Acclimatation de l'espèce aquatique invasive, Ludwigia grandiflora, au milieu terrestre : Approches physiologique et épigénétique

Julien Genitoni

▶ **To cite this version:**

Julien Genitoni. Acclimatation de l'espèce aquatique invasive, Ludwigia grandiflora, au milieu terrestre : Approches physiologique et épigénétique. Ecologie, Environnement. Agrocampus Ouest, 2019. Français. NNT : 2019NSARA085 . tel-02886498v1

HAL Id: tel-02886498

https://theses.hal.science/tel-02886498v1

Submitted on 1 Jul 2020 (v1), last revised 7 Jul 2020 (v2)

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.

UNIVERSITE ECOLOGIE
BRETAGNE GEOSCIENCES
LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

AGRO CAMPUS OUEST

THESE DE DOCTORAT DE

AGROCAMPUS OUEST
COMUE UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

ECOLE DOCTORALE N° 600
Ecole doctorale Ecologie, Géosciences, Agronomie et Alimentation
Spécialité : «Ecologie et Evolution »

Par
Julien GENITONI

« Acclimatation de l'espèce aquatique invasive, *Ludwigia grandiflora*, au milieu terrestre : Approches physiologique et épigénétique »

Thèse présentée et soutenue à « Agrocampus Ouest Rennes », le 19/12/2019
Unité de recherche : Ecologie et santé des écosystèmes (UMR ESE)
UMR ESE AGROCAMPUS OUEST—INRA 35042 Rennes
Thèse N° : 2019-31_A-85

Rapporteurs avant soutenance :

Mme. Hélène Frérot-Pauwels	Maitre de conférences, UMR 8198 EEP-CNRS, Université de Lille
Mme. Sara Puijalon	Directrice de recherche, UMR 5023 LEHNA-CNRS, Université de Lyon 1

Composition du Jury :

Président :	M. Jacques Haury	Professeur, UMR 0985 ESE-Agrocampus Ouest-INRA
Examinateur :	M. Jean Christophe Avice	Professeur, UMR 950 EVA INRA, Université de Caen
Directrice de thèse :	Mme. Dominique Barloy	Maitre de conférences, UMR 0985 ESE-Agrocampus Ouest-INRA
Co-dir. de thèse :	M. Stéphane Maury	Professeur, LBLGC USC 1328, Université d'Orléans

REMERCIEMENTS

Assis devant mon écran d'ordinateur, mes doigts sont immobiles au-dessus de mon clavier. Je n'ai pour ainsi dire jamais eu de difficulté à écrire. Pourtant, coucher sur le papier de simples remerciements qui concluent plus de trois ans de travail me laisse hésitant… Ces trois années ont le paradoxe d'avoir été le mixte parfait entre un marathon et un sprint. Un 42km dans une vie humaine et 100 mètres dans le temps de la recherche. Ma courte vie professionnelle m'a donné la chance de toujours tomber sur des personnes exceptionnelles. Comment retranscrire et remercier à leur juste valeur les personnes qui ont participé à cette thèse ? Je ne peux que les citer ci-dessous mais elles savent pour la plupart toute la gratitude que je leur porte.

Je tiens d'abord à remercier les membres de Jury Hélène Frérot-Pauwels, maitre de conférences et Sara Puijalon, directrice de recherche qui ont accepté d'être les rapportrices de ce long manuscrit. Vos retours pertinents sont venus enrichir ma réflexion. Je remercie également les professeurs Jean Christophe Avice et Jacques Haury qui ont accepté de faire partie de ce jury.

Ce travail n'aurait pas été possible sans le financement de l'INRA et de la région Bretagne, mais également de l'ONEMA.

Je tiens à remercier mes deux encadrants de thèse que sont Dominique Barloy et Stéphane Maury. D'abord à Dominique Barloy qui a pensé à moi pour cette thèse malgré mon départ pour des aventures journalistiques. Après un premier stage de master 2, je connaissais ta rigueur et ta bienveillance, alors je n'ai pas hésité très longtemps pour revenir dans l'équipe EPIX. Dès les premiers jours en 2016, jusqu'aux dernières lignes de ce manuscrit, tu m'as aidé à chaque étape me rassurant lorsque les expériences ne se passaient pas comme prévu.

Un grand merci également à Stéphane Maury avec qui j'ai pris un grand plaisir à travailler. Toujours débordant d'énergie, un alliage parfait entre rigueur scientifique et encouragement, tu as su insuffler une dynamique importante durant ces trois années. Un énorme merci à tous les deux pour votre implication dans ce qui est « notre » thèse. Vous formez un duo complémentaire et votre collaboration n'annonce que du bon !

Mes remerciements vont ensuite à ceux qui m'ont apporté un soutien technique, scientifique et parfois moral durant ces trois années :

D'abord à Danièle Vassaux qui m'a appris à manipuler en laboratoire avec rigueur et avec qui nous avons partagé les galères pour les extractions ARN de la jussie et de longues discussions. Je te souhaite le meilleur !

Ensuite à Alain Delaunay qui m'a accueilli au laboratoire LBLGC d'Orléans et a été d'un grand secours pour terminer les quantifications de méthylation globale et l'extraction de la chromatine.

Je remercie également Sylvie Citerne de l'institut Jean-Pierre Bourgin pour les dosages des phytohormones. Un grand merci !

Je souhaite également remercier particulièrement, David Renault, qui travaille avec Dominique et moi depuis 2014 et nous a permis d'explorer le métabolisme de la jussie. J'ai aimé nos échanges sportifs et musicaux sous la douce mélodie du GC-MS.

Un énorme merci à toute l'équipe de l'unité expérimentale U3E qui s'est occupée de la jussie en serre. Merci Antoine Gallard, Bernard Joseph, Maïra Coke, Philippe Knapen et Yoann Bennevault avec qui j'ai passé de bons moments.

Un grand merci à Solenn Stoeckel pour les analyses génétiques et Marie Pierre Étienne pour les conseils en statistique. Votre aide a été précieuse dans cette fin de thèse.

Je remercie également Jörg Tost pour son expertise en épigénétique et le séquençage de la jussie. Ces résultats seront sans nul doute une avancée majeure pour la recherche sur la jussie. Je salue également Anne Laure Le Gac qui prend la suite de ces recherches sur la jussie.

Merci à tous ceux qui m'ont aidé de près ou de loin lors des longues journées de phénotypages : Michel Bozec, Luis Portillo, Danièle Vassaux, Lauriane Gilly, Dominique Barloy. J'en oublie sûrement.

Je souhaite également remercier tous les membres de l'équipe EPIX que je n'ai pas cités précédemment : Éric Petit, Marie Agnès Coutellec, Éric Édeline, Damien Fourcy, Olivier Lorvelec, Scott Mc Cairns, Flavie Amilien, Marc Collinet, Caroline Gorzerino, Marilyne Harang, Patricia Le Quiellec. Et également les membres du laboratoire LBLGC qui m'ont chaleureusement accueilli sur la courte période que j'ai passée à Orléans, avec une pensée pour Mamadou Dia-Sow, bon courage pour la suite.

Je souhaite également remercier le personnel administratif et en particulier Gervaise Février pour ta gentillesse et Ingrid Lévêque pour ton soutien quotidien et ta persévérance pour mon dossier vacation.

Un merci particulier à mes camarades, Agathe Dutt, avec qui nos discussions science-fiction auront jalonner nos premières années de thèse et rendues notre bureau moins austère. Et plus récemment, Luis Portillo, avec qui j'ai pu avoir de longues et enrichissantes discussions pour refaire la face du monde. Je fais également un clin d'œil à mes collègues doctorants, Cécile, Rafaela, Agathe, Corentin, Estelle, Luis qui malgré mon asociabilité ont persévéré et m'ont fait passer de bons moments.

Enfin, ces trois années ont permis de renforcer et renouer des amitiés et elles n'auraient pas été aussi simples sans le soutien de mes proches :

Un grand merci à toute ma famille et en particulier à mon petit frère Adrien et mes parents « Loïs et Hal » qui malgré leurs vies bien occupées ont toujours été là pour m'aider. Je leur dois ma curiosité et ma réussite scolaire.

Un grand merci à mes amis, Samuel, Émilien, Héloïse(s), Jean, Fanny, Léonard, Roxane Florian, Edmond, Alexis, Alexandre, Nicolas, Thomas… Et bien d'autres. À nos parties de JdR, au petit tour du 49, aux mariages, et à tous ces moments passés ensemble, c'est aussi grâce à vous que j'ai pu mener à terme cette thèse.

Enfin, une mention spéciale pour Justine, ça fait maintenant 12 ans et tu ne m'as jamais autant soutenu que durant ces trois dernières années. Je t'aime.

Région
BRETAGNE

INRA
SCIENCE & IMPACT

ONEMA
Office national de l'eau
et des milieux aquatiques

AGRO
CAMPUS
OUEST

UNIVERSITE D'ORLEANS

UMR
ESE

LBLGC
Laboratoire de Biologie des Ligneux
et des Grandes Cultures
UPRES EA 1207

LISTE DES FIGURES

INTRODUCTION GENERALE

Figure 1 : Problématiques en lien avec les invasions biologiques et leur pertinence pour le processus d'invasion et son impact. 2

Figure 2 : Les quatre étapes de l'invasion et les facteurs qui affectent le succès invasif des plantes..... 4

Figure 3 : Processus évolutif durant les différentes étapes de l'invasion..... 6

Figure 4 : Étape du processus d'invasion et les facteurs clés intervenants durant l'invasion qu'ils soient épi/génétiques, liés mode de vie, environnementaux et liés aux activités humaines..... 8

Figure 5 : État des connaissances actuelles sur la distribution de *Ludwigia grandiflora* et *Ludiwigia peploides* en France..... 26

Figure 6 : Les différents organes et formes de *Ludwigia grandiflora* ainsi que les deux habitats du Marais de Mazerolles..... 26

Figure 7 : Variation de biomasses de *Ludwigia grandiflora*..... 28

Figure 8 : Cycle de développement annuel de la jussie. 30

Figure 9 : Expansion de la distribution de *Ludwigia grandiflora* au sein du Parc Naturel Régional de Brière (Loire Atlantique) entre 1999 et 2013..... 32

Figure 10 : Comparaison des morphotypes terrestres et aquatiques de *Ludwigia grandiflora.*34

Figure 11 : Distributions actuelle et future en Europe des espèces aquatiques invasives *Egeria densa*, Ludwigia spp. et *Myriophyllum aquaticum*, selon deux scénarios bioclimatique. 34

Figure 12 : Les différents niveaux de l'adaptation des changements physiologiques aux mutations génétiques. 36

Figure 13 : Graphique conceptuel présentant des normes de réactions 42

Figure 14 : Deux principaux modèles de génétique quantitative utilisés pour étudier les normes de réaction. 44
Figure 15 : Courbes de tolérance et plasticité phénotypique..... 44
Figure 16 : Hypothèses relatives à la plasticité de la valeur sélective des génotypes/populations/espèces invasives et non invasives. 48
Figure 17 : Modifications épigénétiques et leurs effets potentiels sur l'expression des gènes et sur la structure de la chromatine. 52
Figure 18 : Différents niveaux de condensation de la chromatine. 52
Figure 19 : Voies des ARN dirigées par la méthylation de l'ADN (RNA-directed DNA methylation) chez *Arabidopsis thaliana*. 54
Figure 20 : Conformation de la cytosine et de la cytosine méthylée. 54
Figure 21 : Rôles des mécanismes épigénétiques et particulièrement de la méthylation de l'ADN chez les plantes. 56
Figure 22 : Méthodes d'analyses génomiques de la méthylation de l'ADN. 58
Figure 23 : Dispositif expérimental commun. 72

CHAPITRE I

Figure I-1 : Voies métaboliques principales impliquées dans la réponse à un stress hydrique. 88

Figure I-2 : Rôle de l'éthylène sur la formation de racines adventives lors d'un stress à la submersion 90

Figure I-3 : Stratégies et réponses des plantes à la submersion. 92

Figure I-4 : Interconnexion de différents événements de signalisation et de transduction durant un stress de submersion. 94

Figure I-5 : Stress de post submersion chez les plantes. 96

Figure I-6 : Réponses des plantes à un stress hydrique. 98

Figure I-7 : Modèle du rôle des facteurs de transcription dans (a) la fermeture des stomates et dans (b) la signalisation en cas de stress hydrique. 98

Figure I-8 : Caractéristiques des plantes sensibles (sensitivity), tolérantes (tolerance) à la sécheresse et tolérantes à la dessiccation. 100

Figure I-9 : Comparaison de coupes anatomiques des tissus chez *Nymphoides. Peltata* 104

Figure I-10 : Morphologie des tiges de *Ludwigia arcuata* élevées dans différentes conditions. 106

Figure I-11 : Coupes transverses de rhizomes et racines de différentes espèces du genre Ludwigia. 108

Figure I-12 : Progression de 1999 à 2010 de *Ludwigia grandiflora* en milieu terrestre au sein du marais de Mazerolles. 110

Figure I-13 : Morphotype aquatique et terrestre du marais de Mazerolles en septembre. 110

Figure I-14 : Dispositif expérimental visant à tester l'impact de la fluctuation des niveaux d'eau sur le morphotype aquatique puis sur le morphotype terrestre dans 2 expérimentations indépendantes. 196

Figure I-15 : Analyses en composante principale caractérisant la variabilité morphologique à 14 (t14) et 28 (t28) jours pour les morphotypes aquatique et terrestre dans des conditions aquatiques (Am-a), terrestre (Am-t et Tm-t) et d'alternance des niveaux d'eau (Am-a/t). ... 198
Figure I-16 : Analyses en composante principale caractérisant la variabilité morphologique à 14 (t14) et 28 (t28) jours pour les morphotypes aquatique et terrestre dans des conditions aquatiques (Am-a et Tm-a), terrestre (Tm-t) et d'alternance des niveaux d'eau (Tm-a/t)..... 200
Figure I-17 : Dispositif expérimental visant à tester l'impact de la fluctuation des niveaux d'eau sur le morphotype aquatique suite à l'application de 8 cycles d'alternances. 202
Figure II-1 : Aspect unique du cycle de vie des plantes et variation dans la méthylation au cours du développement des gamétophytes mâle et femelle..... 212

CHAPITRE II

Figure II-2 : Modèle schématique du lien entre phytohormone et chromatine durant la plasticité développementale et la robustesse chez les plantes..... 214
Figure II-3 : Différence de méthylation chez des cultivars de riz. 216
Figure II-4 : La mémoire du stress et les voies moléculaires de récupération.. 218
Figure II-5 : Contrôle du locus FLC médié par le froid et des mécanismes épigénétiques ... 220
Figure II-6 : : La floraison induite par la température est compromise chez les mutants H3K36me3. 222
Figure II-7 : Les différents niveaux de l'adaptation. 226
Figure II-8 : Design expérimental utilisé pour démontrer les traits adaptatifs et la diversité épigénétique réduite après la sélection. 230
Figure II-9 : Schéma de la démarche technique des analyses « omics » de la jussie. 334
Figure II-10 : Gel d'agarose d'ADN obtenus avec et sans traitement à la DNase suite au protocole d'extraction de chromatine de Lafon Placette *et al.*, (2013) chez le morphotype aquatique en condition aquatique et terrestre (MAA et MAT). 336

Figure II-11 : Gel avant et après découpe pour l'extraction et purification d'ADN du morphotype aquatique en condition aquatique et terrestre (MAA et MAT). 338

CHAPITRE III

Figure III-1 : Apport de la thèse sur l'espèce invasive *L. grandiflora* à propos des interactions entre les variations génétique et épigénétique et leur rôle sur le phénotype d'après. ..... .348

Figure III-2 : Effet Baldwin chez l'évolution (morphologique) des plantes. 362

Figure III-3 : Cadre conceptuel pour la différenciation de la base génétique et épigénétique pour les variations phénotypiques à trois étapes du processus d'invasion (introduction, établissement, expansion). 364

Figure III-4 : Cadre expérimental pour différencier la régulation génétique et épigénétique de la plasticité phénotypique adapté pour *Ludwigia grandiflora* 366

Figure III-5 : Source de diversité épigénétique pour l'amélioration des plantes. 368

Figure III-6 : La balance entre le niveau global de méthylation de l'ADN et l'activité des éléments transposables. 370

Figure III-7 : Résultats et perspectives de l'étude de l'acclimatation de L.grandiflora au milieu terrestre. 372

LISTE DES TABLEAUX

INTRODUCTION GENERALE

Tableau 1. Exemples des différents types d'impacts des plantes invasives sur la santé humaine et sur les activités humaines 18

Tableau 2. Caractéristiques permettant de différencier *L. grandiflora* de *L. peploides*..... 28

Tableau 3. Exemple d'interactions entre sources de flexibilité que sont la plasticité phénotypique, l'évolution génétique et la migration..... 38

Tableau 4. Synthèse des études testant des changements génétiques induits par le climat dans un contexte allochronique (temps) dans la nature. 46

