}) + e_i$	5E-01				0.99	3.76E-01	0.00
StdDrought	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{18173880}) + e_i$	6E-01				0.21	8.14E-01	-0.01
StdDrought	Lfi	123	TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{TE}_{20150892}) + e_i$	3E-01				1.28	2.61E-01	0.00
StdDrought	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{20362809}) + e_i$	4E-01				0.39	6.80E-01	-0.01
StdDrought	Lfi	123	SNP	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{SNP}_{21675141}) + e_i$	9E-01				0.30	7.45E-01	-0.01
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP}_{9497509}) + e_i$	2E-02	4E-01			4.50	5.05E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP}_{9883998}) + e_i$	2E-02	3E-01			4.77	3.58E-03	0.09
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{TE}_{12177658}) + e_i$	1E-02	8E-01			3.15	1.77E-02	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{TE}_{12617099}) + e_i$	3E-03	5E-01			3.03	2.11E-02	0.08

StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{Footprint_12620247}) + e_i$	7E-04	2E-01				7.21	1.10E-03	0.09
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_13033405}) + e_i$	5E-04	3E-01				4.46	5.27E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{indel_13908828}) + e_i$	4E-04	3E-01				4.49	5.09E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_13967107}) + e_i$	4E-04	3E-01				4.54	4.81E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_14023610}) + e_i$	4E-04	3E-01				4.63	4.25E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_14590272}) + e_i$	1E-02	5E-01				4.33	6.26E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_15509104}) + e_i$	7E-04	5E-01				4.34	6.19E-03	0.08

StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{indel_15935454}) + e_i$	5E-04	5E-01				4.37	5.93E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{indel_15972511}) + e_i$	5E-04	3E-01				4.35	6.09E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{TE_16836944}) + e_i$	4E-03	7E-01				4.80	1.02E-02	0.07
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{indel_17863273}) + e_i$	7E-04	7E-01				4.29	6.55E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_18002233}) + e_i$	9E-04	8E-01				4.55	4.68E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_18173880}) + e_i$	6E-04	6E-01				4.31	6.36E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{TE_20150892}) + e_i$	5E-03	6E-01				4.86	9.66E-03	0.07

StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_20362809}) + e_i$	8E-04	9E-01				4.27	6.67E-03	0.08
StdDrought	Lfi	123	Marker + TE	$y_i = \beta_0 + \beta_1(\text{MM10}) + \beta_2(\text{SNP_21675141}) + e_i$	4E-04	7E-01				4.57	4.61E-03	0.08

2. Annexes Chapitre IV:

Identification of miRNAs involved in the susceptible and partially resistance responses to clubroot in *Arabidopsis*

Mathilde Petitpas¹, Jocelyne Lemoine¹, Christine Lariagon¹, Maria J. Manzanares-Dauleux¹, Mélanie Jubault¹

¹ IGEPP, Institut Agro Rennes-Angers – INRAE – Université de Rennes, F-35000 Rennes, France

Supp. Table 1: Functional enrichment analysis in **molecular function** of genes down- and up-regulated in Col-0 and Bur-0. Significant results are in green (p_adjust<0.05).

term_name	term_id	Col-0_Down	Col-0_Up	Bur-0_Down	Bur-0_Up
catalytic activity	GO:0003824	1E-10	3E-10	2E-01	5E-18
molecular_function	GO:0003674	4E-09	1E-27	1E+00	6E-18
oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, oxygen as acceptor	GO:0016682				
oxidoreductase activity	GO:0016491	8E-09	1E+00	1E+00	1E+00
		2E-08	4E-10	1E+00	1E-04

hydroquinone:oxygen oxidoreductase activity	GO:0052716	4E-08	1E+00	1E+00	1E+00
oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors	GO:0016679	9E-08	1E+00	1E+00	1E+00
hexosyltransferase activity	GO:0016758	3E-07	1E+00	1E+00	1E+00
lactoperoxidase activity	GO:0140825	1E-06	2E-01	1E+00	5E-05
heme binding	GO:0020037	1E-06	2E-05	1E+00	2E-07
hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	GO:0016798	4E-06	1E+00	2E-01	2E-01
DNA-binding transcription factor activity	GO:0003700	2E-05	1E+00	1E+00	1E+00
hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	GO:0004553	2E-05	1E+00	2E-01	3E-01
tetrapyrrole binding	GO:0046906	2E-05	2E-14	1E+00	5E-08
transmembrane transporter activity	GO:0022857	3E-05	1E+00	6E-06	1E+00
glycosyltransferase activity	GO:0016757	5E-05	1E+00	1E+00	1E+00
transporter activity	GO:0005215	6E-05	1E+00	4E-06	1E+00
peroxidase activity	GO:0004601	6E-05	5E-02	1E+00	2E-04
oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	GO:0016684	1E-04	2E-02	1E+00	3E-04
transcription regulator activity	GO:0140110	4E-04	1E+00	1E+00	1E+00
sequence-specific DNA binding	GO:0043565	6E-04	1E+00	1E+00	1E+00
glucosyltransferase activity	GO:0046527	7E-04	1E+00	1E+00	1E+00
antioxidant activity	GO:0016209	1E-03	3E-02	1E+00	1E-03
dioxygenase activity	GO:0051213	1E-03	1E+00	1E+00	1E+00
UDP-glycosyltransferase activity	GO:0008194	2E-03	1E+00	1E+00	1E+00
glycerol-3-phosphate 2-O-acyltransferase activity	GO:0090447	3E-03	1E+00	1E+00	1E+00
oxidoreductase activity, acting on paired donors, with incorporation or reduction of molecular oxygen	GO:0016705	3E-03	3E-02	1E+00	2E-02
metal ion binding	GO:0046872	6E-03	6E-09	1E+00	2E-09