Tableau 5. Classification des coûts et limites de la plasticité phénotypiques. 48

Tableau 6. Valorisation des travaux réalisés pendant ma thèse. 70

Tableau 7. Stratégie globale et spécificités des dispositifs expérimentaux réalisés pendant ma thèse..... 74

Tableau 8. Métabolites ciblés lors des analyses métaboliques..... 76

CHAPITRE I

Tableau I-1. Ajustements morphologiques en réponse à la submersion (flooding)..... 86

CHAPITRE II

Tableau II-1. Fonctions des déméthylases d'ADN dans le développement des plantes 210

Tableau II-2. Les effets du stress héritable sur la stabilité du génome et de l'épigénome des plantes..... 228

Tableau II-3. Quantification et qualification de l'ADN extrait à partir d'euchromatine chez le morphotype aquatique en condition aquatique et terrestre (MAA et MAT) avec et sans DNase. 336

LISTE DES ABREVIATIONS

%mC *: pourcentage global de cytosines méthylées*
ABA *: acide abscissique*
ACC *: acide 1-amino-cyclopropane-1-carboxylique*
ADH *: alcool déshydrogénase*
ADN *: Acide désoxyribonucléique*
$AgNO_3$ *: nitrate d'argent, inhibiteur de la perception de l'éthylène*
ALAT *: alanine-aminotransférase*
Am : *morphotype aquatique*
APG *: Angiosperm Phylogeny Group*
APX *: peroxydase ascorbate*
ARC *: amidoxime reducing component*
ASC *: ascorbate*
ATP *: Adénosine triphosphate*
CAT *: catalase*
Chgs *hypoxia core genes*
CME *: cold memory element*
CMT : gène de CHROMOMETHYLTRANSFERASE
CMT3 *: chromométhylases*
CRISPR-Cas9 *: Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats associated protein 9*
CTAB *: Cetyl trimethylammonium bromide*
DME *: glycosylase (déméthylase)*
DMR *: matière sèche des racines*
DMS *: matière sèche des tiges*
DMT : gène de méthyltransférases
DRM : gène de DOMAINS REARRANGED METHYL TRANSFERASE
DTB *: day to bolting*
EEE *: espèces exotiques envahissantes*
EFPA *: Écologie des forêts, prairies et milieux aquatiques*
EICA *: evolution of increased competitive ability*
ELIP *: early light inducible protein*
epiRILs *: Epigenetic recombinant inbred line*
EPIX *: Ecologie évolutive des perturbations liées aux invasions biologiques et aux xénobiotiques*
ERF *: ethylene response factor*
ERH *: enemy release hypothesis*
ESE *: Ecologie et santé des écosystèmes*
FAE *: fatty acid elongase (elongase d'acide gras)*
FEDER *: Fonds européen de développement régional*
FK *: fructokinase*, *: fructokinase*
FLC *: Flowering locus c*
FMR *: matière fraiche des racines*
FMS *: matière fraiche des tiges*
FRB *: Fondation pour la recherche sur la biodiversité*
GABA *: acide γ-aminobutyrique*
GAD *: acide glutamique décarboxylase*
GAI *: gibberellic acid insensitive*
GAMYB *: gibberellin- and abscisic acid-regulated MYB*

GDH *: glutamate dehydrogenase*, *: glutamate déshydrogenase*
GSH *: glutathion*
HB *: hemoglobin*
HCR1 *: hydraulic conductivity of the root*
HPLC *: high performance liquid chromatography*
HRE1 *: hypoxia response attenuator*
HSP *: Heat shock protein*
HXK *: hexokinases*
IAA : auxin
IncRNAs *: Long noncoding RNA*
Int : interactor protein
INV *: invertase*
JA *acide jasmonique*
JL *: leucine jasmonyl acid*
LBLGC *: Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures*
LDH *: lactate déshydrogenase*
LEA *: Late embryogenesis abundant*
LI *: longueur moyenne des entre noeuds*
LP *: taille de la plante (cm)*
MBD *: methyl CpG binding domain*
MCP *: 1-methylcyclopropene*
MET1 *: methyltransferase 1*
miRNA *micro ARN*
MPK3 *: MAP kinase 3*
MS-AFLP *: Methylation-Sensitive Amplification Length Polymorphism*
NAD+ *: nicotinamide adénine dinucléotide*
nbB *nombre de bourgeons*
nbL *: nombre de feuilles*
nbNR *: nombre de noeuds présentant des racines*
NCED3 *gène 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenas*
NiR *: nitrite reductase*
NO *oxyde nitrique*
NtGPDL *: glycerophosphodiesterase*
NTR *: N-terminal route*
ONEMA *: Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques*
PCO *: plant cell oxidase*
PDC *: pyruvate décarboxylase*
PFK *: phosphofructokinase*
PFP *: phosphofructokinase*
PGI *: glucose-6-phosphate isomerase*
PGM *: phosphoglucomutase*
PTMs *: Post-Translational Modifications*
RAM : *root apical meristem*
RDPI *: relative distance plasticity index*
RGR *: taux relatif de croissance*
RNS *: espèces réactives de l'azote*
ROS *: espèces réactives de l'oxygène*
Rr *: ratio des racines*
SA *: acide salicylique*

SAB *: Sub1A binding*
SAM : *shoot apical meristem*
SCS *: succinyl Coa*
SMP *: Single Methylation Polymorphisms*
SOD *: superoxyde dismutase*
Sr *ratio des tiges*
SUS *: sucrose synthase*
TCA *: tricarboxylique*
TEs *: éléments transposables*
Tm *: morphotype terrestre*
VIN3 : vernalization insensitive 3 gene
WC *: contenu en eau*
WGBS : *whole genome bisulfite sequencing*

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION GÉNÉRALE 1
I. Les invasions biologiques 3
1. Concept et définition 3
2. Processus d'invasion 5
2.1. Transport 5
2.2. Introduction 5
3. Caractéristiques des plantes invasives et sensibilité des écosystèmes 9
3.1.1. Système de reproduction 11
3.1.2. Croissance et développement 13
3.1.3. Allélopathie 13
4. Impacts de l'invasion sur les écosystèmes et leur gestion 17
II. La jussie, plante aquatique invasive 25
1. Histoire de l'invasion de Ludwigia sp en France 25
2. Caractéristiques de la jussie 27
3. Conséquences sur les écosystèmes et invasion secondaire des prairies humides 31
3.1. Impacts de la jussie sur les écosystèmes envahis 31
3.2. Gestion de l'invasion 31
3.3. Devenir de l'invasion, colonisation du milieu terrestre 33
III. Les sources de flexibilité 37
1. Concept d'adaptation et d'acclimatation 37
2. Migration 39
3. Plasticité phénotypique 41
3.1. Concept et définition 41
3.2. Méthodes d'analyse de la plasticité phénotypique 43
3.3. Rôles de la plasticité phénotypique 47
3.4. Plasticité phénotypique et espèces invasives 49
4. Épigénétique 51
4.1. Bref historique de l'épigénétique 51
4.2. Mécanismes épigénétiques 53
4.2.1. État de la chromatine 53
4.2.2. Marque de la chromatine 53
4.3. Les stratégies pour l'étude de l'épigénome 57
5. Évolution génétique et espèces invasives 61
5.1. Mutation 61
5.2. Dérive génétique 61
5.3. Hybridation et Polyploïdie 63

5.4. Les éléments transposables 63
IV. Objectifs de la thèse 67
1. Contexte des travaux dans le cadre de l'unité 67
2. Objectifs spécifiques de la thèse 69
3. Stratégie et dispositif 73
CHAPITRE I : Caractérisation des morphotypes terrestre et aquatique 79
I. Introduction 81
1. Contexte de l'étude 81
2. Objectif de l'étude 81
II. Contraintes et adaptation des plantes aux milieux aquatique et terrestre 85
1. Contraintes des milieux aquatique et terrestre 85
2. Réponses des plantes à la submersion et à la sécheresse 89
2.1. Réponses des plantes au milieu aquatique 89
2.1.1. La submersion 89
2.1.2. Le stress post-submersion 95
2.2. Réponses des plantes au milieu terrestre 97
2.3. Cas des plantes aquatiques 103
3. Cas du Marais de Mazerolles. 109
III. Résultats : caractérisation des morphotypes terrestre et aquatique et évaluation de leur plasticité 111
1. Présentation synthétique de la publication Billet *et al.*, 2018 111
2. Publication Billet *et al.*, 2018 (Ecology and Evolution) 113
3. Présentation synthétique de la publication Genitoni *et al.*, en préparation 127
4. Publication Genitoni *et al.*, in prep (Journal of Ecology) 129
IV. Discussion, limites et perspectives 187
1. Que nous apprend la caractérisation de la jussie sur ses capacités d'adaptation ? 187
2. La plasticité phénotypique aide-t-elle à mieux comprendre l'invasion du milieu terrestre par la jussie? 191
3. La fluctuation des niveaux d'eau participe-t-elle à l'acclimatation/adaptation de la jussie au milieu terrestre ? 195
3.1. Effet de cycles d'alternances du niveau d'eau sur le morphotype aquatique et sur le morphotype terrestre 197
3.2. Effet de 8 cycles d'alternances sur le morphotype aquatique 201

CHAPITRE II : Étude du rôle de l'épigénome dans la réponse aux changements de milieux chez *L. grandiflora* 205
I. Introduction 207
1. Contexte de l'étude 207
2. Objectif de l'étude 207
II. État de l'art sur l'épigénétique chez les plantes 211
1. Épigénétique et développement des plantes 211
1.1. Rôle lors de la reproduction 213
1.2. Rôle dans le développement végétatif et l'activité des méristèmes 215
2. Épigénétique et environnement 217
2.1. Réponses des plantes aux contraintes biotiques et abiotiques 217
2.2. Mémoire des stress 219
3. Implication dans la vernalisation 221
4. Épigénétique, plasticité phénotypique et adaptation 225
4.1. Épigénome et plasticité 225
4.2. Épigénome et adaptation 227
5. Épigénétique, une source de flexibilité chez les espèces invasives 233
5.1. Présentation synthétique de la publication Marin/Genitoni *et al.* 2019 233
5.2. Publication Marin/Genitoni *et al.* (2019) (Fonctional Ecology) 235
III. Résultats : Mise en évidence expérimentale du rôle de l'épigénome dans la flexibilité des morphotypes terrestre et aquatique de la jussie 255
1. Présentation synthétique de la publication Genitoni et al. en révision 255
2. Publication Genitoni et al. (Physiologia plantarum) 259
3. Présentation synthétique de la publication Maury *et al.*, 2019 321
4. Publication : Maury et al., 2019 (Frontiers in Plant Science). 321
IV. Discussion, limites et perspectives : vers la mise en place d'une stratégie épigénomique sur le modèle jussie 331
1. L'utilisation d'un agent pharmacologique permet-elle d'explorer le rôle de la méthylation de l'ADN dans l'adaptation de la jussie au milieu terrestre ? 331
2. Quelle est la stratégie epigénomique la mieux adaptée sur la jussie pour aller plus loin? 335
Chapitre III : Discussion générale, conclusion générale, et perspectives 343
I. Synthèse des résultats et discussion sur les apports des travaux de thèse 347
II. Perspectives aux travaux de thèse sur le modèle jussie 353
1. Quelles stratégies développées pour l'étude de l'adaptation de la jussie au milieu terrestre? 353

2. Comment estimer le rôle des sources de flexibilité génétique et épigénétique dans l'adaptation de la jussie au milieu terrestre ? 357
3. Les espèces invasives représentent-elles des modèles pertinents pour l'étude des mécanismes épigénétiques ? 361
4. Quels sont les apports de la recherche à la gestion des invasions biologiques? 367
Références Bibliographiques 375
Annexes 402

INTRODUCTION GÉNÉRALE

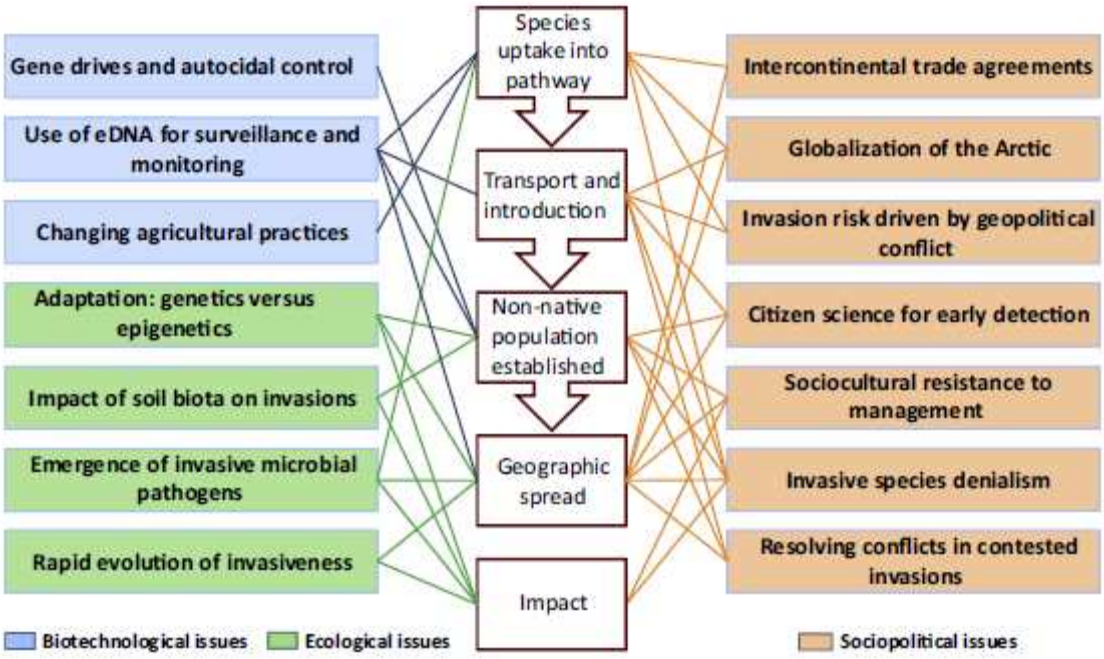


Figure 1 : Problématiques en lien avec les invasions biologiques et leur pertinence pour le processus d'invasion et son impact.

Problématiques biotechnologiques, écologiques et sociopolitiques ayant une influence directe sur les processus d'invasion : survie pendant le transport, introduction dans un nouvel environnement, établissement d'une population reproductrice, et l'expansion dans la nouvelle aire d'introduction. Plusieurs questions remettent en question notre compréhension et notre capacité de gérer les impacts écologiques des invasions. Ces liens ne visent pas à être exhaustifs, mais servent plutôt à illustrer l'ampleur de la pertinence de ces questions (Ricciardi *et al.*, 2017)

I. Les invasions biologiques

1. Concept et définition

La vitesse des changements globaux engendrés par les activités humaines et l'épisode d'extinction massive observée questionnent la capacité des espèces à s'adapter à court terme. Ceballos *et al.* (2017) parlent d'une sixième extinction de masse avec 32% (8851/27600) des espèces de vertébrés dont le nombre est en diminution. L'anthropocène, littéralement l'ère de l'homme, cause une érosion des barrières biogéographiques ce qui participe une augmentation de l'expansion des espèces invasives (van Kleunen *et al.*, 2015). Ce phénomène s'est accéléré avec la mondialisation et l'augmentation des échanges internationaux (Early *et al.*, 2016). Plusieurs études montrent qu'entre 1948 et 2008, les échanges commerciaux humains, la naturalisation d'espèces invasives et le réchauffement climatique sont corrélés (Seebens *et al.*, 2015). Ainsi, de plus en plus d'études centrent leurs efforts sur la compréhension des migrations d'espèces et des phénomènes évolutifs qui permettent une adaptation rapide.

Les invasions biologiques peuvent être définies comme le succès d'une espèce exotique à s'installer, se développer et se maintenir en dehors de son aire de répartition d'origine. Ces espèces invasives, appelées également espèces exotiques envahissantes (EEE), provoquent des dommages tant au niveau économique qu'au niveau écologique (Lodge, 1993; Pimentel *et al.*, 2001). Parmi les espèces invasives les plus connues, on peut citer : le frelon asiatique, la jacinthe d'eau ou encore l'écrevisse de Louisiane (Annexe 1). Les invasions biologiques sont reconnues pour être la troisième cause d'érosion de la biodiversité après la destruction des habitats et les changements globaux. Bellard *et al.* (2013) posent l'hypothèse sur la base des prédictions des évolutions climatiques que le nord-est de l'Europe et des États-Unis seront plus affectés par les invasions biologiques que partout ailleurs. À ce titre, les chercheurs tentent de modéliser et prédire les futurs fronts d'invasion. Ricciardi *et al.* (2017) présentent les challenges et les opportunités dans la science de l'invasion en trois catégories, biotechnologiques, sociales et écologiques (Figure 1).

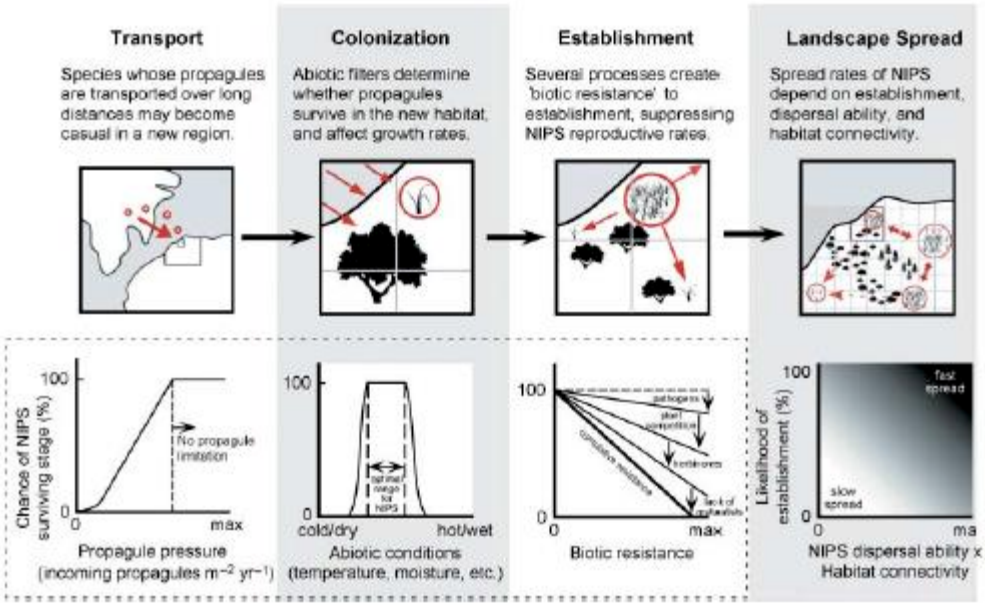


Figure 2 : Les quatre étapes de l'invasion et les facteurs qui affectent le succès invasif des plantes (Theoharides & Dukes, 2007).

Les graphiques en haut de la figure représentent le processus dominant se produisant à chaque étape de l'invasion, et les diagrammes conceptuels en dessous identifient les mécanismes principaux déterminant le succès des EEE. Les trois graphiques conceptuels de gauche partagent le même axe vertical correspondant au pourcentage de chance de survie d'une espèce invasive. La figure conceptuelle d'expansion montre la dépendance du taux d'expansion par rapport au succès d'une espèce aux étapes précédentes, en plus de ses caractéristiques de dispersion de propagules et les caractéristiques du paysage. Bien que de nombreux mécanismes soient soutenus par des résultats expérimentaux, ces figures conceptuelles sont hypothétiques. Les chiffres sont destinés à être illustratifs, mais pas exhaustifs.

Au niveau écologique, ces auteurs citent l'adaptation génétique versus épigénétique et l'adaptation rapide des espèces invasives. Par ailleurs, les invasions biologiques représentent des opportunités pour les biologistes d'étudier des processus évolutifs en temps réel (Huey *et al.*, 2005; Liebl *et al.*, 2013).

2. Processus d'invasion

Le processus d'invasion comprend différentes étapes que sont, le transport, l'introduction, l'établissement et l'expansion (Theoharides & Dukes, 2007; Pyšek & Richardson, 2010) (Figure 2).

2.1.Transport

Un organisme peut être transporté volontairement ou non dans un nouvel environnement. Pour les plantes, le transport s'effectue par divers vecteurs comme certains mammifères, dont l'Homme, par des oiseaux ou par le vent. Les plantes peuvent être transportées soit sous forme de graines, soit sous forme de plante, généralement volontairement pour l'horticulture ou l'agriculture. D'après Theoharides & Dukes, (2007) les plantes introduites volontairement à des fins de mise en culture ont plus de chances de devenir envahissantes. En effet, celles-ci seront dans des conditions plus favorables, du fait de la volonté de l'homme d'en exploiter les propriétés esthétiques ou gustatives. La réussite du transport dépend du nombre de propagules et de leur survie durant le transport (Figure 2).

2.2.Introduction

Face à ces nouvelles conditions, il y a deux devenirs possibles : s'adapter ou migrer (Aitken *et al.*, 2008). Si la migration vers des conditions plus favorables est plus aisée pour des animaux, les plantes sont quant à elles contraintes à s'adapter. Les propagules (graines ou plantes) résistant au transport n'arriveront pas nécessairement à survivre dans l'environnement où elles sont introduites, celui-ci possédant ses propres caractéristiques, potentiellement différentes de celles de l'environnement d'origine. La survie des plantes à ce stade dépend de plusieurs facteurs qui permettront de passer la barrière des conditions environnementales (Figure 3) (Monty & Mahy, 2009). Le premier facteur concerne la pression de propagules (Lockwood *et al.*, 2005) qui tient compte du nombre de propagules

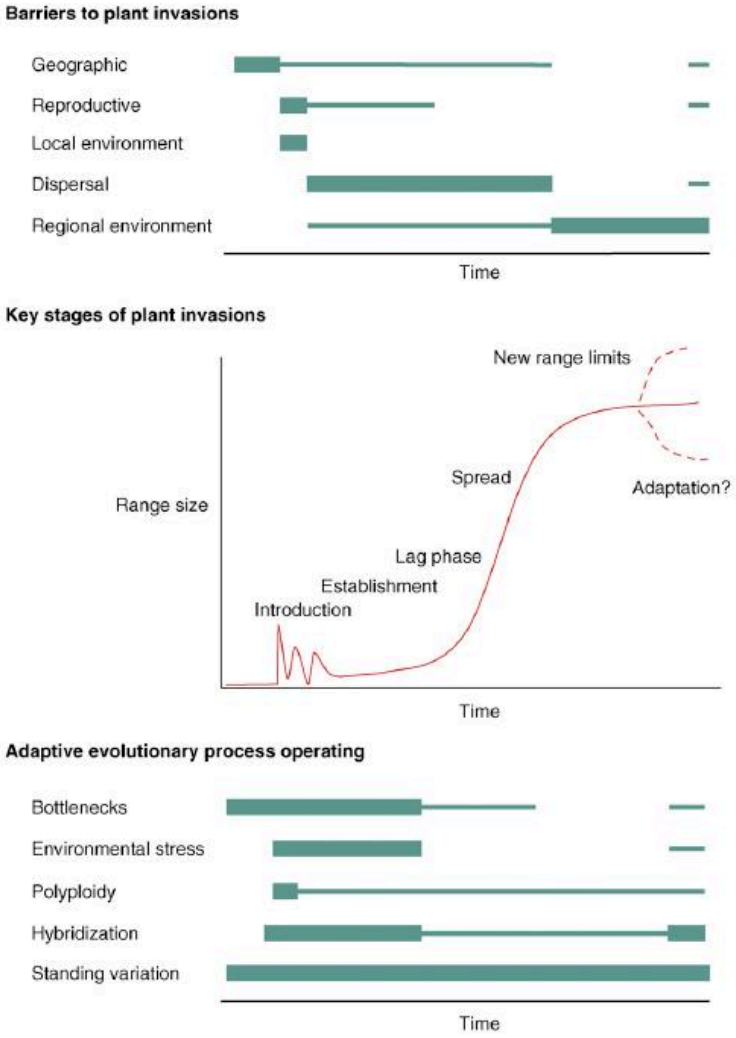


Figure 3 : Processus évolutif durant les différentes étapes de l'invasion (Prentis *et al.*, 2008).

Les étapes clés de l'invasion biologique par les plantes peuvent être mises en regard des changements dans la taille de l'aire de répartition (graphique au centre) ou en parallèle des barrières que ces espèces doivent surmonter pour devenir invasives (en haut). Les barrières à l'invasion prédisposent les plantes à un certain type de changement évolutif à différentes étapes de l'invasion. Décrypter ces mécanismes est crucial pour comprendre l'adaptation des plantes invasives. L'adaptation rapide à partir de la variation génétique se déroule à chaque étape de l'invasion, mais les autres processus évolutifs seront plus importants à certaines étapes spécifiques. Les goulets d'étranglement sont susceptibles d'être particulièrement importants au cours des étapes d'introduction et d'établissement en raison des effets fondateurs et de l'isolement de la population après une dispersion impliquant de grandes distances. Les changements évolutifs induits par de nouveaux concurrents, pathogènes, ennemis naturels ou stress abiotiques sont plus susceptibles de se produire pendant l'introduction et l'expansion. La polyploïdie peut bénéficier aux plantes durant le début de l'invasion si les individus ayant des niveaux de ploïdie plus élevés sont plus compétitifs ou de meilleurs colonisateurs que les diploïdes. L'hybridation peut avoir des impacts immédiats sur le potentiel invasif des néo-allopolyploïdes en fixant la vigueur hybride, mais ils peuvent aussi être importants pour l'établissement et l'expansion si l'introgression et la ségrégation favorisent la colonisation de nouveaux environnements. Notez que le succès ou le déclin soudain des plantes invasives peut également être causé par l'évolution adaptative des herbivores, des pollinisateurs, des symbiotes fongiques ou des plantes concurrentes.

de départ, ainsi que du nombre introductions successives. Le second facteur est dû au fort goulet d'étranglement ou « bottleneck » que subissent généralement les plantes de par le faible effectif de départ introduit ce qui diminue la variabilité génétique (Genton, 2005). Ainsi, des introductions répétées participent au maintien d'une variabilité génétique. Les conditions climatiques de l'aire d'introduction sont également un autre facteur important du succès de la colonisation. Il a été montré qu'une plante, possédant une répartition géographique large dans son habitat d'origine, a plus de chances de survivre dans un nouvel habitat du fait de sa tolérance à divers climats (Theoharides & Dukes, 2007).

2.3.Établissement

Une fois installé avec une population suffisamment stable, l'organisme s'il veut perdurer dans ce nouvel environnement doit surmonter les barrières environnementales et reproductives. Un des premiers filtres est la présence d'autres organismes et notamment d'autres plantes avec qui la plante introduite va être en compétition (Theoharides & Dukes, 2007) (Figures 2 et 3). Ainsi, dans les milieux riches en biodiversité, la compétition entre espèces peut limiter la densité et l'impact des espèces introduites (Alpert *et al.*, 2000). Cette compétition se déroule à plusieurs niveaux. Tout d'abord au niveau des ressources présentes dans le milieu, la plupart des plantes invasives sont avantagées lorsque le taux de ressources est important (Alpert *et al.*, 2000). Il existe aussi une compétition pour la pollinisation. En effet, il a été démontré que la présence de pollen de l'espèce invasive *Lythrum salicaria* pouvait avoir un impact négatif sur la reproduction de l'espèce native *Lythrum alatum* en réduisant significativement le nombre de visites des fleurs par les pollinisateurs et ainsi le nombre de graines produites (Brown and Mitchell, 2001). Stiers *et al.* (2014) montrent également que la présence de *Ludwigia grandiflora*, plante aquatique invasive, affecte la visite d'autres plantes natives par les pollinisateurs. La phase d'établissement correspond au temps d'attente avant l'expansion de la plante invasive, appelée aussi « *lag* » phase. Par exemple, le temps de latence du roselin familier (passereau) (*Carpodacus mexicanus*) serait dû à une faible probabilité de trouver un partenaire, c'est-à-dire l'effet Allee[1] (Genton, 2005).

[1] L'effet Allee est défini comme une corrélation entre la taille d'une population et son taux de croissance (valeur sélective d'un individu). Cet effet peut être dû à : la réduction de la probabilité de rencontre de partenaires sexuels, ce qui réduit le nombre de descendants produits. À l'inefficacité de l'optimisation de l'environnement, par exemple des espèces en densité suffisante peuvent modifier les propriétés physicochimiques de leur environnement et améliorer leur survie. Et enfin, à la perte des bénéfices des interactions entre organismes avec par exemple, chez les plantes, la capacité à détecter la présence d'un prédateur par la production de composés des plantes consommées (Angulo *et al.*, 2018).

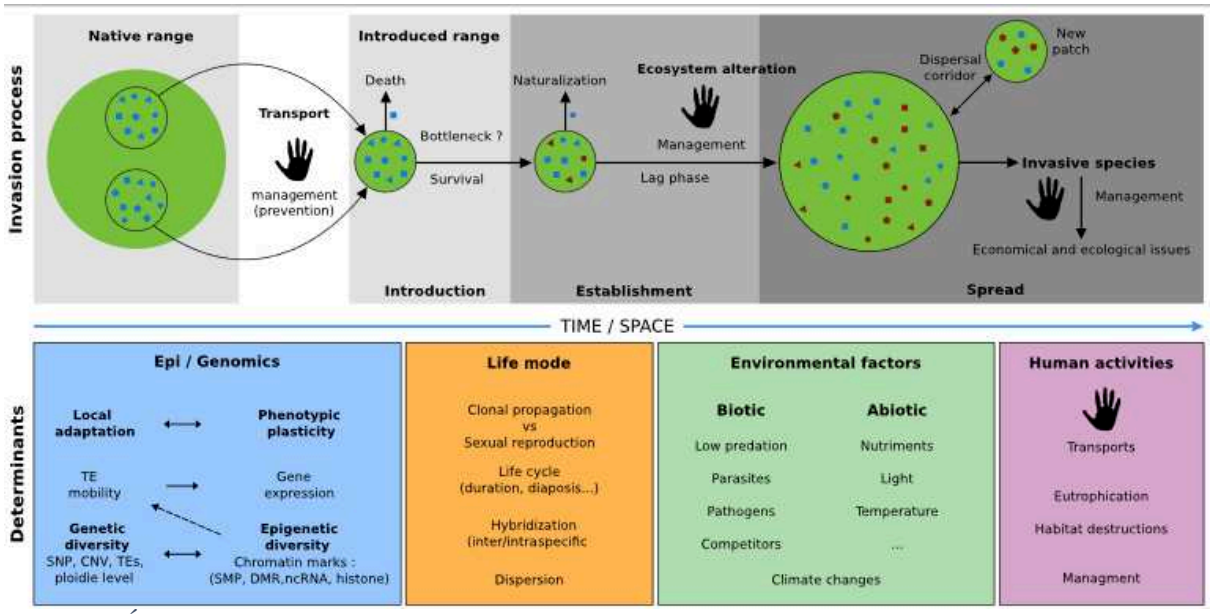


Figure 4 : Étape du processus d'invasion et les facteurs clés intervenant durant l'invasion qu'ils soient épi/génétiques, liés au mode de vie, environnementaux et liés aux activités humaines (Marin/Genitoni *et al.*, 2019).

Une espèce dans son aire native est transportée dans un environnement nouveau (fond gris) souvent par le biais d'activités humaines, volontairement ou non. La diversité génétique (forme : carré, rond triangle) est reconnue comme faible dans l'aire d'introduction. L'installation de cette nouvelle population peut être facilitée par des introductions répétées (pression de propagules). Un goulet d'étranglement peut avoir lieu et mener à la disparition de l'espèce introduite. Les organismes qui survivent peuvent avoir des diversités génétiques (forme : carré, rond triangle) et épigénétiques (couleur : bleu ou rouge) différentes des populations de l'aire native. Certaines espèces peuvent être naturalisées alors que d'autres vont continuer leur expansion et devenir invasives. Il y a une expansion incontrôlée avec une sélection des variants génétiques et épigénétiques les plus performants dans un environnement donné. Des mécanismes génétiques et épigénétiques peuvent modifier l'expression des gènes et ainsi les capacités d'adaptation locale et la plasticité phénotypique. Les caractéristiques des organismes sont également importantes pour le succès des invasions biologiques, comme le cycle de développement, le type de multiplication, notamment végétative, la possibilité d'hybridation (forme combinée) et les capacités de dispersion peut favoriser l'installation de la population dans un nouvel environnement. Les facteurs environnementaux, biotiques et abiotiques représentent la sensibilité des écosystèmes. L'absence de prédateurs et compétiteurs dans l'aire d'introduction, appelé « enemy release hypothesis » (ERH) et son corollaire « evolution of increased competitive ability (EICA), tout comme la présence de niches écologiques vides peuvent en partie expliquer le succès des invasions biologiques. Enfin, les activités humaines sont des facteurs clés du succès ou de l'échec d'une invasion.

Cette phase peut, comme chez la plante invasive *Ageratina adenophora,* durer des dizaines d'années (1940-1960) (Wang & Wang, 2006). La *Lag* phase est plus ou moins longue et reliée au nombre de nouvelles introductions qui peuvent se produire, ainsi que par des phénomènes évolutifs (Monty & Mahy, 2009). Certains organismes s'établissent et sont alors considérés comme naturalisés, c'est-à-dire faisant partie prenante de l'écosystème.