cation binding	GO:0043169	8E-03	2E-09	1E+00	3E-09
sequence-specific double-stranded DNA binding	GO:1990837				
O-acyltransferase activity	GO:0008374	9E-03	4E-01	1E+00	1E+00
O-acetyltransferase activity	GO:0016413	9E-03	1E+00	1E+00	1E+00
transcription regulatory region nucleic acid binding	GO:0001067	9E-03	4E-01	1E+00	1E+00
transcription cis-regulatory region binding	GO:0000976	9E-03	4E-01	1E+00	1E+00
xyloglucan:xyloglucosyl transferase activity	GO:0016762	1E-02	1E+00	1E-01	1E+00
acyltransferase activity, transferring groups other than amino-acyl groups	GO:0016747	1E-02	1E+00	1E+00	1E+00
nitrate transmembrane transporter activity	GO:0015112	2E-02	1E+00	8E-01	1E+00
inorganic anion transmembrane transporter activity	GO:0015103	2E-02	1E+00	1E-03	1E+00
polysaccharide binding	GO:0030247	2E-02	1E+00	1E+00	1E+00
amide transmembrane transporter activity	GO:0042887	3E-02	1E+00	1E+00	1E+00
monooxygenase activity	GO:0004497	3E-02	8E-03	1E+00	2E-02
structural constituent of cell wall	GO:0005199	3E-02	1E+00	1E+00	1E+00
sulfotransferase activity	GO:0008146	4E-02	1E+00	1E+00	1E+00
xylan O-acetyltransferase activity	GO:1990538	5E-02	1E+00	1E+00	1E+00
manganese ion binding	GO:0030145	7E-02	1E+00	1E+00	4E-02
ion binding	GO:0043167	1E-01	1E-14	1E+00	2E-18
hydrolase activity	GO:0016787	1E-01	1E+00	1E+00	1E-04
carbohydrate binding	GO:0030246	2E-01	1E+00	1E+00	1E-03
inorganic molecular entity transmembrane transporter activity	GO:0015318	5E-01	1E+00	6E-06	1E+00

salt transmembrane transporter activity	GO:1901702	7E-01	1E+00	2E-02	1E+00
iron ion binding	GO:0005506	8E-01	5E-04	1E+00	3E-03
binding	GO:0005488	1E+00	1E-27	1E+00	2E-12
unfolded protein binding	GO:0051082	1E+00	1E+00	1E+00	3E-08
anion binding	GO:0043168	1E+00	9E-04	1E+00	1E-07
small molecule binding	GO:0036094	1E+00	3E-04	1E+00	2E-07
adenyl ribonucleotide binding	GO:0032559	1E+00	4E-02	1E+00	4E-07
carbohydrate derivative binding	GO:0097367	1E+00	1E-01	1E+00	7E-07
adenyl nucleotide binding	GO:0030554	1E+00	5E-02	1E+00	8E-07
organic cyclic compound binding	GO:0097159	1E+00	2E-21	1E+00	1E-06
ATP binding	GO:0005524	1E+00	4E-02	1E+00	1E-06
heterocyclic compound binding	GO:1901363	1E+00	1E-20	1E+00	2E-06
ATP-dependent protein folding chaperone	GO:0140662	1E+00	1E+00	1E+00	2E-06
transition metal ion binding	GO:0046914	1E+00	6E-04	1E+00	4E-06
ATP-dependent activity	GO:0140657	1E+00	4E-02	1E+00	4E-06
nucleotide binding	GO:0000166	1E+00	1E-01	1E+00	1E-05
nucleoside phosphate binding	GO:1901265	1E+00	1E-01	1E+00	1E-05
purine ribonucleotide binding	GO:0032555	1E+00	8E-02	1E+00	1E-05
ribonucleotide binding	GO:0032553	1E+00	8E-02	1E+00	2E-05
purine nucleotide binding	GO:0017076	1E+00	8E-02	1E+00	2E-05
protein folding chaperone	GO:0044183	1E+00	1E+00	1E+00	2E-05
purine ribonucleoside triphosphate binding	GO:0035639	1E+00	8E-02	1E+00	5E-05
ATP hydrolysis activity	GO:0016887	1E+00	1E+00	1E+00	5E-04
heat shock protein binding	GO:0031072	1E+00	1E+00	1E+00	2E-02
glutathione binding	GO:0043295	1E+00	1E+00	1E+00	4E-02
protein binding	GO:0005515	1E+00	4E-10	1E+00	1E-01
vitamin binding	GO:0019842	1E+00	2E-02	1E+00	3E-01
protein domain specific binding	GO:0019904	1E+00	1E-31	1E+00	9E-01