2.4.Expansion

D'autres espèces vont cependant continuer à se développer et engendrer des problèmes écologiques, en prenant la place d'espèces natives, et problèmes économiques par la perturbation des activités humaines. On parle alors d'invasion biologique (Figure 4). Williamson & Fitter, (1996) énoncent dans le cadre des invasions biologiques ce qu'on appelle la règle des 10. Ainsi, parmi les espèces transportées dans une nouvelle région, seulement 10% s'y introduisent, les autres ne survivant pas. Parmi les survivantes, encore 10% s'y établissent, et encore 10% de ces espèces installées deviennent invasives. En d'autres termes, il y a une espèce qui deviendra invasive pour 1000 espèces introduites dans un environnement nouveau. Ces pourcentages sont évidemment théoriques et Williamson & Fitter, (1996) précisent qu'ils peuvent varier entre 5 et 20%.

3. Caractéristiques des plantes invasives et sensibilité des écosystèmes

Des études ont tenté de mettre en évidence les aptitudes permettant à un organisme de passer les différentes barrières du processus d'invasion et ainsi participer à la réussite de l'invasion (Rejmanek and Richardson, 1996; Helv *et al.*, 2002; Zedler *et al.*, 2004; Cadotte *et al.*, 2006; Pyšek and Richardson, 2007; Schmidt and Drake, 2011). Parmi ces caractéristiques, une aptitude à la multiplication végétative, une croissance rapide, une forte plasticité phénotypique, l'allélopathie ou la polyploïdie semblent jouer un rôle important. Une plante qui accumulerait ces caractéristiques constituerait l'invasive parfaite. Celle-ci est évidemment théorique.

3.1.Caractéristiques des plantes invasives

3.1.1. Système de reproduction

Ainsi, la plante invasive idéale a un système de reproduction mixte, combinant la reproduction sexuée et de la multiplication végétative. Une plante ayant une capacité reproductive sexuée élevée produira davantage de graines qui sont autant d'individus possibles (Lake & Leishman, 2004). Alpert *et al.* (2000), ajoutent qu'un temps de génération court et une longue viabilité de graines peuvent jouer sur le potentiel invasif d'une plante. En outre, certaines plantes sont capables d'autofécondation et d'apomixie qui permettraient de faciliter l'établissement d'un faible nombre d'individus évitant ainsi l'effet Allee (Genton, 2005). En effet, le faible nombre d'individus possible lors de l'introduction d'une espèce dans un nouvel environnement diminue la probabilité de pouvoir se reproduire par voie sexuée pour des espèces allogames. De même qu'une période de floraison longue permet d'augmenter les chances de rencontres entre le pollen et le stigmate (Alpert *et al.* 2000; Lake & Leishman 2003; Genton 2005). La multiplication végétative est une capacité courante chez les plantes invasives. La multiplication végétative est un processus rapide et présentant un coût énergétique plus faible que la reproduction sexuée (Lake & Leishman, 2003) ce qui permet une expansion rapide, notamment lorsqu'il y a une perturbation du niveau de ressources. La multiplication végétative a aussi des inconvénients. En effet, elle produit des clones identiques, à la mutation soma clonale près. Ainsi, si une maladie apparait toutes les plantes seront alors touchées. La multiplication végétative peut contourner l'effet Allee et donc donner un avantage pour la plante invasive (Lake &Leishman, 2003).

Les plantes, étant immobiles, ont mis en œuvre d'autres stratégies visant à favoriser leur expansion. L'une d'elles consiste à se reproduire par voie sexuée en produisant des graines qui pourront être transportées. Pour cela, les plantes utilisent des vecteurs de dispersions, comme le vent, l'eau, les humains, les animaux, etc.(Davies & Sheley, 2007). Il existe plusieurs stratégies de dispersion, comme produire des fruits attirants, charnus et comestibles qui pourront ainsi être dispersés par le consommateur (Humains, animaux, insectes). Ainsi, Vilà and D'Antonio, (1998), montrent que les fruits de la plante invasive *Carpobrotus edulis* sont davantage consommés et donc dispersés que ceux de l'espèce native *Carpobrotus chilensis.* Ces différentes stratégies de

dispersion sont importantes à prendre en compte dans la réussite de l'invasion, car elles influent la vitesse d'expansion (Genton, 2005). Comprendre ces stratégies pourra servir à mettre en place des solutions visant à éviter l'invasion (Davies & Sheley, 2007).

3.1.2. Croissance et développement

La vitesse de croissance est un élément important. Une plante ayant une croissance importante pourra atteindre la lumière plus rapidement et se reproduire plus vite, ce qui peut lui donner un avantage certain pour envahir les écosystèmes (Genton, 2005). La surface foliaire est corrélée positivement à la croissance. Ainsi, plus une plante a une surface foliaire importante, plus elle pourra croitre rapidement et subvenir facilement à ses besoins. Lake & Leishman (2003), ont étudié les réponses de trois classes d'espèces (native, exotique, exotique invasive) selon différents sites perturbés par la quantité de ressources et d'eau ou par la présence d'herbivores. Ils ont notamment démontré que les plantes invasives avaient une surface foliaire plus grande que les natives ce qui pourrait expliquer une plus grande compétitivité.

3.1.3. Allélopathie

Parmi les caractéristiques des plantes invasives, on trouve aussi la capacité de produire des métabolites qui pourront avoir un impact négatif sur les compétiteurs (plantes, microorganismes) : c'est ce qu'on appelle l'Allélopathie[2]. Certains de ces composés inhiberaient la germination et la croissance des compétiteurs potentiels (Zedler *et al.*, 2004). Par exemple, *Allaria petiolata* ou herbe à ail, espèce envahissante aux USA, excrète des glucosinolates phytotoxiques (allyl isothiocyanate, benzyl isothiocyanate, et glucotropaeo-lin ce qui perturbe l'association entre certains arbustes et champignons mycorhiziens (Stinson *et al.*, 2006). Ceci augmente sensiblement la mortalité des arbustes et permet à l'*Allaria petiolata* de se développer plus aisément (Theoharides & Dukes, 2007).

[2] L'allélopathie fait référence aux phénomènes biochimiques d'interaction entre organismes et en particulier les plantes. Les organismes interagissent en excrétant des composés dans l'environnement qui peuvent avoir un effet positif ou négatif sur les autres espèces. L'allélopathie est souvent citée comme jouant un rôle dans la réussite des invasions biologiques chez les plantes (Bao-Ming Chen *et al.*, 2017)

3.2.Sensibilité des écosystèmes à l'invasion

Toutes les invasions ne sont pas expliquées par les aptitudes des espèces invasives. Si les plantes invasives peuvent perturber l'habitat, c'est surtout un habitat perturbé qui favoriserait l'invasion (Meerts *et al.*, 2004; Zedler *et al.*, 2004). Tous les écosystèmes ne montrent pas la même sensibilité à une invasion[3]. Ainsi, Zedler *et al.* (2004), soulignent que les zones humides représentent moins de 6 % de la surface terrestre et que 33 des 100 organismes les plus invasifs sont des plantes. Parmi elles, 24% (8/33) sont des espèces de zones humides ce qui pose question quant à la vulnérabilité importante de ces écosystèmes. Plusieurs perturbations peuvent engendrer une fragilisation de l'écosystème et favoriser l'invasion (Genton, 2005). Il s'agit de l'eutrophisation du milieu, de la destruction d'une partie de la flore locale, de la fragmentation de l'écosystème et du réchauffement climatique. En outre, certains écosystèmes possèdent certaines prédispositions à l'invasion par exemple l'absence de pathogène ou l'existence de niches vides.

L'homme, par ses activités telles que l'agriculture, la déforestation (volontaire ou non), ou la construction de routes va perturber les écosystèmes et les rendre plus vulnérables. Ainsi, l'utilisation d'engrais dans l'agriculture engendre l'eutrophisation des cours d'eau, causés par un apport excessif d'azote et de phosphore causant la prolifération d'algues et de plantes invasives (Alpert *et al.*, 2000; Meerts *et al.*, 2004; Bradley *et al.*, 2009).

La déforestation peut, par exemple, entraîner un apport plus important de lumière. Des plantes potentiellement invasives qui en avaient très peu vont alors pouvoir se développer plus vite (Alpert *et al.*, 2000; Bradley *et al.*, 2009). Cela peut aussi avoir pour conséquence de diminuer la consommation des ressources présentes dans les sols. Ce sont autant de nutriments que des plantes invasives pourront alors utiliser (Meerts *et al.*, 2004; Theoharides & Dukes, 2007; Pearson *et al.*, 2018). Ainsi, Gómez *et al.* (2019) montrent que préserver la canopée de la forêt Maulino en Chine permet de réduire les risques d'invasions par l'espèce de pin invasif *Pinus radiata.*

[3] La vulnérabilité d'un écosystème à l'invasion est définie en anglais sous le terme « invasibility ». Terme à ne pas confondre avec « invasiveness » qui correspond à la capacité d'une espèce à envahir un écosystème(Theoharides & Dukes, 2007).

Les plantes natives et leurs prédateurs (bactéries, champignons, nématodes, herbivores …) ont co- évolué. Les pathogènes sont donc souvent spécialisés pour un type de plante. Une plante invasive nouvellement arrivée serait donc moins sujette aux attaques de pathogènes. C'est ce que les chercheurs ont appelé l'hypothèse ERH : Enemy Release Hypothesis[4] (Meerts *et al.*, 2004; Zedler *et al.*, 2004; Theoharides & Dukes, 2007; Monty & Mahy, 2009). Les plantes invasives ne subissent alors que la pression des prédateurs dits généralistes, ce qui leur confère un avantage sur les plantes natives. C'est ce que Genton (2005), appelle « l'avantage de l'étranger ». Meijer *et al.* (2016) ont mené une synthèse et une méta-analyse de 68 études sur l'hypothèse ERH chez les plantes. Ils montrent que le nombre d'insectes et leur diversité sont plus importants chez les espèces natives en comparaison des espèces non natives. En revanche, il n'y a pas de différences significatives concernant l'herbivorie. Liu & Stiling, (2006) concluaient leur méta-analyse de manière identique, mais montraient des différences concernant l'herbivorie, avec une consommation plus importante des espèces natives. L'ERH participe à la réussite des invasions, mais n'est pas l'unique facteur.

Certains écosystèmes ont des prédispositions à l'invasion, car ils possèdent des niches écologiques vides. Ces dernières font référence à la position d'un organisme dans l'écosystème, c'est-à-dire les relations avec les autres organismes et le milieu. Ainsi, dans un écosystème perturbé ou pauvre en biodiversité avec des niches écologiques vacantes, l'espèce introduite a alors tout le loisir de se développer sans subir de compétiteur (Genton, 2005).

4. Impacts de l'invasion sur les écosystèmes et leur gestion

4.1. Conséquences des invasions

Les espèces invasives peuvent avoir des impacts importants d'abord au niveau écologique, mais aussi sur les activités humaines et sur la santé (Zedler *et al.*, 2004; Ehrenfeld, 2010; Pyšek & Richardson, 2010; Vilà *et al.*, 2011).

[4] L'hypothèse Enemy Release Hypthesis (ERH) fait référence chez les plantes à la diminution de la pression exercée par des prédateurs lorsqu'une espèce est introduite dans un environnement nouveau, car ses ennemis naturels ne sont pas présents. Cette hypothèse est basée sur trois postulats que sont : la régulation d'une population de plante par ses consommateurs, les consommateurs de l'aire d'introduction ont un impact plus grand sur les espèces natives que sur les espèces invasives, et enfin les plantes sont capables suite à l'absence de régulation d'augmenter la croissance de leur population (Keane and Crawley, 2002).

Tableau 1. Exemples des différents types d'impacts des plantes invasives sur la santé humaine et sur les activités humaines

D'après le tableau de Pyšek & Richards, (2010). Le tableau d'origine ajoute les animaux et le type d'environnement.

Type of impact	**Plants**
I. Cause or vector of humans diseases or ailment	*Ailanthus altissima* (long exposure to sap can cause myocarditis), Robinia pseudoacacia (toxins in flowers and seed provoke gastro enteritis)
II. Causes injuries	*Cortaderia selloana*, *Spartina anglica* (cuts by leaves) *Caesalpinia decapetala, Rosa rugosa* and many others species (thorny thickets)
III. Causes allergies	*Acacia dealbata* , *Cortaderia selloana* (pollen allergy), *Ailanthus altissima* (dermatitis), *Ambrosia artemisiifolia* (pollen allergy, dermatitis), *Heracleum mantegazzianum* (dermatitis),*Schinus terebinthifolius* (flu-like symptoms, sneezing, sinus congestion)
IV.Accumulation of toxins and their transfer to human food	*Rhododendron ponticuma* (poisonous honey can cause cardiac problems),*Echium plantagineum* (high concentrations of pyrrolizidine causes honey made exclusively from this species to be toxic
V.Impedes recreational activities and tourism	*Spartina anglica, Heracleum mantegazzianum, Rosa rugosa* (forming impenetrable stands), *Eichornia crassipes* and many other aquatic weeds (cover water bodies, impeding recreation and transport)
VI. Aesthetic impact, deterioration of the quality of environment	*Seiridium cardinale* (tree-killing fungus), *Codium fragile* subsp. *Tomentosoides* (rotting branches on beaches cause offensive septic-smelling methane gas)

Les impacts écologiques peuvent être directs par l'utilisation des ressources par les organismes invasifs qui vont alors entrer en compétition avec les espèces dites natives. Cela peut affecter la biodiversité et mener in fine à des extinctions d'espèces (Gaertner *et al.*, 2009; Pyšek & Richardson, 2010; Gallardo *et al.*, 2016). Il est difficile d'évaluer les impacts sur l'écosystème, car il faut comprendre le fonctionnement de ce dernier qui est complexe, notamment pour les écosystèmes aquatiques (Havel *et al.*, 2015; Gallardo *et al.*, 2016). En outre, Winter *et al.* (2009) ont étudié la diversité taxonomique et phylogénétique dans 23 pays ou régions d'Europe. Ils montrent qu'il y a plus d'entrées d'espèces en Europe que d'extinctions d'espèces natives. Il en résulte une augmentation de la diversité taxonomique, autrement dit du nombre d'espèces, mais une diminution de la diversité phylogénétique. Ainsi, l'utilisation de plusieurs indicateurs est importante pour conclure sur l'impact des invasions biologiques sur la biodiversité.

Les plantes invasives perturbent l'écosystème directement. Liao *et al.* (2008), ont mené une méta-analyse de 94 études avec 20 variables en rapport avec les cycles du carbone et de l'azote en réponse à l'invasion par les plantes. Ils montrent que ces cycles ont été altérés par les invasions conduisant par exemple à une augmentation du stockage de carbone de 5% dans les racines et 133% dans les tiges. La production primaire et la décomposition des déchets ont également augmenté de 50 et 120 % dans les milieux envahis. Les espèces invasives peuvent impacter les interactions entre les organismes pollinisateurs et les plantes natives (Chittka & Schürkens, 2001; Traveset & Richardson, 2006). Comprendre les impacts des espèces invasives permet de mieux prédire leur dynamique, mais également de mieux gérer ces invasions.

Les invasions biologiques impactent également les humains et leur activité de manière négative. En effet, les espèces invasives comptent parmi leurs membres, des pathogènes qui peuvent être responsables de maladies, qui vont engendrer un coût humain et financier (Pyšek & Richardson, 2010). Les plantes ne sont pas exemptes de ces problématiques et peuvent provoquer, blessures, allergies et maladies. En effet, comme le montrent Pysek & Richardson (2009), dans le tableau 1, une exposition prolongée aux espèces invasives *Ailanthus altissima* et à *Robinia pseudoacacia* peut causer respectivement des myocardites et des gastro-entérites par la production de toxines dans les fleurs et les graines. En France, l'ambroisie à feuilles d'armoise (*Ambrosia artemisiifolia*) et la berce du Caucase

(*Heracleum mantegazzianum*) sont reconnues comme responsables de nombreuses allergies (Chauvel & Martinez, 2013).

L'invasion des milieux par les plantes engendre également la perturbation des activités économique et récréative humaines que sont le tourisme, la pêche, etc. (Pejchar & Mooney, 2009; Pyšek & Richardson, 2010). Plusieurs études ont tenté d'estimer le coût financier représenté par les espèces invasives (Pyšek & Richardson, 2010; Vilà *et al.*, 2011). À titre d'exemple, en 1993 un rapport américain (Food) estimait à près de 97 milliards le coût global de 79 espèces invasives de 1906 à 1991 (1.1 milliard par an) aux États-Unis. Pimentel *et al.* (2001) mettent à jour ces chiffres, en prenant en compte davantage d'espèces invasives, avec près de 120 milliards par an.

4.2.Gestion des écosystèmes envahis

En raison de l'impact des plantes invasives sur l'environnement et les activités humaines, les gouvernements des différents pays ont mis en œuvre des programmes de lutte notamment en Australie et en Nouvelle-Zélande en faisant appel à des méthodes (1) de prévention (2) de détection et (3) d'éradication (Pyšek & Richardson, 2010).

La prévention (1) est le moyen le plus efficace pour lutter contre les espèces invasives. Il est possible d'adopter des lois interdisant l'importation de certaines espèces. Ceci implique la mise en place d'un contrôle des importations (Lefeuvre, 2006). Ainsi la création de conseil et d'initiative nationale va dans ce sens comme le témoigne le rapport « *Council Conclusions on a mid-term assessment of implementing the EU Biodiversity Action Plan and Towards an EU Strategy on Invasive Alien Species* » ou la création en Australie de l'Australian Weeds Strategy (Pyšek and Richardson, 2010).

La surveillance (2) des différents écosystèmes susceptibles d'être envahis peut permettre de détecter plus tôt l'invasion et ainsi de pouvoir l'éviter en choisissant une stratégie adaptée. Si l'invasion a été détectée assez tôt, une éradication est envisageable. Dans le cas contraire, il faudra alors contrôler l'invasion. Plus l'éradication débute tôt plus les coûts de main-d'œuvre et donc de gestion seront faibles (Rejmánek, 2000). Parmi les mécanismes de détection, la recherche scientifique sur les mécanismes qui font la réussite d'une invasion biologique est importante. En effet, si on peut prédire les écosystèmes les plus sensibles et les organismes les plus invasifs, la gestion des écosystèmes

est également primordiale, en limitant par exemple les vecteurs de l'invasion (vecteur de transport) ou en restaurant ces derniers. Ces actions peuvent permettre d'éviter l'invasion ou de limiter son expansion ou ses impacts (Pyšek & Richardson, 2010).

Enfin, une fois l'espèce invasive installée, la solution de gestion est l'éradication (3). (Rejmanek & Pitcairn, 2002) ont montré dans des études réalisées entre 1972 et 2000 et concernant 18 espèces et 53 évènements d'invasions que l'éradication avait été possible. En outre, ils précisent que celle-ci a été efficace pour 1/3 des invasions lorsque les espèces invasives couvraient entre 1ha et 100 ha, mais seulement ¼ des invasions ont été éradiquées lorsqu'elles s'étendaient entre 101 ha et 1000ha. Ainsi plus l'étendue de l'invasion est grande, plus la probabilité d'éradication est faible et plus les coûts augmentent. Il peut également y avoir des conflits dans la gestion des espèces invasives, notamment concernant les animaux (Estévez *et al.*, 2015; Crowley *et al.*, 2017). En effet, c'est le cas du chat parfois invasif dont la cote de popularité auprès du public rend la gestion difficile (Clarke & Pacin, 2002; Nogales *et al.*, 2013). Aux États-Unis, l'utilisation de pesticides pour gérer une plante invasive peut engendrer des oppositions fortes de la population comme ça a été le cas pour la gestion de la plante invasive *Centaurea stoebe* en Californie (Norgaard, 2007).

Il existe plusieurs méthodes d'éradication des plantes invasives, mais le plus souvent ces méthodes ne permettent que d'atténuer leurs impacts en les contrôlant (DiTomaso, 2000). On peut citer par exemple, la lutte biologique[5] et l'utilisation de produits chimiques (Ta *et al.*, 2017). Le gastéropode *Lymnaea stagnalis* peut être utilisé comme lutte biologique, car il consomme les élodées notamment *Elodea nuttallii*, faisant ainsi diminuer son expansion, ils ne sont en revanche pas d'une efficacité suffisante, mais peuvent être utilisés en complément d'une autre méthode de lutte (Boiché *et al.*, 2011). En outre, l'utilisation de produits chimiques, tels que les herbicides, n'est pas autorisée en France dans les milieux aquatiques et humides.

[5] La lutte biologique est une méthode de lutte qui consiste à utiliser un organisme vivant pour lutter contre des espèces nuisibles, comme des ravageurs, maladies ou espèces invasives.

D'autres méthodes concernent plus spécifiquement les plantes aquatiques, comme l'assec[6], qui consiste à vider l'eau pour éradiquer les espèces aquatiques invasives ou l'arrachage manuel ou mécanique (Zehnsdorf *et al.*, 2015; He *et al.*, 2019).

II. La jussie, plante aquatique invasive

Les milieux aquatiques n'ont été que peu étudiés jusqu'à récemment, pourtant ce sont des écosystèmes particulièrement sensibles aux invasions notamment celles engendrées par les plantes aquatiques. En effet, le commerce de plantes aquatiques d'ornement pour les étangs et aquariums est une des causes d'introduction d'espèces potentiellement invasives. En Europe, 30 familles botaniques ont été identifiées dans 46 pays européens correspondant à 96 plantes aquatiques invasives. La France est, avec l'Italie, le pays qui compte le plus grand nombre d'espèces aquatiques invasives avec 34 espèces invasives contre 27 pour l'Allemagne et 26 pour la Belgique et la Hongrie (Hussner, 2012). La commission européenne a d'ailleurs publié une liste des espèces invasives préoccupantes (http://especes-exotiques-envahissantes.fr/wp-content/uploads/2019/08/liste_rue_eee_25-juillet-2019.pdf) (Annexe 1). Parmi elles on compte le « Myriophylle du Brésil » *Myriophyllum aquaticum (Vell.) Verdc.* l'hydrocotyle fausse renoncule (*Hydrocotyle ranunculoides L.f.)* et *Ludwigia spp.* communément appelées les jussies.

1. Histoire de l'invasion des Ludwigia en France

Le terme jussie désigne en France deux espèces appartenant au genre Ludwigia, *Ludwigia peploides (Kunth) Raven ssp. montevidensis (Spreng.) Raven* et *Ludwigia grandiflora (Michaux) Greuter and Burdet ssp.hexapetala*, raccourcies *Ludwigia peploides* et *Ludwigia grandiflora*, toutes deux originaires d'Amérique du Sud (Ruaux, 2008; Thouvenot, 2012).

Elles sont aujourd'hui réparties dans de nombreux pays et sont notamment considérées comme invasives aux États-Unis et en Europe. Elles ont été introduites en France au 19e siècle pour servir de plante d'ornement dans les aquariums et étangs. Observées dans la rivière le Lez à Montpellier dès 1830,

[6] L'assec est l'état d'une rivière ou d'un étang se retrouvant sans eau

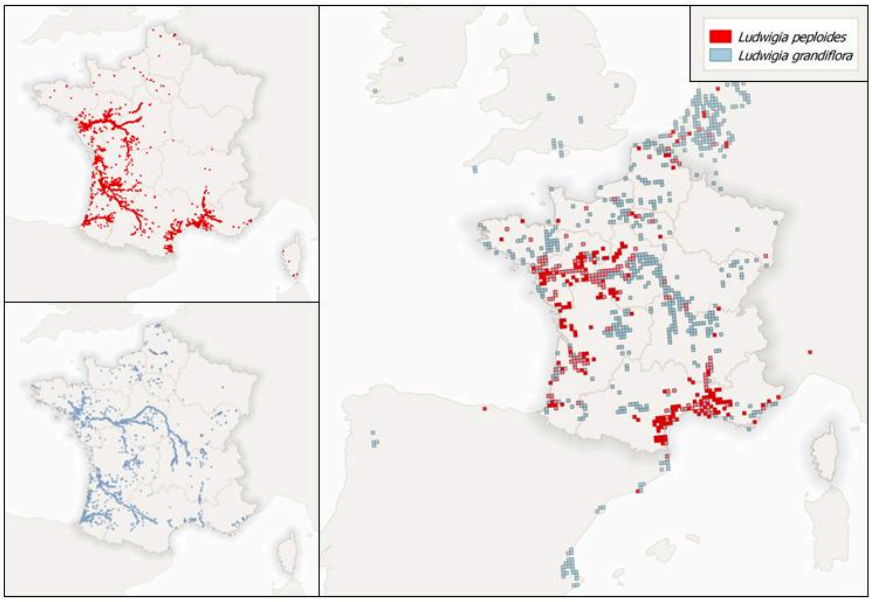


Figure 5 : État des connaissances actuelles sur la distribution de *Ludwigia grandiflora* et *Ludiwigia peploides* en France.

Données d'observations issues du réseau des Conservatoires botaniques nationaux et de leurs partenaires, à gauche (SIFlore, 2019) et à droite des données d'observations maillées issues d'*European Alien Species Information Network*, mai (EASIN, 2016) d'après le rapport stratégie nationale de gestion relative aux jussies exotiques, 2019.

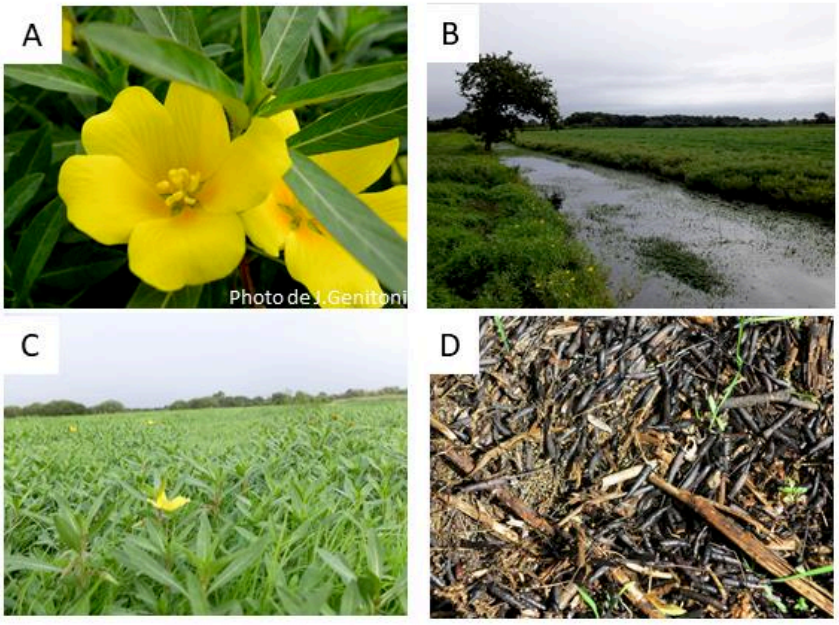


Figure 6 : Les différents organes et formes de *Ludwigia grandiflora* ainsi que les deux habitats du Marais de Mazerolles

A. Fleur de *Ludwigia grandiflora.* B. Douve du Marais de Mazerolles avec le développement de la forme aquatique au mois de septembre. C. Prairie humide du Mazerolles au mois de septembre avec la forme terrestre de *L. grandiflora. D.* Capsules jonchant le sol, produites par *L. grandiflora* suite à la reproduction sexuée (Photo Genitoni Julien).

elles colonisent rapidement les cours d'eau environnants. On note également sa présence, due à d'autres introductions, à Bayonne en 1883 puis à Bordeaux en 1919 (Dandelot, 2004). Les deux espèces sont aujourd'hui réparties sur une grande partie du territoire français (Figure 5). Toutefois, *L. peploides* est localisée principalement sur le pourtour méditerranéen alors que *L. grandiflora* se distribue de manière plus large et notamment dans l'ouest de la France (Dandelot *et al.*, 2005). Un arrêté interministériel du 2 mai 2007 interdit la commercialisation, l'utilisation et l'introduction dans le milieu naturel de *Ludwigia grandiflora* et *Ludwigia peploides*. Aujourd'hui, la jussie a colonisé de nombreux pays en Europe, tels que l'Allemagne, la Belgique, l'Espagne, l'Italie, l'Irlande, la Suisse, ou encore les Pays-Bas (Nehring and Kolthoff, 2011)

2. Caractéristiques de la jussie

Les Jussies sont des plantes hydrophytes amphibies appartenant à l'ordre des Myrtales et la famille des Onagraceae d'après la classification APG III (Thouvenot *et al.*, 2013a ; Thouvenot *et al.*, 2013b). Reconnaissables à leurs fleurs jaunes le plus souvent à 5 pétales, elles se reproduisent de manière végétative par bouturage essentiellement (Dandelot *et al.*, 2005) (Figures 6). Néanmoins la reproduction sexuée est possible et peut accroitre le potentiel invasif de ces espèces (Ruaux *et al.*, 2009). Elles se développent principalement en eaux peu profondes, stagnantes ou à faible courant tels que les étangs, les marais ou bien les canaux et fossés. Elles tendent également à coloniser les prairies humides (Menozzi, 2007; Lambert *et al.*, 2010) (Annexe 2).

Différencier sur le terrain les deux espèces n'est pas simple. Le critère le plus fiable reste la forme des stipules des tiges émergées. Ainsi, *L. grandiflora* possède des stipules noires et triangulaires tandis que celles de *L. peploides* sont de couleur brun clair et arrondies (Tableau 2)(Dandelot, 2004; Haury *et al.*, 2014). Ces critères de différenciation peuvent être complétés par d'autres, énumérés par Dandelot (2004) tels que la longueur des sépales ou bien les formes des feuilles à l'aisselle des fleurs. Par ailleurs, *L. peploïdes* est une espèce diploïde (2n=16) et *Ludwigia grandiflora* une espèce décaploïde (10n=80).

Tableau 2. Caractéristiques permettant de différencier *L. grandiflora* de *L. peploides*

	Ludwigia peploides	***Ludwigia grandiflora***
Stipules	Arrondis verdâtres à rougeâtres, voire bruns	Triangulaires verdâtres à noirâtres
Tiges	Peu ou pas huileuses	Huileuses collantes
Longueur des stomates	28±3µm	19±2µm
Diamètres des grains de pollen	82±9µm	62±4µm
Niveau de ploïdie	Diploïde (2n=16)	Décaploïde (2n=80)

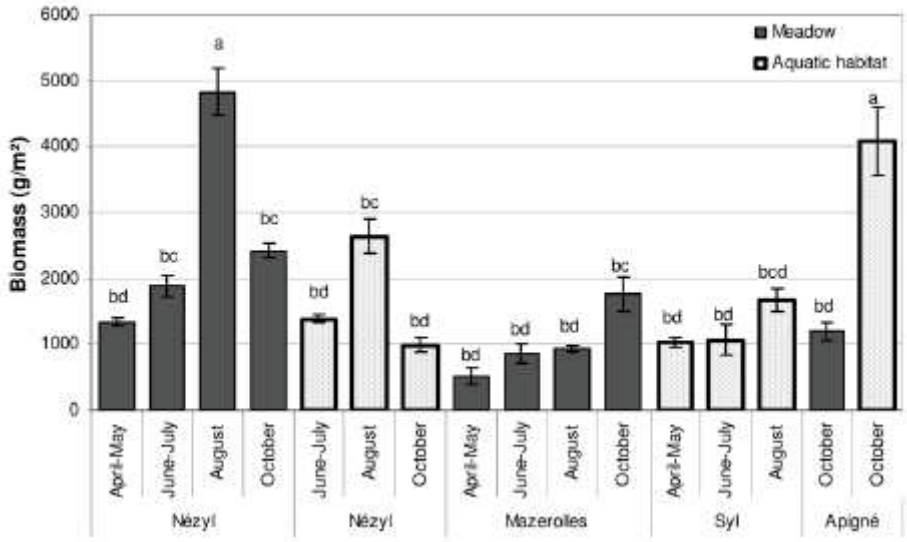


Figure 7 : Variation de biomasses de *Ludwigia grandiflora* (Haury *et al.*, 2014).

Sites de Nézyl, Mazerolles, Syl et Apigné en 2011 dans différents habitats.

Les *Ludwigia* introduites, et notamment *Ludwigia grandiflora* présentent la plupart des attributs favorables aux espèces envahissantes, ce qui peut expliquer leur expansion rapide. Parmi ces caractéristiques on peut citer leur forte croissance et leur capacité à faire de la multiplication végétative ce qui se traduit par une forte production de biomasse. Haury *et al.* (2014), ont mesuré les biomasses concernant *Ludwigia grandiflora* dans différents sites envahis à différentes périodes. Ainsi, dans les étangs d'Apigné (Rennes), cette production de biomasse s'élevait à 2.190 gdw/m^2 (grammes de matière sèche par mètre carré) en 2006 et 4.076 gdw/m^2 en 2011. Les 5 sites étudiés sont présentés dans la figure 7. Ce graphique montre les biomasses produites à différentes périodes selon le type d'écosystème envahi (prairies humides vs milieu aquatique). On constate une production importante de biomasse qui est constante au cours de l'année, variant parfois selon les sites et la période considérée. Enfin, Dandelot *et al.* (2008) mentionnent la possibilité pour la jussie de produire des composés allélopathiques lui permettant d'être plus compétitive et de gêner le développement des espèces natives (Dandelot *et al.*, 2008; Thiébaut *et al.*, 2018). Dandelot *et al.* (2008) ont montré l'impact négatif de l'activité allélopathique de *Ludwigia grandiflora* sur la laitue (*Lactuca sativa*) et le Cresson de fontaine (*Nasturtium officinale*) avec une réduction des pourcentages de germination et une augmentation de la mortalité de *L. sativa*. Enfin, Thiébaut *et al.* (2018) ont comparé le développement de trois espèces de macrophytes (une native, *Ceratophyllum demersum* et deux exotiques*, Egeria densa* et *Myriophyllum aquaticum)* en réaction à un extrait aqueux ou dérivé de racines et de feuilles de *Ludwigia grandiflora.* Trois composés flavonoïdes la quercitrine, la prunine et la myricitrine ont été identifiés dans l'extrait. Ce dernier a eu un effet significatif sur les plantes étudiées, en réduisant par exemple la surface foliaire chez *M. aquaticum* ou en stimulant la croissance des feuilles d'*E.densa*. Les interactions peuvent ainsi être compétitrice ou facilitatrice.