channel activity	GO:0015267	1E+00	1E+00	5E-02	1E+00
passive transmembrane transporter activity	GO:0022803	1E+00	1E+00	5E-02	1E+00
chlorophyll binding	GO:0016168	1E+00	3E-16	1E+00	1E+00
nucleic acid binding	GO:0003676	1E+00	1E-10	1E+00	1E+00
mRNA binding	GO:0003729	1E+00	5E-10	1E+00	1E+00
RNA binding	GO:0003723	1E+00	9E-09	1E+00	1E+00
poly(U) RNA binding	GO:0008266	1E+00	5E-08	1E+00	1E+00
poly-pyrimidine tract binding	GO:0008187	1E+00	3E-07	1E+00	1E+00
rRNA binding	GO:0019843	1E+00	7E-07	1E+00	1E+00
single-stranded RNA binding	GO:0003727	1E+00	9E-06	1E+00	1E+00
2 iron, 2 sulfur cluster binding	GO:0051537	1E+00	3E-04	1E+00	1E+00
isomerase activity	GO:0016853	1E+00	3E-03	1E+00	1E+00
ligase activity, forming nitrogen-metal bonds, forming coordination complexes	GO:0051003	1E+00	4E-03	1E+00	1E+00
magnesium chelatase activity	GO:0016851	1E+00	4E-03	1E+00	1E+00
ligase activity, forming nitrogen-metal bonds	GO:0051002	1E+00	4E-03	1E+00	1E+00
identical protein binding	GO:0042802	1E+00	1E-02	1E+00	1E+00
disordered domain specific binding	GO:0097718	1E+00	2E-02	1E+00	1E+00
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP+) (phosphorylating) activity	GO:0047100	1E+00	2E-02	1E+00	1E+00
salicylic acid binding	GO:1901149	1E+00	2E-02	1E+00	1E+00
iron-sulfur cluster binding	GO:0051536	1E+00	3E-02	1E+00	1E+00
metal cluster binding	GO:0051540	1E+00	3E-02	1E+00	1E+00

Supp. Table 2: Functional enrichment analysis in **biological process** of genes down- and up-regulated in Col-0 and Bur-0. Significant results are in green (p_{adjust}<0.05).

term_name	term_id	Col-0_Down	Col-0_Up	Bur-0_Down	Bur-0_Up
cell wall organization or biogenesis	GO:0071554	1.59E-30	1	4.5225E-06	1
phenylpropanoid metabolic process	GO:0009698	2.04E-24	1	1	1
plant-type secondary cell wall biogenesis	GO:0009834	3.04E-22	1	6.1823E-06	1
phenylpropanoid biosynthetic process	GO:0009699	3.20E-21	1	1	1
cell wall organization	GO:0071555	7.50E-21	1	0.07745913	1
cell wall biogenesis	GO:0042546	2.43E-20	1	2.86E-04	1
plant-type cell wall organization or biogenesis	GO:0071669	3.89E-20	1	1.37E-02	1
external encapsulating structure organization	GO:0045229	9.48E-20	1	0.19558956	1
secondary metabolite biosynthetic process	GO:0044550	2.84E-18	1	1	1
secondary metabolic process	GO:0019748	3.45E-18	1	1.19E-02	4.11E-04
plant-type cell wall biogenesis	GO:0009832	7.32E-18	1	5.69E-03	1
polysaccharide metabolic process	GO:0005976	4.39E-14	1	8.11E-03	1
hemicellulose metabolic process	GO:0010410	2.12E-13	1	6.67E-04	1

cell wall polysaccharide metabolic process	GO:0010383	2.21E-12	1	8.90E-04	1
carbohydrate metabolic process	GO:0005975	5.04E-12	0.99925374	8.97E-03	2.25E-02
cell wall macromolecule metabolic process	GO:0044036	7.60E-11	1	4.48E-03	1
xylan metabolic process	GO:0045491	2.84E-10	1	0.13398606	1
regulation of secondary cell wall biogenesis	GO:2000652	4.74E-09	1	1	1
response to stimulus	GO:0050896	7.23E-09	2.21E-22	1	7.32E-26
xylan biosynthetic process	GO:0045492	4.69E-08	1	1	1
regulation of cell wall organization or biogenesis	GO:1903338	1.05E-07	1	1	1
phenylpropanoid catabolic process	GO:0046271	1.85E-07	1	1	1
lignin catabolic process	GO:0046274	1.85E-07	1	1	1
response to chemical	GO:0042221	6.37E-07	9.21E-12	1	9.61E-19
suberin biosynthetic process	GO:0010345	1.3462E-06	1	1	1
lignin metabolic process	GO:0009808	2.7846E-06	1	1	1
regulation of cellular component biogenesis	GO:0044087	4.189E-05	1	1	1
cell wall polysaccharide biosynthetic process	GO:0070592	4.8823E-05	1	1	1

cellular oxidant detoxification	GO:0098869	9.49E-05	1.54E-02	1	9.52E-04
transmembrane transport	GO:0055085	9.5293E-05	1	1.3772E-05	1
polysaccharide biosynthetic process	GO:0000271	1.06E-04	1	1	1
xylem development	GO:0010089	1.22E-04	1	1	1
hydrogen peroxide catabolic process	GO:0042744	1.76E-04	1.74E-02	1	1.59E-03
lipid metabolic process	GO:0006629	2.02E-04	1	1	1
coumarin biosynthetic process	GO:0009805	4.15E-04	1	1	1
organic substance catabolic process	GO:1901575	4.41E-04	1	1	2.11E-02
response to osmotic stress	GO:0006970	4.55E-04	1	1	0.07632851
catabolic process	GO:0009056	5.02E-04	1	1	1.65E-03
cellular detoxification	GO:1990748	6.12E-04	5.84E-03	1	8.4223E-05
cellular response to toxic substance	GO:0097237	6.73E-04	6.35E-03	1	9.0408E-05
xylem vessel member cell differentiation	GO:0048759	1.06E-03	1	1	1
organic cyclic compound biosynthetic process	GO:1901362	1.15E-03	3.96E-04	1	1
glucan metabolic process	GO:0044042	1.16E-03	1	1	1
positive regulation of cell wall organization or biogenesis	GO:1903340	1.41E-03	1	1	1