L. grandiflora et *L. peploides* colonisent des milieux variés pouvant aller des milieux aquatiques aux milieux humides (prairies inondables) voire secs (sols sableux) ce qui témoigne d'une forte plasticité phénotypique (Hussner, 2010; Thouvenot *et al.*, 2013a). En outre, durant leur cycle de développement ces deux espèces produisent différents types de feuilles selon qu'elles soient immergées ou émergées, c'est ce que l'on appelle l'hétérophyllie (Kuwabara *et al.*, 2003). En effet, de novembre à

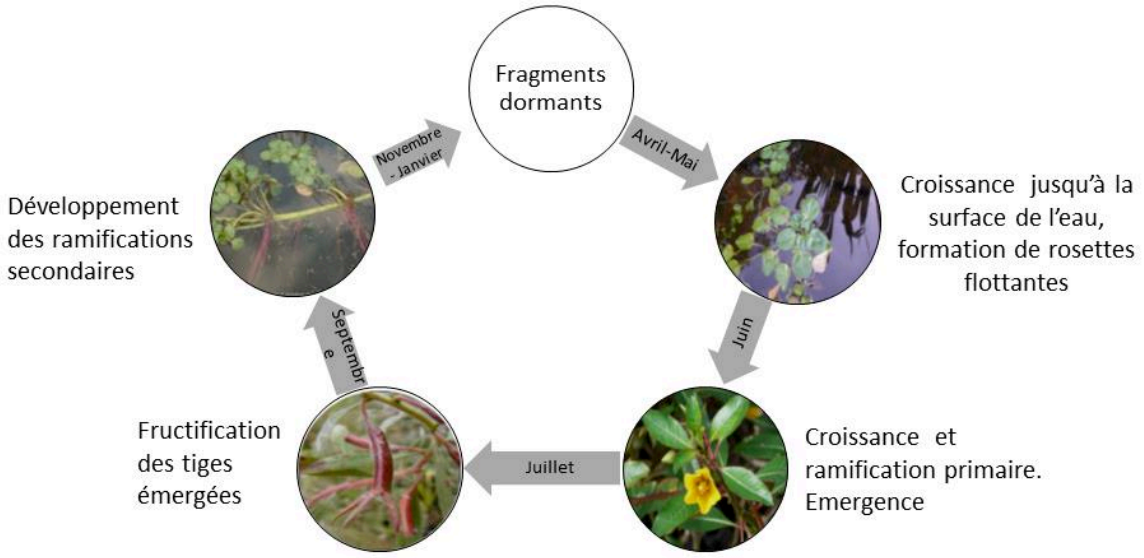


Figure 8 : Cycle de développement annuel de la jussie (d'après Ruaux, 2008 et Dandelot *et al.*, 2008).

La jussie est en état de dormance durant la période hivernale et à partir des tiges souterraines, graines et fragments. Elle reprend sa croissance dès avril. Durant le printemps, elle croit jusqu'à produire des rosettes à la surface de l'eau. Puis à partir de juin, elle produit des tiges érigées qui permettront de juillet à septembre d'effectuer la floraison et la fructification. Enfin, de septembre à novembre, elle continue sa croissance avant de redémarrer un nouveau cycle. Ce cycle est modifié pour les formes terrestres qui subissent une alternance des niveaux d'eau durant l'année. En effet, de novembre à juin la jussie terrestre sera sous l'eau alors que de juin à octobre, elle sera complètement terrestre.

avril, la jussie est en état de dormance dans la vase ou la terre sous forme de rhizomes, puis débute sa croissance en avril-mai. De mai à juin, elle croit jusqu'à la surface de l'eau où elle forme des rosettes flottantes. Puis de juin à juillet, la jussie émerge de l'eau en produisant des tiges érigées qui permettent la floraison et la fructification de juillet à septembre. Enfin, de septembre à novembre, elle continue de croitre et de produire des ramifications secondaires avant que l'hiver annonce sa période de dormance (Figure 8) (Ruaux, 2008).

3. Conséquences sur les écosystèmes et invasion secondaire des prairies humides

3.1. Impacts de la jussie sur les écosystèmes envahis

La jussie affecte fortement les écosystèmes qu'elle colonise. Sa capacité à produire une forte biomasse conduit à une modification des propriétés physico-chimiques du milieu aquatique, avec une diminution de la quantité d'oxygène dans l'eau et une acidification du milieu. Ces conditions anoxiques peuvent nuire au bon développement d'autres espèces aquatiques. En effet, on constate une diminution de la biodiversité faunistique et floristique (Rapport Vuillemenot & Mischler, 2011). Elles excrètent des composés allélopathiques pouvant être toxiques et empêcher le développement d'autres organismes (Dandelot *et al.*, 2008; Thiebault *et al.*, 2018). La croissance importante de *Ludwigia grandiflora* peut bloquer le bon écoulement des eaux et in fine conduire aux comblements des étendues d'eau peu profondes. Tous les impacts cités précédemment nuisent aux activités de pêche et de tourisme conduisant à un impact socio-économique fort (Cahier technique : les jussies des plantes qui envahissent les milieux humides de Camargue : Beck & Thibaut, 2004)

3.2. Gestion de l'invasion

La gestion des invasions représente un coût financier important. En effet, si l'arrachage manuel effectué de mai à juillet de manière répétée est courant chez les Jussies, il ne fait que limiter l'expansion de l'invasion (Delbart *et al.*, 2013). L'arrache mécanique peut être réalisé, mais ce dernier n'est pas spécifique de la plante et peut fragmenter les herbiers de Jussies favorisant leur dispersion (Beck &

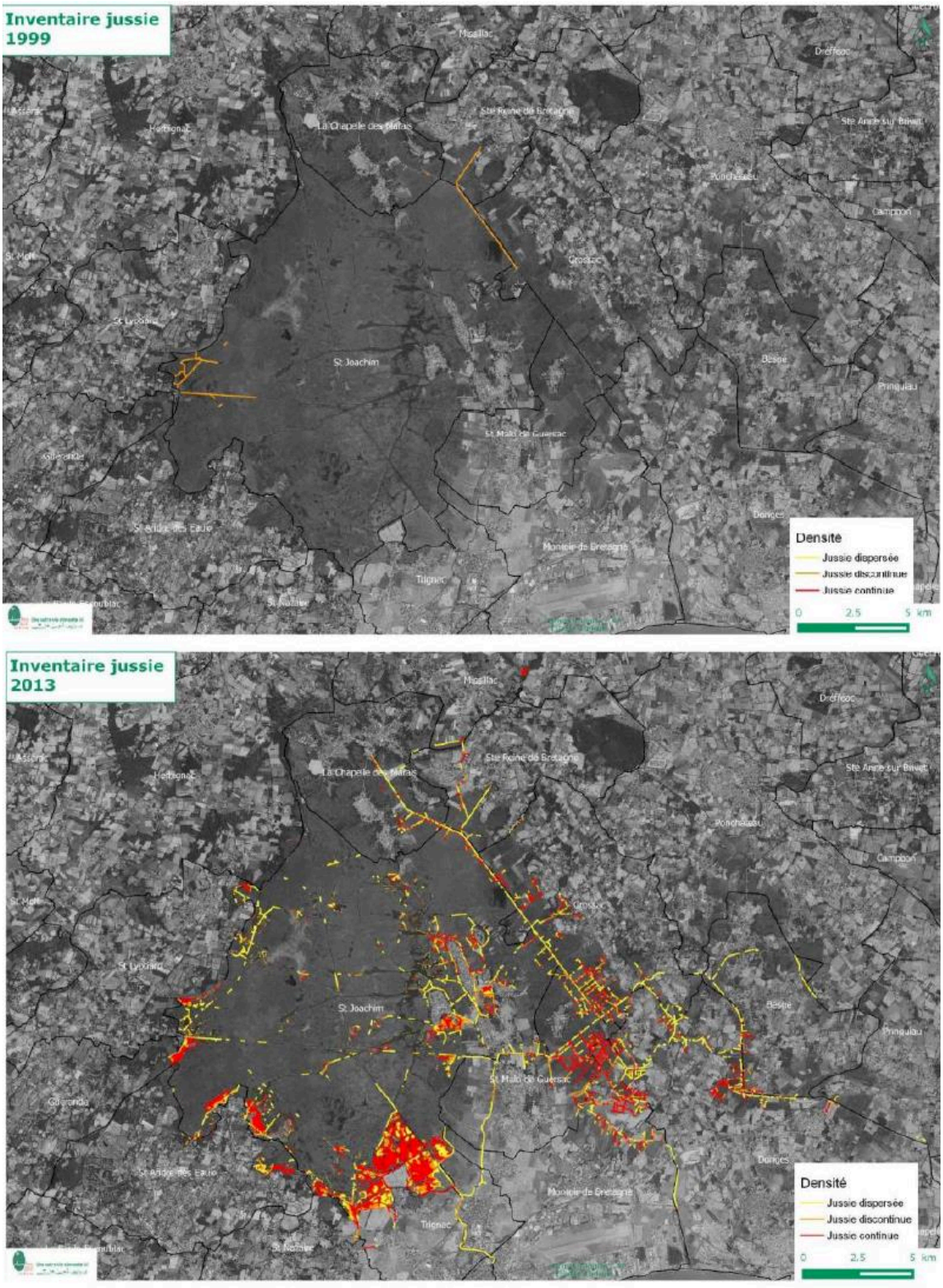


Figure 9 : Expansion de la distribution de *Ludwigia grandiflora* au sein du Parc Naturel Régional de Brière (Loire Atlantique) entre 1999 et 2013 (Rapport Pacte Jussie, 2018).

Thibault, 2004). La jussie comme d'autres plantes aquatiques est sensible à l'ombrage. La pose de bâche captant la lumière peut être un moyen de lutte efficace, de même que la pose de barrage pour limiter le déplacement des boutures et donc de l'invasion (Haury and Damien, 2014). Dans notre équipe (ESE), des tests de gestion par le sel ont été menés dans les marais à proximité de la mer (data non publiées). Ces résultats montrent un impact négatif du sel sur la croissance de la jussie à partir de 6g/L, suggérant une possibilité de gestion par le sel dans des zones proches de la mer. Cependant, des études plus avancées sur l'impact que peut avoir le traitement au sel sur l'écosystème et les espèces natives sont nécessaires. Thouvenot (2012) a montré que plusieurs facteurs pouvaient réduire l'expansion de *Ludwigia grandiflora*, comme l'utilisation de graminées à forte compétition en prairie humide, couplé à l'arrachage manuel. Mcgregor *et al.* (1996) proposent aux États-Unis l'utilisation de *Lysathia ludoviciana*, un coléoptère consommateur de jussie, pour gérer l'invasion, mais ce dernier présente une efficacité modérée (Delbart *et al.*, 2013). Aucune des méthodes citées précédemment n'enraye complètement le développement des Jussies, mais la combinaison de ces techniques peut en limiter les impacts. La prévention reste le moyen le plus efficace pour lutter contre les invasions biologiques (Beck & Thibault, 2004). Il est peut-être possible de valoriser la jussie afin de compenser les pertes économiques dues à sa gestion. En effet, elle contient des triterpènes qui peuvent avoir un intérêt comme ceux produits par *Ludwigia octovalvis*. Ces composés possèdent une activité intéressante contre les cellules cancéreuses chez l'homme (Chang *et al.*, 2004).

3.3.Devenir de l'invasion, colonisation du milieu terrestre

La jussie colonise en majorité les milieux aquatiques. Pourtant, on observe depuis deux décennies l'envahissement progressif des prairies humides par *Ludwigia grandiflora*. Cela pose évidemment des problèmes écologiques comme ceux cités précédemment, mais à cela s'ajoutent la dépréciation des terres agricoles. En effet, une prairie doit contenir un minimum de plantes fourragères pour permettre l'obtention d'aides financières européennes (Haury *et al.*, 2011). Les Jussies ne sont que faiblement consommées par les bovins et équins en raison de leur teneur en saponine. En outre, le passage des troupeaux peut même favoriser leur dispersion par création de boutures (Beck &Thibault, 2004). Ainsi, la plupart des écosystèmes « terrestres » envahis par la jussie se trouvent sur la côte atlantique de la France avec près de 1300 hectares envahis en 2017 (Haury, data non publiées). Le parc national de

Figure 10 : Comparaison des morphotypes terrestres et aquatiques de *Ludwigia grandiflora.*

Formes aquatique (haut) et terrestre (bas) de jussie prélevées sur le terrain (Marais de Mazerolles). La forme aquatique présente un port plus allongé et moins de feuilles, tandis que la forme terrestre est plus trapue *(Photo Barloy)*.

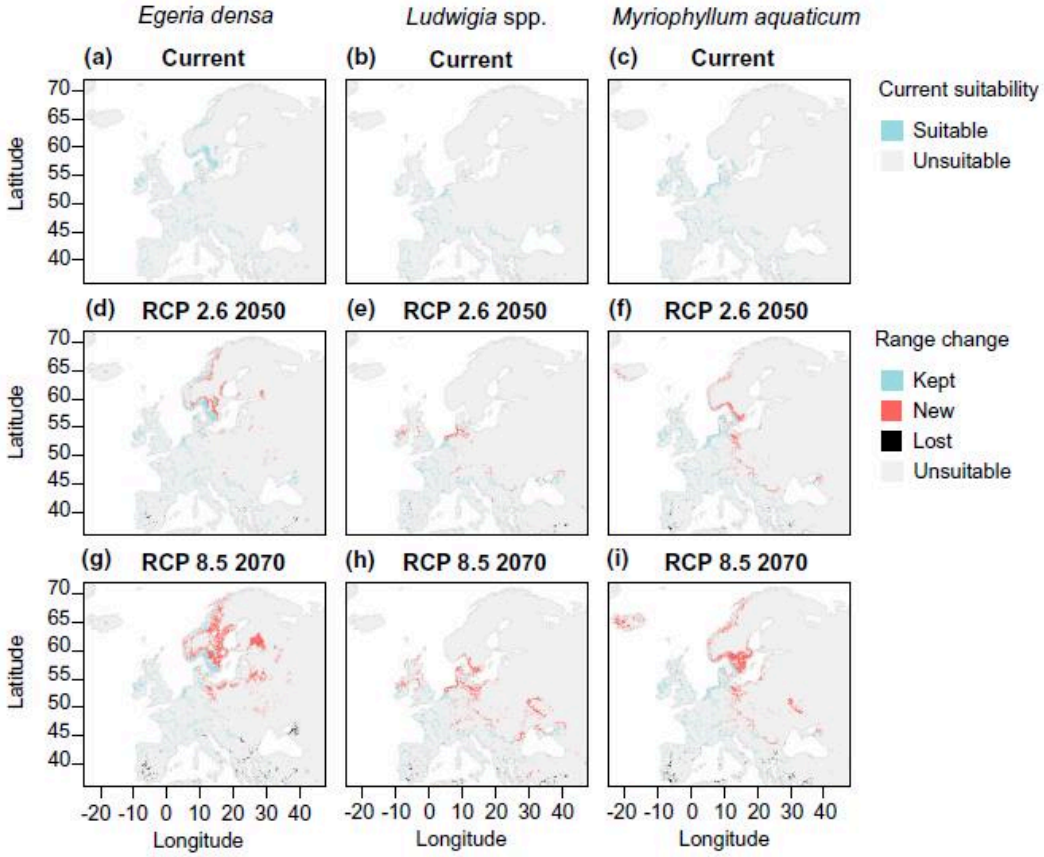


Figure 11 : Distributions actuelle et future en Europe des espèces aquatiques invasives *Egeria densa*, Ludwigia spp. et *Myriophyllum aquaticum*, selon deux scénarios bioclimatiques.

a–c : Climat actuel; d–f : changements dans la distribution prévue des espèces d'ici 2050 avec le scénario RCP 2.6 ; g–i : changement dans la distribution prévue des espèces d'ici 2070 selon le scénario PCR 8. (Gillard *et al.*, 2017).