positive regulation of secondary cell wall biogenesis	GO:1901348	1.41E-03	1	1	1
tracheary element differentiation	GO:1905177	1.43E-03	1	1	1
response to organic substance	GO:0010033	0.00175672	0.00018482	1	3.67E-08
carbohydrate biosynthetic process	GO:0016051	2.13E-03	0.06382891	1	1
nitrate import	GO:1902025	2.13E-03	1	1	1
detoxification	GO:0098754	2.28E-03	0.00152701	1	5.17E-08
cellular process	GO:0009987	2.32E-03	9.49E-23	1	3.21E-04
inorganic anion transport	GO:0015698	2.54E-03	1	5.78E-04	1
hydrogen peroxide metabolic process	GO:0042743	3.59E-03	2.80E-03	1	1.04E-02
aromatic compound biosynthetic process	GO:0019438	3.62E-03	8.89E-04	1	1
response to hormone	GO:0009725	3.97E-03	1.29E-02	1	0.08449604
polysaccharide catabolic process	GO:0000272	4.51E-03	1	1	1
cellular catabolic process	GO:0044248	5.49E-03	1	1	9.45E-04
response to nutrient levels	GO:0031667	5.99E-03	1	1	1
response to oxygen-containing compound	GO:1901700	6.79E-03	9.81E-07	1	3.6132E-06
plant-type cell wall organization	GO:0009664	7.51E-03	1	1	1
response to wounding	GO:0009611	7.70E-03	1	1	0.84044076

coumarin metabolic process	GO:0009804	7.92E-03	1	1	1
response to endogenous stimulus	GO:0009719	8.16E-03	1.53E-02	1	0.06246552
response to extracellular stimulus	GO:0009991	9.66E-03	1	1	1
cell wall modification	GO:0042545	9.86E-03	1	1	1
response to toxic substance	GO:0009636	1.10E-02	9.47E-04	1	7.01E-07
response to abscisic acid	GO:0009737	1.18E-02	1	1	0.45437727
response to starvation	GO:0042594	1.19E-02	1	1	1
cellulose metabolic process	GO:0030243	1.48E-02	1	1	1
response to cold	GO:0009409	0.01688918	2.98E-07	1	1
response to alcohol	GO:0097305	1.71E-02	1	1	0.21315935
cutin-based cuticle development	GO:0160062	2.01E-02	1	1	1
cutin biosynthetic process	GO:0010143	2.01E-02	1	1	1
cellular response to nutrient levels	GO:0031669	2.05E-02	1	1	1
sulfation	GO:0051923	2.34E-02	1	1	1
amide transport	GO:0042886	2.61E-02	1	4.52E-02	1
plant organ development	GO:0099402	2.74E-02	1	1	1
biological_process	GO:0008150	2.94E-02	2.75E-13	1	0.00012547
benzene-containing compound metabolic process	GO:0042537	3.40E-02	1	1	1

cellular response to extracellular stimulus	GO:0031668	3.56E-02	1	1	1
response to lipid	GO:0033993	3.57E-02	3.41E-02	1	1
cell communication	GO:0007154	3.61E-02	1	1	2.97E-02
glucuronoxylan metabolic process	GO:0010413	4.52E-02	1	1	1
glucuronoxylan biosynthetic process	GO:0010417	4.52E-02	1	1	1
cellular response to stimulus	GO:0051716	4.71E-02	0.12164921	1	5.69E-11
cellular response to chemical stimulus	GO:0070887	4.78E-02	3.9396E-06	1	3.79E-12
reactive oxygen species metabolic process	GO:0072593	0.07301787	3.51E-07	1	0.14613846
response to salt	GO:1902074	0.12520946	0.08178332	1	5.11E-03
response to stress	GO:0006950	0.13312093	8.88E-12	1	1.11E-23
response to external stimulus	GO:0009605	0.17495449	1.19E-02	1	8.35E-14
response to inorganic substance	GO:0010035	0.21601612	1.85E-02	1	1.65E-07
transport	GO:0006810	0.54811591	1	2.57E-02	1
developmental process	GO:0032502	0.67324891	1.13E-03	1	1
regulation of RNA metabolic process	GO:0051252	0.69201497	4.07E-02	1	1
establishment of localization	GO:0051234	0.74083308	1	3.78E-02	1

biological process involved in interspecies interaction between organisms	GO:0044419	1	6.90E-03	1	9.73E-16
response to other organism	GO:0051707	1	3.34E-02	1	1.70E-15
response to external biotic stimulus	GO:0043207	1	3.34E-02	1	1.70E-15
response to biotic stimulus	GO:0009607	1	2.26E-02	1	4.38E-15
response to bacterium	GO:0009617	1	1	1	2.99E-10
response to abiotic stimulus	GO:0009628	1	5.48E-30	1	1.12E-09
protein folding	GO:0006457	1	1	1	4.13E-09
defense response to other organism	GO:0098542	1	1	1	1.95E-08
defense response	GO:0006952	1	1	1	6.83E-08
response to heat	GO:0009408	1	1	1	6.96E-08
cellular response to hypoxia	GO:0071456	1	3.80E-03	1	3.88E-07
response to hypoxia	GO:0001666	1	2.80E-03	1	4.12E-07
cellular response to oxygen levels	GO:0071453	1	4.41E-03	1	4.49E-07
cellular response to decreased oxygen levels	GO:0036294	1	4.41E-03	1	4.49E-07
response to decreased oxygen levels	GO:0036293	1	3.70E-03	1	5.40E-07
response to oxygen levels	GO:0070482	1	3.97E-03	1	5.77E-07
response to oxidative stress	GO:0006979	1	5.10E-04	1	7.47E-07