Brière (près de Saint Nazaire, Loire Atlantique, France) a vu la surface de ses zones terrestres colonisées par la jussie être multipliée par cinq entre 2011(156ha) et 2014 (848ha) (Figure 9). On constate l'apparition sur le terrain d'une forme dite « terrestre » de jussie (Haury *et al.*, 2011; Haury *et al.*, 2014). Les jussies qui se développent en milieu aquatique (forme aquatique) possèdent des tiges fines et allongées avec des feuilles courtes arrondies, alors que les jussies qui se développent en milieu terrestre (forme terrestre) ont un port ramassé et trapu avec des feuilles plus allongées (Haury *et al.*, 2014). (Figures 10) Cette forme terrestre a un cycle de développement différent avec la moitié de leur cycle biologique effectué entièrement hors de l'eau. Cette colonisation du milieu terrestre témoigne et questionne les capacités d'adaptation/acclimatation de la jussie. Si la biologie et les impacts de la jussie aquatique sont de mieux en mieux connus, l'étude des formes terrestres reste encore marginale. Le réchauffement climatique peut être un facteur d'évolution des fronts d'invasion de la jussie. Gillard (2017) a étudié la distribution future de la jussie selon différents modèles mathématiques prenant en compte les élévations de température annoncées (Gillard *et al.*, 2017a ; Gillard *et al.*, 2017b ; Gillard *et al.*, 2017c). Ces auteurs ont montré un déplacement potentiel du front d'invasion vers le nord. (Figure 11). Ainsi, comprendre la dynamique des jussies dans un contexte des changements globaux permettra d'anticiper les nouveaux fronts d'invasion et ainsi lutter plus efficacement contre l'invasion. Si la littérature grise[7] sur la jussie et les stratégies de gestion est riche, les publications scientifiques sur le sujet restent encore rares.

[7] La littérature grise correspond à des écrits ne passant pas par des éditeurs et est composée essentiellement de rapports, de thèses et de comptes rendus de congrès. Ces écrits sont produits par diverses instances publiques ou privées.

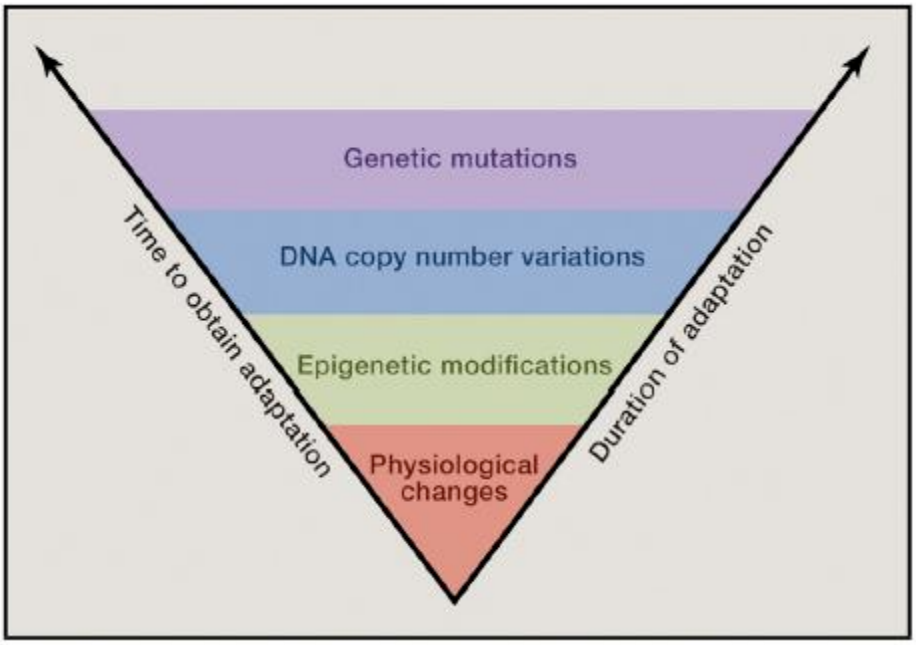


Figure 12 : Les différents niveaux de l'adaptation des changements physiologiques aux mutations génétiques (Yona *et al.*, 2015).

Deux temporalités caractérisent les différents niveaux d'adaptation : le temps nécessaire à l'acquisition de l'adaptation (axe de gauche) et le temps pour que cette adaptation soit maintenue en l'absence des conditions requises pour l'adaptation. Les adaptations physiologiques consistent en des changements de l'homéostasie biochimique, et donc leur durée dépend de la durée de vie des biomolécules qui sous-tendent l'adaptation, comme les ARNm, les protéines, etc. Les modifications épigénétiques se produisent généralement dans la même génération que l'expérience du déclencheur, mais leur durée dépend du type de mécanisme épigénétique (méthylation de l'ADN, modification de la chromatine, prions, etc.). Les dédoublements génomiques comprennent les dédoublements segmentaires et l'aneuploïdie résultant d'erreurs dans la ségrégation chromosomique au cours du cycle cellulaire, ce qui entraîne des changements bruts dans l'expression génétique de la région dupliquée. Les mutations génétiques sont des modifications fonctionnelles de la séquence codante ou des régions régulatrices de gènes qui modifient leur fonction ou leur expression.

III. Les sources de flexibilité

1. Concepts d'adaptation et d'acclimatation

Une population ou une espèce subissant une contrainte écologique forte, comme c'est le cas avec les changements globaux actuels, a plusieurs devenirs possibles : s'adapter, disparaitre ou se déplacer vers des conditions plus favorables (Feeley *et al.*, 2012). L'adaptation est un concept complexe, car polysémique. En effet, il fait référence aux processus, mais également à la finalité. Le terme peut être usité autant au sens large que dans un contexte plus précis. Ainsi, Simonet, (2009), dans une synthèse bibliographique sur le concept d'adaptation, énonce « est adapté un être vivant ». Ce raccourci qui lui est inspiré de Laborit (1976) soumet l'idée qu'un être vivant a dû, pour se reproduire et survivre, ajuster ses fonctions biologiques aux conditions environnementales. On touche ici un point clé de la notion d'adaptation, qui peut être décrite au sens large comme le processus par lequel les organismes améliorent leur valeur sélective « *fitness* » par des changements phénotypiques impliquant des mécanismes génétiques ou non génétiques (Yona *et al.*, 2015). Autrement dit, ce sont les réponses d'un organisme ou d'une espèce lui permettant de perdurer dans le temps.

On distingue généralement deux types d'adaptation. La première repose sur des changements physiologique, biochimique, anatomique individuelle, rapides et possiblement réversibles. On parle alors d'acclimatation. La seconde notion se déroule à l'échelle de la population ou de l'espèce et est le produit de la sélection naturelle. Dans ce cas, l'adaptation est une composante de la théorie de l'évolution darwinienne. L'acclimatation et l'adaptation *sensu stricto* diffèrent ainsi sur deux échelles (Figure 12) :

- À l'échelle du temps, prenant en compte la durée nécessaire pour produire un changement et celle du maintien du changement, qui est courte dans le premier cas et longue dans le second.
- À l'échelle de l'organisme, de l'individu pour l'acclimatation et de la population ou de l'espèce pour l'adaptation *sensu stricto.*

Le rapport du FRB (Fondation pour la recherche sur la biodiversité, 2016) intitulé « RÉPONSES ET ADAPTATIONS AUX CHANGEMENTS GLOBAUX: QUELS ENJEUX POUR LA

Tableau 3. Exemple d'interactions entre les sources de flexibilité que sont la plasticité phénotypique, l'évolution génétique et la migration (d'après FRB, 2016).

EFFET DE / SUR	PLASTICITÉ PHÉNOTYPIQUE	ÉVOLUTION GÉNÉTIQUE	MIGRATION
PLASTICITÉ PHÉNOTYPIQUE		Evolution de la plasticité	Sélection sur la plasticité
ÉVOLUTION GÉNÉTIQUE	Force de la sélection		Adaptation locale Maintien de la diversité génétique
MIGRATION	Plasticité de la migration	Evolution de la migration	

RECHERCHE SUR LA BIODIVERSITÉ ? » traite des sources de flexibilité qui permettent à des organismes ou espèces de répondre aux conditions environnementales et donc de s'adapter au sens large. Plusieurs sources de flexibilité y sont citées comme la migration, la plasticité phénotypique, l'épigénétique et l'évolution génétique. Je détaillerai ces sources de flexibilité ci-après en me focalisant notamment sur la plasticité phénotypique et l'épigénétique. La difficulté à définir la notion d'adaptation tient aussi au fait que ces sources de flexibilité interagissent entre elles (Tableau 3) (Kingsolver *et al.*, 2002). Ainsi, des processus à court terme d'acclimatation à travers des mécanismes épigénétiques peuvent intervenir sur des échelles de temps plus importantes et participer à l'adaptation *sensu stricto.* Dans cette thèse, je me suis intéressé à deux sources de flexibilité que sont la plasticité phénotypique et l'épigénétique, pouvant être toutes les deux impliquées dans l'adaptation. Ces sources de flexibilité sont impliquées dans le processus d'invasion et dans les capacités des espèces invasives à s'adapter rapidement. Une espèce invasive colonisant par définition un environnement nouveau, les mécanismes cités précédemment interviennent durant le processus d'invasion comme le détaille le schéma de la publication Marin/Genitoni *et al.* (2019) (Figure 4).

2. Migration

Les capacités de dispersion des espèces sont une composante importante de leur survie. En effet, pour conserver des conditions optimales de développement un individu ou une population peut se déplacer. C'est un des moyens d'adaptation au sens large. Ainsi, il a été montré que le changement climatique a impacté la distribution d'oiseaux (Forero-Medina *et al.*, 2011) ou d'insectes comme la processionnaire du pin (*Thaumetopoea pityocampa* (Lépidoptère)) (Roques *et al.*, 2015). *Thaumetopoea pityocampa,* dont le stade larvaire est sensible à la température a vu sa distribution modifiée vers le nord de plus de 100 km entre 1972 et 2011 (Roques *et al.*, 2015). L'étude des migrations passées notamment lors des dernières glaciations par les paléontologues sur les pollens et fossiles de plantes a permis de mettre en évidence l'impact important des conditions environnementales sur les migrations (Davis & Shaw, 2001 ; Aitken *et al.*, 2008). Malgré le caractère sessile des plantes, elles sont également capables de

migration (Pitelka & Group, 1997 ; Midgley *et al.*, 2006). Cette capacité est dictée par les moyens de dispersion (Pitelka & Group, 1997 ; Ronce, 2007).

Le déplacement des populations impacte d'autres mécanismes d'adaptation au sens large. En effet, une migration dans de nouvelles conditions environnementales met en jeu la plasticité phénotypique, mais aussi la préadaptation locale tout en modifiant la dynamique des populations. En effet, la population nouvellement formée suite à une migration peut évoluer génétiquement différemment de la population d'origine. Ainsi, la connectivité entre ces deux populations permettant les flux de gènes est importante pour le devenir général de la métapopulation (Aitken *et al.*, 2008 ; Kremer *et al.*, 2012). Dans le cadre, des changements globaux, la question est aujourd'hui de savoir si les vitesses de migration seront suffisantes pour échapper aux conditions environnementales défavorables pour les organismes. Dans ce contexte, les espèces invasives peuvent être des modèles d'études.

3. Plasticité phénotypique

3.1. Concept et définition

La plasticité phénotypique est un concept développé en 1965 par Bradshaw. Pigliucci, (2006) la définit comme la capacité pour un génotype de produire différents phénotypes selon l'environnement où il se développe. En réponse aux conditions environnementales fluctuantes, un organisme va répondre de manière plastique aux niveaux physiologique, anatomique, etc. On parle plus communément de la plasticité d'un trait, qui représente les valeurs possibles que peut prendre un trait dans une gamme d'environnements différents (Nicotra *et al.*, 2010). Certains auteurs distinguent différents types de plasticités phénotypiques, en la qualifiant de réversible (Piersma & Drent, 2003) ou irréversible, lorsqu'elle est développementale (Beldade *et al.*, 2011 ; Palmer, 2012). La plasticité comportementale chez les animaux est réversible (Dingemanse *et al.*, 2010) , alors que des modifications anatomiques liées au développement chez une plante est un cas de plasticité irréversible (Jong and Leyser, 2012). Lorsque la plasticité phénotypique améliore la valeur sélective de l'individu (fitness) on la dit adaptative, c'est-à-dire allant dans la même direction que les forces de sélection. La plasticité peut également être neutre, c'est-à-dire sans effet sur la valeur sélective ou maladaptative avec un effet négatif sur la valeur sélective (Ghalambor *et al.*, 2007).

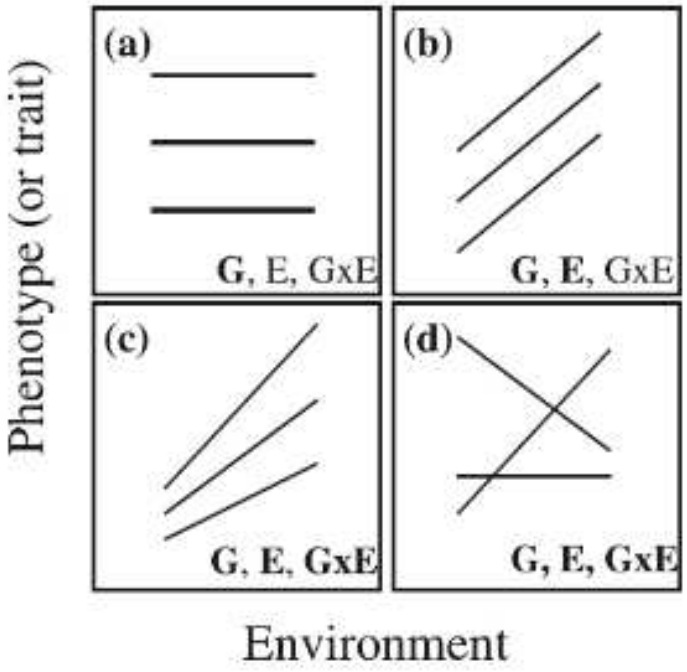


Figure 13 : Graphique conceptuel présentant des normes de réaction (Strand & Weisner, 2004 d'après les travaux de Schlichting & Pigliucci (1998) et DeWitt & Scheiner, (2004)).

Les lettres en gras (G, E, GxE) indiquent les variances significatives qu'elles soient génétique (G), environnementale (E) ou l'interaction des deux (GxE).
(a) Pas de plasticité phénotypique (norme de réaction horizontale) mais existence d'effet génétique (espace entre les normes de réactions/ différence de valeurs de trait pour les phénotypes étudiés).
(b) Présence de plasticité et de variation génétique (normes avec pentes et valeur de trait différente) mais pas d'interaction, car les normes de réaction sont parallèles.

On oppose à la plasticité phénotypique, la canalisation qui représente l'insensibilité du phénotype à l'environnement, fonction essentielle pour assurer la stabilité d'un organisme. La complexité de la plasticité phénotypique réside dans le fait qu'elle puisse être un processus qui permette l'évolution (West-Eberhard, 2005; Pfennig *et al.*, 2010), mais également un trait quantitatif lui aussi soumis à la sélection (DeWitt and Scheiner, 2004). En effet, la plasticité phénotypique est en partie sous contrôle génétique et épigénétique. Ainsi, la variance phénotypique est décomposée comme l'addition des variances génotypique notée Var(G), environnementale notée Var(E) et leur interaction notée Var (G x E). La variance épigénétique est notamment contenue dans les termes Var(E) et Var(GxE), car en lien avec les conditions environnementales (voir chapitre 2).

$$Var(P) = Var(G) + Var(E) + Var(G \times E)$$

3.2.Méthodes d'analyse de la plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique peut être décrite et étudiée par ce qu'on appelle une norme de réaction (Figure 13). Cette norme de réaction correspond à la valeur d'un trait phénotypique (en ordonnée) en fonction d'une gamme d'environnements (en abscisse), deux au minimum. Une norme de réaction est donc une fonction caractérisée par une forme (non-plastique ou plastique) et une amplitude (degré de plasticité). Dans un cas simple avec deux environnements, le degré de plasticité peut être considéré comme la pente de la norme de réaction. Ainsi, une droite horizontale (pente nulle) indique une plasticité nulle. Dès lors que la droite (courbe) a une pente, on peut dire que le trait considéré est plastique. Dans cette représentation, on peut comparer des individus entre eux et distinguer l'effet génétique (VarG), de l'environnement (VarE) et de l'interaction des deux (Var(GxE)) (Figure 13). Si l'on compare un trait phénotypique entre trois génotypes, on retrouve plusieurs situations. Dans un premier cas, les droites sont horizontales et présentent des ordonnées différentes, il n'y a donc pas de plasticité et la variation phénotypique est due à la variance génotypique (VarG, Figure 13a). Dans un second cas, les droites présentent une pente qui est identique avec des ordonnées différentes, la variation phénotypique est donc causée par la variance génotypique (VarG) et par la variation de l'environnement (VarE) (Figure 13b). Enfin, les deux dernières situations sont les plus complexes, les droites présentent des pentes différentes entre elles, des ordonnées différentes et parfois des directions opposées (Figure 13c et 13d). De tels

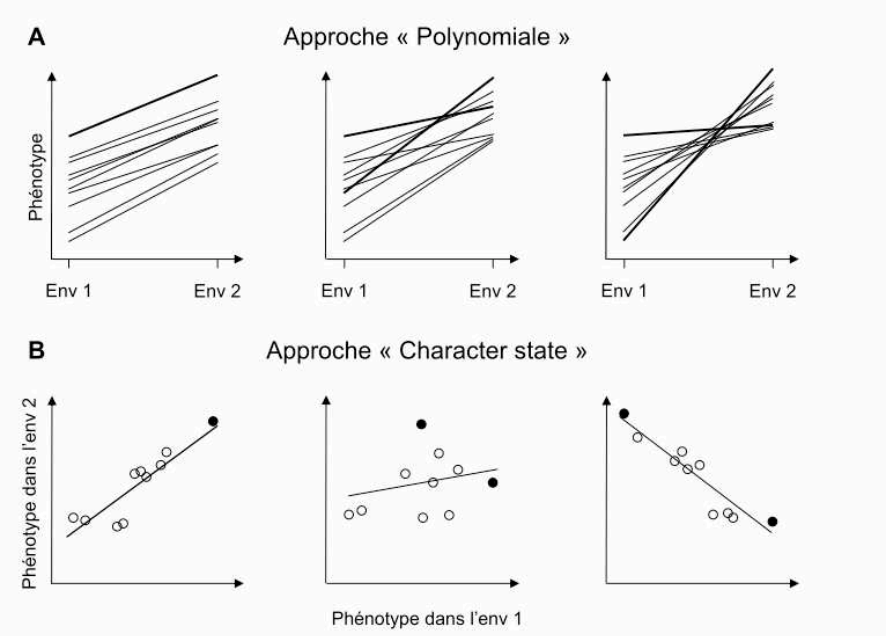


Figure 14 : Deux principaux modèles de génétique quantitative utilisés pour étudier les normes de réaction (Ris, 2003).