cellular response to stress	GO:0033554	1	0.28260858	1	1.0182E-06
systemic acquired resistance	GO:0009627	1	1	1	6.4194E-06
defense response to bacterium	GO:0042742	1	1	1	8.4344E-06
response to temperature stimulus	GO:0009266	1	2.64E-09	1	9.9186E-06
response to salicylic acid	GO:0009751	1	1	1	2.874E-05
chaperone-mediated protein folding	GO:0061077	1	1	1	5.93E-04
response to organic cyclic compound	GO:0014070	1	1	1	1.12E-03
response to hydrogen peroxide	GO:0042542	1	1	1	1.22E-03
response to fungus	GO:0009620	1	1	1	1.37E-03
response to oomycetes	GO:0002239	1	1	1	3.23E-03
cellular response to organic substance	GO:0071310	1	1	1	3.71E-03
response to reactive oxygen species	GO:0000302	1	3.90E-01	1	4.38E-03
protein refolding	GO:0042026	1	1	1	1.04E-02
chaperone-mediated protein complex assembly	GO:0051131	1	1	1	1.68E-02
signal transduction	GO:0007165	1	1	1	2.02E-02
toxin metabolic process	GO:0009404	1	1	1	2.20E-02

defense response to fungus signaling	GO:0050832	1	1	1	3.24E-02
regulation of biological process	GO:0023052	1	1	1	3.57E-02
fat-soluble vitamin biosynthetic process	GO:0050789	1	2.05E-03	1	0.18330807
fat-soluble vitamin metabolic process	GO:0042362	1	2.5104E-05	1	0.18337682
biological regulation	GO:0006775	1	2.5104E-05	1	0.18337682
regulation of cellular process	GO:0065007	1	4.01E-03	1	0.25135199
vitamin E biosynthetic process	GO:0050794	1	3.36E-03	1	0.39587708
vitamin E metabolic process	GO:0010189	1	1.92E-03	1	0.51526827
metabolic process	GO:0042360	1	1.92E-03	1	0.51526827
nitrate assimilation	GO:0008152	1	5.89E-16	1	0.73548635
nitrate metabolic process	GO:0042128	1	1	8.90E-04	1
reactive nitrogen species metabolic process	GO:0042126	1	1	8.90E-04	1
nitrogen cycle metabolic process	GO:2001057	1	1	2.13E-03	1
inorganic ion transmembrane transport	GO:0071941	1	1	2.43E-03	1
monoatomic ion transport	GO:0098660	1	1	9.55E-03	1
transition metal ion transport	GO:0006811	1	1	3.68E-02	1
	GO:0000041	1	1	3.96E-02	1

one-carbon compound transport	GO:0019755	1	1	4.10E-02	1
photosynthesis	GO:0015979	1	1.49E-89	1	1
photosynthesis, light reaction	GO:0019684	1	4.36E-51	1	1
generation of precursor metabolites and energy	GO:0006091	1	3.27E-36	1	1
response to radiation	GO:0009314	1	5.10E-27	1	1
response to light stimulus	GO:0009416	1	7.89E-27	1	1
cellular metabolic process	GO:0044237	1	7.20E-23	1	1
plastid organization	GO:0009657	1	1.37E-21	1	1
photosynthesis, light harvesting	GO:0009765	1	1.58E-19	1	1
photosynthetic electron transport chain	GO:0009767	1	1.49E-18	1	1
chloroplast organization	GO:0009658	1	1.53E-17	1	1
response to light intensity	GO:0009642	1	1.65E-16	1	1
pigment biosynthetic process	GO:0046148	1	1.10E-15	1	1
pigment metabolic process	GO:0042440	1	1.33E-15	1	1
photosynthesis, light harvesting in photosystem I	GO:0009768	1	1.19E-13	1	1
regulation of photosynthesis	GO:0010109	1	1.33E-13	1	1
response to high light intensity	GO:0009644	1	3.38E-12	1	1
photosystem II assembly	GO:0010207	1	3.68E-12	1	1

chlorophyll metabolic process	GO:0015994	1	1.61E-11	1	1
tetrapyrrole metabolic process	GO:0033013	1	6.24E-11	1	1
chlorophyll biosynthetic process	GO:0015995	1	8.87E-11	1	1
tetrapyrrole biosynthetic process	GO:0033014	1	1.82E-10	1	1
regulation of photosynthesis, light reaction	GO:0042548	1	4.02E-10	1	1
porphyrin-containing compound metabolic process	GO:0006778	1	4.12E-10	1	1
porphyrin-containing compound biosynthetic process	GO:0006779	1	7.95E-10	1	1
regulation of generation of precursor metabolites and energy	GO:0043467	1	1.28E-09	1	1
electron transport chain	GO:0022900	1	3.34E-08	1	1
reductive pentose-phosphate cycle	GO:0019253	1	4.37E-08	1	1
photosynthesis, dark reaction	GO:0019685	1	4.37E-08	1	1
regulation of metabolic process	GO:0019222	1	1.48E-07	1	1
plastid transcription	GO:0042793	1	2.17E-07	1	1
biosynthetic process	GO:0009058	1	3.53E-07	1	1

regulation of cellular metabolic process	GO:0031323	1	6.47E-07	1	1
post-embryonic development	GO:0009791	1	1.2321E-06	1	1
chloroplast rRNA processing	GO:1901259	1	2.0329E-06	1	1
carbon fixation	GO:0015977	1	2.0932E-06	1	1
organic substance biosynthetic process	GO:1901576	1	1.1658E-05	1	1
anthocyanin-containing compound biosynthetic process	GO:0009718	1	1.5896E-05	1	1
anthocyanin-containing compound metabolic process	GO:0046283	1	3.0289E-05	1	1
photosynthetic electron transport in photosystem I	GO:0009773	1	6.2344E-05	1	1
organic substance metabolic process	GO:0071704	1	8.1396E-05	1	1
protein-containing complex organization	GO:0043933	1	1.27E-04	1	1
photosystem II repair	GO:0010206	1	1.32E-04	1	1
glucose metabolic process	GO:0006006	1	1.58E-04	1	1
thylakoid membrane organization	GO:0010027	1	1.66E-04	1	1

regulation of reactive oxygen species metabolic process	GO:2000377	1	2.41E-04	1	1
negative regulation of photosynthesis	GO:1905156	1	2.55E-04	1	1
protein-containing complex assembly	GO:0065003	1	2.94E-04	1	1
heterocycle biosynthetic process	GO:0018130	1	3.08E-04	1	1
protein import	GO:0017038	1	3.96E-04	1	1
granum assembly	GO:0090391	1	3.96E-04	1	1
ribulose biphosphate carboxylase complex assembly	GO:0110102	1	4.66E-04	1	1
cellular component organization	GO:0016043	1	6.28E-04	1	1
plastid translation	GO:0032544	1	6.94E-04	1	1
organic cyclic compound metabolic process	GO:1901360	1	7.54E-04	1	1
cellular component assembly	GO:0022607	1	9.59E-04	1	1
plastid membrane organization	GO:0009668	1	9.67E-04	1	1
negative regulation of photosynthesis, light reaction	GO:0043155	1	9.93E-04	1	1
photoinhibition	GO:0010205	1	9.93E-04	1	1
anatomical structure development	GO:0048856	1	1.10E-03	1	1

regulation of biosynthetic process	GO:0009889	1	1.13E-03	1	1
small molecule metabolic process	GO:0044281	1	1.29E-03	1	1
protein import into chloroplast thylakoid membrane	GO:0045038	1	1.84E-03	1	1
cellular component organization or biogenesis	GO:0071840	1	2.48E-03	1	1
flavonoid metabolic process	GO:0009812	1	2.49E-03	1	1
multicellular organism development	GO:0007275	1	2.89E-03	1	1
reproductive structure development	GO:0048608	1	3.10E-03	1	1
cellular biosynthetic process	GO:0044249	1	3.11E-03	1	1
small molecule biosynthetic process	GO:0044283	1	3.18E-03	1	1
response to low light intensity stimulus	GO:0009645	1	3.18E-03	1	1
reproductive system development	GO:0061458	1	3.38E-03	1	1
photosystem II stabilization	GO:0042549	1	3.47E-03	1	1
cellular aromatic compound metabolic process	GO:0006725	1	3.78E-03	1	1
flavonoid biosynthetic process	GO:0009813	1	4.77E-03	1	1
regulation of gene expression	GO:0010468	1	5.20E-03	1	1

heterocycle metabolic process	GO:0046483	1	5.21E-03	1	1
cellular component biogenesis	GO:0044085	1	5.23E-03	1	1
energy quenching nonphotochemical quenching	GO:1990066	1	5.86E-03	1	1
regulation of primary metabolic process	GO:0080090	1	9.89E-03	1	1
multicellular organismal process	GO:0032501	1	1.02E-02	1	1
response to red or far red light	GO:0009639	1	1.10E-02	1	1
photosynthetic acclimation	GO:0009643	1	1.47E-02	1	1
protein repair	GO:0030091	1	1.85E-02	1	1
regulation of cellular biosynthetic process	GO:0031326	1	2.04E-02	1	1
de-etiolation	GO:0009704	1	2.19E-02	1	1
photosystem I assembly	GO:0048564	1	2.19E-02	1	1
regulation of reactive oxygen species biosynthetic process	GO:1903426	1	2.19E-02	1	1
cellular response to light intensity	GO:0071484	1	2.61E-02	1	1
response to blue light	GO:0009637	1	2.73E-02	1	1
regulation of macromolecule metabolic process	GO:0060255	1	2.78E-02	1	1
response to sucrose	GO:0009744	1	2.89E-02	1	1

regulation of nitrogen compound metabolic process	GO:0051171	1	2.91E-02	1	1
organelle organization	GO:0006996	1	2.99E-02	1	1
cellular response to environmental stimulus	GO:0104004	1	3.06E-02	1	1
cellular response to abiotic stimulus	GO:0071214	1	3.06E-02	1	1
gluconeogenesis	GO:0006094	1	3.30E-02	1	1
response to disaccharide	GO:0034285	1	3.75E-02	1	1
fructose 1,6-bisphosphate metabolic process	GO:0030388	1	4.33E-02	1	1
pattern specification process	GO:0007389	1	4.62E-02	1	1
protein heterotrimerization	GO:0070208	1	4.95E-02	1	1
thalianol metabolic process	GO:0080003	1	4.95E-02	1	1

Supp. Table 3: Functional enrichment analysis in **cellular component** of genes down- and up-regulated in Col-0 and Bur-0. Significant results are in green (p_adjust<0.05).

term_name	term_id	Col-0_Down	Col-0_Up	Bur-0_Down	Bur-0_Up
extracellular region	GO:0005576	1.53E-22	0.000910698	3.33452E-05	1.14077E-06
cell periphery membrane	GO:0071944	5.97E-19	0.064587103	6.16E-11	4.38E-10
	GO:0016020	2.25E-16	2.16E-17	1.31E-04	0.070835782
cellular anatomical entity	GO:0110165	5.43E-15	3.03E-56	3.48E-02	2.71E-14
cellular_component	GO:0005575	6.62E-15	5.60E-50	1.19E-02	2.64E-12
apoplast	GO:0048046	6.74E-15	2.61E-07	0.333828584	1.51402E-05

plasma membrane	GO:0005886	1.22E-12	1	1.19E-07	2.20168E-06
secondary cell wall	GO:0009531	3.89956E-06	1	1	1
Casparian strip	GO:0048226	4.54018E-06	1	1	1
external encapsulating structure	GO:0030312	2.92E-04	1	0.059849903	7.74441E-05
cell wall	GO:0005618	2.36E-03	1	3.20E-02	9.8472E-05
Golgi membrane	GO:0000139	2.49E-02	1	1	1
plant-type cell wall	GO:0009505	0.145134308	0.843790786	0.66175405	2.33108E-05
vacuole	GO:0005773	0.755681748	0.06584236	1	4.83E-04
secretory vesicle	GO:0099503	1	0.054669105	1	1.92E-08
intracellular anatomical structure	GO:0005622	1	1.60E-54	1	3.38E-03
plant-type vacuole	GO:0000325	1	0.171517642	1	6.52E-03
cytosol	GO:0005829	1	1.15E-10	1	0.009543925
cytoplasm	GO:0005737	1	1.39E-61	1	1.62E-02
perinuclear region of cytoplasm	GO:0048471	1	1	1	3.43E-02
chloroplast	GO:0009507	1	6.56E-162	1	1
plastid	GO:0009536	1	3.51E-145	1	1
thylakoid	GO:0009579	1	7.72E-135	1	1
plastid envelope	GO:0009526	1	1.11E-126	1	1
chloroplast thylakoid	GO:0009534	1	1.14E-125	1	1
plastid thylakoid	GO:0031976	1	2.54E-125	1	1
thylakoid membrane	GO:0042651	1	4.30E-111	1	1
photosynthetic membrane	GO:0034357	1	6.50E-111	1	1
chloroplast thylakoid membrane	GO:0009535	1	9.00E-109	1	1
plastid thylakoid membrane	GO:0055035	1	2.09E-108	1	1

plastid membrane	GO:0042170	1	5.23E-103	1	1
organelle outer membrane	GO:0031968	1	2.99E-94	1	1
outer membrane	GO:0019867	1	2.99E-94	1	1
plastid stroma	GO:0009532	1	5.70E-91	1	1
chloroplast stroma	GO:0009570	1	9.27E-90	1	1
organelle envelope	GO:0031967	1	2.45E-89	1	1
envelope	GO:0031975	1	2.45E-89	1	1
chloroplast envelope	GO:0009941	1	3.36E-66	1	1
intracellular membrane-bounded organelle	GO:0043231	1	2.22E-57	1	1
membrane-bounded organelle	GO:0043227	1	6.99E-57	1	1
non-membrane-bounded organelle	GO:0043228	1	3.26E-54	1	1
intracellular non-membrane-bounded organelle	GO:0043232	1	3.26E-54	1	1
intracellular organelle	GO:0043229	1	5.13E-54	1	1
organelle	GO:0043226	1	2.32E-53	1	1
photosystem	GO:0009521	1	5.13E-52	1	1
bounding membrane of organelle	GO:0098588	1	2.34E-39	1	1
photosystem II	GO:0009523	1	1.80E-38	1	1
organelle membrane	GO:0031090	1	1.22E-28	1	1
photosystem I	GO:0009522	1	1.28E-27	1	1
thylakoid lumen	GO:0031977	1	2.41E-25	1	1

chloroplast thylakoid membrane protein complex	GO:0098807	1	9.48E-20	1	1
plastid thylakoid lumen	GO:0031978	1	7.17E-19	1	1
chloroplast thylakoid lumen	GO:0009543	1	7.17E-19	1	1
plastoglobule	GO:0010287	1	3.33E-15	1	1
plastid nucleoid	GO:0042646	1	3.91E-15	1	1
nucleoid	GO:0009295	1	1.61E-13	1	1
chloroplast nucleoid	GO:0042644	1	1.85E-13	1	1
chloroplast membrane	GO:0031969	1	7.32E-13	1	1
stromule	GO:0010319	1	2.17E-12	1	1
photosystem II oxygen evolving complex	GO:0009654	1	2.57E-12	1	1
membrane protein complex	GO:0098796	1	4.28E-12	1	1
photosystem I reaction center	GO:0009538	1	7.35E-10	1	1
plastid-encoded plastid RNA polymerase complex	GO:0000427	1	1.40E-09	1	1
light-harvesting complex	GO:0030076	1	1.54E-07	1	1
thylakoid light-harvesting complex	GO:0009503	1	1.54E-07	1	1
plastid ribosome	GO:0009547	1	2.15893E-06	1	1

PSII associated light-harvesting complex II	GO:0009517	1	8.40822E-05	1	1
plastid large ribosomal subunit	GO:0000311	1	8.40822E-05	1	1
granal stacked thylakoid	GO:0009515	1	3.90E-04	1	1
magnesium chelatase complex	GO:0010007	1	3.90E-04	1	1
granum	GO:0009542	1	3.90E-04	1	1
protein-containing complex	GO:0032991	1	1.35E-03	1	1
ribosome	GO:0005840	1	1.47E-03	1	1
organellar ribosome	GO:0000313	1	7.51E-03	1	1
extrinsic component of membrane	GO:0019898	1	1.04E-02	1	1
chloroplast photosystem I	GO:0030093	1	1.05E-02	1	1

3. Annexes Chapitre V:

Tableau Supp. V.1 : Valeur des phenotypes GALA pour chaque lignée recombinante identifiées entre les épimarqueurs MM859 et MM867 pour STANDARD, HEAT, DROUGHT et FLOOD.

	STANDARD	HEAT	DROUGHT	FLOOD
epiRIL70	159.4	55.0	169.1	216.6
epiRIL439	115.8	60.9	186.2	233.7
epiRIL208	139.9	115.8	197.5	244.9
epiRIL244	103.1	98.2	115.1	162.6
epiRIL257	123.9	106.6	144.1	191.5
epiRIL356	128.3	183.3	75.3	122.8
epiRIL333	116.0	94.1	91.7	139.1
epiRIL362	159.5	168.9	146.3	193.7
epiRIL366	89.8	124.7	106.0	153.4
epiRIL344	119.3	89.6	90.1	137.5
epiRIL225	181.6	104.0	127.8	175.3
epiRIL480	142.4	115.0	169.3	216.8
epiRIL410	131.9	90.7	113.6	161.1
epiRIL93	164.8	134.7	110.8	158.2
epiRIL215	143.8	98.6	122.5	170.0

Titre : Mécanismes épigénétiques impliqués dans la réponse d'*Arabidopsis thaliana* à l'infection par *Plasmodiophora brassicae* sous différentes conditions abiotiques

Mots clés : hernie des crucifères, QTL^{epi}, miARN, interaction stress biotique x abiotique

Résumé : *Plasmodiophora brassicae*, agent pathogène biotrophe obligatoire causal de la hernie des crucifères, provoque la formation de galles sur les racines et induit des bouleversements cellulaires et physiologiques importants chez les plantes hôtes dont *Arabidopsis thaliana*. La réponse d'*A. thaliana* à l'infection implique des facteurs génétiques et épigénétiques dont l'effet peut être modulé par les conditions environnementales. Les objectifs de cette thèse sont de déterminer si des contraintes hydrique et thermique, seules ou combinées, modifient l'architecture épigénétique contrôlant la réponse d'*Arabidopsis* à la hernie et l'implication des miARN dans cette réponse. Une stratégie d'épigénétique quantitative, utilisant une population epiRIL, épigénotypée avec des marqueurs basés sur des variations de méthylation de l'ADN, a permis d'identifier 36 QTL épigénétiques (QTL^{epi})

dont des QTL^{epi} communs à plusieurs conditions abiotiques et des QTL^{epi} spécifiques d'une condition. Le séquençage Illumina des ARNm et miARN différenciellement exprimés chez des génotypes sensible et partiellement résistant a permis l'identification de 14 familles de miARN ciblant 332 gènes impliqués notamment dans la production d'énergie, la dégradation des parois cellulaires et la reconnaissance des agents pathogènes. Deux familles de miARN ont été décrites pour la première fois. Ce travail de thèse apporte de nouveaux éléments sur les mécanismes épigénétiques sous-tendant la résistance à la hernie et sur la variabilité épigénétique potentiellement utilisable pour la construction de variétés résistantes aux maladies dans des environnements contraints.

Title: Epigenetic mechanisms involved in the response of *Arabidopsis thaliana* to *Plasmodiophora brassicae* infection under different abiotic conditions

Keywords: clubroot, QTL^{epi}, miRNA, biotic x abiotic stress interaction

Abstract: *Plasmodiophora brassicae*, the obligatory biotrophic pathogen causal of clubroot disease, provokes gall formation on roots and induces major cellular and physiological reprogramming in host plants such as *Arabidopsis thaliana*. Genetic and epigenetic factors are involved in the response of *A. thaliana* to infection, the effect of which can be modulated by environmental conditions. The aims of this thesis are to determine whether water availability and temperature constraints, alone or combined, modify the epigenetic architecture controlling the clubroot response in *Arabidopsis* and the involvement of miRNAs in this response. A quantitative epigenetic strategy using an epiRIL population epigenotyped with markers based on DNA methylation variations identified 36 epigenetic QTL (QTL^{epi}),

including QTL^{epi} common to several abiotic conditions and QTL^{epi} specific to one condition. Illumina sequencing of mRNAs and miRNAs differentially expressed in susceptible and partially resistant genotypes has enabled the identification of 14 miRNA families targeting 332 genes notably involved in energy production, cell wall degradation and pathogen recognition. Two miRNA families were described for the first time. This thesis work provides new insights into the epigenetic mechanisms underlying clubroot resistance and into the epigenetic variability that could potentially be used to construct disease-resistant varieties in constrained environments.