On considère 10 génotypes dans deux environnements. Dans l'approche « polynomiale » (A), la valeur phénotypique des génotypes est indiquée en fonction de la valeur de l'environnement alors que dans l'approche « character state » (B), la valeur phénotypique d'un génotype dans un environnement est exprimée en fonction de sa valeur dans un autre environnement. Trois types d'interactions génotype x environnement sont représentés selon que les hiérarchies entre génotypes dans les deux environnements sont (i) globalement les mêmes, (ii) indépendantes, (iii) globalement inversées (trade-off environnemental). Les génotypes présentant un optimum dans au moins l'un des deux environnements sont figurés en gras.

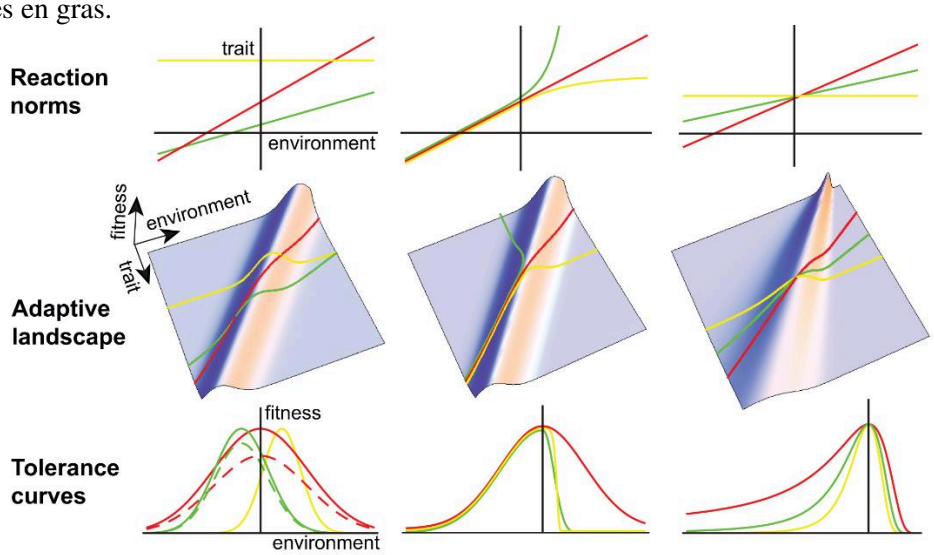


Figure 15 : Courbes de tolérance et de plasticité phénotypique (Chevin *et al.*, 2010).

En haut : les normes de réaction pour trois génotypes (lignes colorées).
Au milieu : le paysage adaptatif détaillant la valeur sélective (fitness) comme fonction du phénotype et de l'environnement. La norme de réaction est projetée sur le plan de la valeur sélective.
En bas, les courbes de tolérance environnementale représentant les coupes à travers le paysage adaptatif le long des lignes définies par les normes de réaction.
Sur le graphique de gauche, les lignes pointillées vertes et rouges correspondent aux courbes de tolérance incluant les coûts de la plasticité. Les trois colonnes représentent les différents scénarios selon la linéarité de la norme de réaction.

résultats témoignent d'effets génotypique (VarG), environnemental (VarE) et de l'interaction de ces derniers (Var(GxE)) (Strand and Weisner, 2004).

Deux approches permettent d'étudier la norme de réaction, l'approche dite « polynomiale » et l'approche « état du caractère ». La première approche vise à modéliser la valeur du phénotype en fonction de l'environnement. La seconde approche cherche à exprimer la valeur d'un trait d'un génotype en fonction de sa valeur dans un autre environnement (Figure 14). Autrement dit, l'approche état des caractères va se focaliser sur les traits dans chaque environnement alors que l'approche polynomiale va s'intéresser à la norme de réaction (DeWitt & Scheiner, 2004). L'étude mathématique des normes de réaction permet de rendre compte de la plasticité phénotypique et de comparer différents génotypes entre eux (Valladares *et al.*, 2006 ; Arnold *et al.*, 2019). Si on veut étudier la plasticité phénotypique et savoir si celle-ci est adaptative, l'étude de traits liés à la valeur sélective est primordiale (Lefèvre *et al.*, 2015).

Un autre moyen de quantifier la plasticité phénotypique est le calcul d'indices de plasticité. Valladares *et al.* (2006) font la synthèse de 17 indices, en listant le contexte d'utilisation. Les contextes d'utilisation de ces indices sont variés tout comme leur méthode de calcul, mais ils offrent des résultats similaires. Ils permettent de normaliser les traits phénotypiques étudiés et donc de les comparer entre eux. Ainsi, Valladares *et al.* 2006 proposent l'utilisation du « *relative distance plasticity index* » ou RDPI qui consiste à calculer la somme des distances entre environnements parmi toutes les paires d'individus divisés par le nombre de comparaisons.

$$\mathrm{RDPI} = \Sigma(dij{\rightarrow}i'j'/(xi'j' + xij))/n$$

La distance $dij{\rightarrow}i'j'$ où i est un individu différent de i' (deux environnements) est définie comme la valeur absolue de la différence $xi'j' - xij$ divisé par la somme de $xi'j' + xij$. Ceci pour toutes les paires d'individus, n étant le nombre de distances. Si l'on connait la relation entre le trait étudié et sa valeur sélective, il est possible d'établir des courbes de performances. Une courbe large décrira un organisme dit généraliste, *a contrario* une courbe étroite désignera un organisme dit spécialiste (Figure 15) (Richards *et al.*, 2006; Chevin *et al.*, 2010). Dans ce manuscrit, nous avons choisi d'utiliser un indice de plasticité, le RDPI ou « *relative distance plasticity index* ». La justification de ce choix et des implications entre plasticité, invasion biologique et épigénétique seront détaillées dans les chapitres suivants.

Tableau 4. Synthèse des études testant des changements génétiques induits par le climat dans un contexte allochronique (temps) dans la nature (Merilä & Henry, 2013). .

Cette synthèse exclue les études d'expérimentation d'évolution en laboratoire et « space-for-time substitution », où une variation dans l'espace peut se substituer au temps. Cette synthèse indique également si la nature adaptative du changement a été confirmée et si le changement climatique a été établi comme facteur causal. Les chiffres entre parenthèses font référence aux approches énumérées dans un autre tableau de l'article de Merilä et Henry, 2013. « Oui » = preuve fournie, « Non » = aucune preuve, « . » = nonexaminé.

Species	Trait	Genetic change?	Plastic change?	Adaptive?	Causality?	Reference
Fish						
Oncorhynchus gorbuscha	Phenology	Y (6)	.	.	Y (1,2)	Crozier and Hutchings 2014
Oncorhynchus nerka	Phenology	Y (3)	Y (4)	Y (2)	Y (1,2)	Crozier and Hutchings 2014
Birds						
Larus novaehollandiae	Body size	N (1)	Y (5)	N (2,3)	N (2)	Teplitsky and Millien 2014
	Phenology	N (1)	N (5)	N (2,3)	.	Charmantier and Gienapp 2014
Strix aluco	Coloration	Y (1)	N (5)	Y (2)	Y (2)	Karell et al. 2011
Ficedula albicollis	Phenology	N (1)	Y (5)	Y (2,3)	Y (2)	Charmantier and Gienapp 2014
Parus major	Phenology	N (1,5)	Y (5)	Y (2,3)	Y (2)	Charmantier and Gienapp 2014
	Body size	N (1)	Y (5)	Y (2,3)	Y (2)	Teplitsky and Millien 2014
Sylvia atricapilla	Phenology	Y (2,5)	.	Y (2,3)	Y (1–3)	Charmantier and Gienapp 2014
Mammals						
Tamiasciurus hudsonicus	Phenology	Y (1,3)	Y (1,4,5)	Y (2)	Y (2)	Boutin and Lane 2014
Marmota flaviventris	Phenology Body size	N (1)	Y (1)	Y (2)	Y (1)	Boutin and Lane 2014
Ovis aries	Body size	N (1)	Y (1,4,5)	Y (2)	Y (2)	Boutin and Lane 2014
Plants						
Brassica rapa	Phenology Physiology	Y (2,3)	Y (4), N (2,3)	Y (1,2)	Y (2,3)	Franks et al. 2014
Thymus vulgaris	Allele frequency	Y (6)	.	Y (2)	Y (1)	Franks et al. 2014
Andropogon gerardii	Physiology, growth	Y (2,3,6)	Y (2,3,4)	Y (3)	Y (3)	Franks et al. 2014
Triticum dicoccoides & *Hordeum spontaneum*	Phenology, allele frequency	Y (2,6)	.	.	Y (2)	Franks et al. 2014
Polygonum cespitosum	Physiology, growth	Y (2,3)	Y (2,3)	Y (1,2)	Y (2,3)	Franks et al. 2014
Insects						
Aedes albopictus	Phenology	Y (2,5)	.	.	.	Stoks et al. 2014
Wyeomyia smithii	Phenology	Y (2,5)	.	Y (1)	Y (1)	Stoks et al. 2014
Aquarius paludum	Phenology	Y (2)	.	.	Y (1)	Stoks et al. 2014
Hesperia comma	Dispersal traits	Y (2)	N (2)	.	Y (2)	Schilthuizen and Kellermann 2014
Aricia agestis	Dispersal traits	Y (2)	N (2)	.	Y (2)	Schilthuizen and Kellermann 2014
Adalia bipunctata	Coloration	Y (2)	N (2)	Y (2,3)	Y (2)	Schilthuizen and Kellermann 2014
Tetrix undulata	Dispersal traits	Y (2)	N (2)	N (2)	.	Schilthuizen and Kellermann 2014
Drosophila melanogaster	Allele frequency	Y (6)	.	.	Y (1)	Schilthuizen and Kellermann 2014
Drosophila subobscura	Allele frequency	Y (6)	.	.	Y (1)	Schilthuizen and Kellermann 2014
Drosophila robusta	Allele frequency	Y (6)	.	.	Y (1)	Schilthuizen and Kellermann 2014

3.3.Rôles de la plasticité phénotypique

La plasticité phénotypique est reconnue comme un mécanisme permettant aux organismes de répondre rapidement à un changement environnemental (Nicotra *et al.*, 2010; Chevin and Hoffmann, 2017), en réponse à des stress abiotiques comme la lumière (Mendonça *et al.*, 2019), ou une combinaison de stress (Shaar-Moshe *et al.*, 2019). Des études mettent en avant le rôle possible de la plasticité dans la réponse aux changements globaux (Nicotra *et al.*, 2010 ; Bonamour *et al.*, 2019). Merilä & Hendry, (2014) font un bilan des synthèses abordant la plasticité phénotypique et l'adaptation dans le contexte des changements globaux. Ils détaillent les méthodes et approches permettant d'étudier les réponses génétiques et plastiques (Tableau 4). Chez les plantes terrestres, Franks *et al.* (2014), montrent qu'une majorité d'études (38) montrent des réponses plastiques et génétiques des traits morphologiques en réponse aux changements climatiques. Ceci suggère un rôle de la plasticité dans l'adaptation. Hendry (2016) s'interroge sur le rôle de la plasticité phénotypique. Comment s'exprime celle-ci ? Existe-t-il un coût de la plasticité ? Celle-ci évolue-t-elle ? etc. Il conclut que la plasticité phénotypique peut participer à l'acclimatation à de nouvelles conditions environnementales et être adaptative (Pigliucci, 2006).

La plasticité phénotypique peut favoriser ou contraindre l'évolution génétique. En effet, par exemple, dans un environnement stressant, l'apparition de phénotype extrême peut révéler de la variation génétique cryptique permettant à la sélection d'agir et ainsi conduire à de l'adaptation. Au contraire, si le phénotype produit est proche de l'optimum et tamponne les conditions environnementales, la plasticité phénotypique peut être un frein à l'adaptation des populations (Price *et al.*, 2003 ; Gibert, 2012 ; Hendry, 2016).

Concernant le coût de la plasticité, Gibert (2012) liste d'après les travaux de Dewitt *et al.* (1998), Pigliucci, (2001) les coûts et les limites de la plasticité phénotypique (Lande, 2015 ; Murren *et al.*, 2015). Parmi les coûts de la plasticité, on peut citer les coûts énergétiques liés à la conservation des mécanismes permettant de détecter la condition environnementale et les coûts pour produire le phénotype plastique, respectivement appelés coût de maintenance et coût de production. Les limites à la plasticité reposent sur la fiabilité de l'information reçue par l'organisme parce que l'environnement change trop rapidement ou encore, car le délai entre la réception du signal

Tableau 5. Classification des coûts et limites de la plasticité phénotypique (Gibert, 2012 d'après les travaux de DeWitt, 1998, Pigliucci, 2001).

Coûts de la plasticité phénotypique	Limites de la plasticité phénotypique
Maintenance : Coûts énergétiques liés au maintien des mécanismes sensoriels et regulateurs **Production** : Coûts de production d'un phénotype plastique (relativement à ce que payerait un spécialiste produisant le même phénotype) **Acquisition de l'information** : Dépenses d'énergie pour analyser l'environnement, énergie/temps non utilisés pour d'autres activités **Instabilité développementale** : due à une plus grande susceptibilité aux imprécisions dans la production du phénotype chez les génotypes plastiques. **Génétique** : due aux effets délétères des gènes de plasticité phénotypique par déséquilibre de liaison, pleiotropie ou épistasie avec d'autres gènes.	**Fiabilité de l'information** : les indices environnementaux peuvent être non fiables ou changer trop rapidement **Temps de réponse** : délai entre la réception de l'indice et la production du phénotype adapté **Gamme développementale** : les génotypes plastiques pourraient être plus limités que les génotypes spécialisés pour produire des phénotypes adaptatifs extrêmes **Problèmes épiphénotypiques** : les structures phénotypiques rajoutées de façon secondaire au cours du développement pourraient être moins performantes que lorsqu'elles sont produites comme élément principal du développement

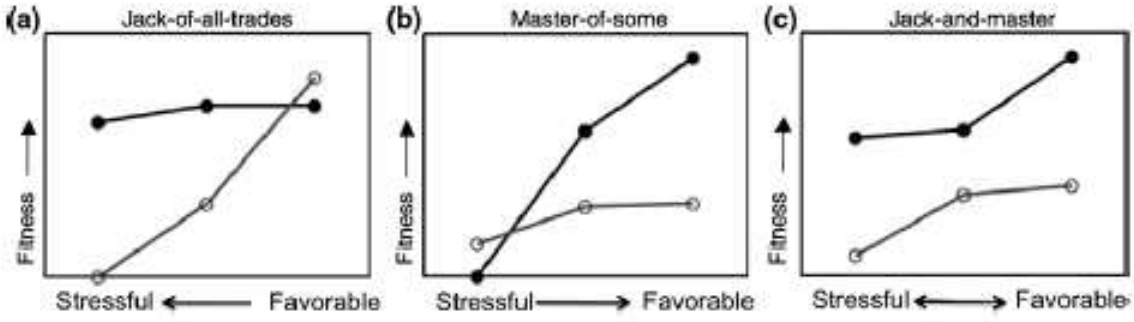


Figure 16 : Hypothèses relatives à la plasticité de la valeur sélective des génotypes/populations/espèces invasives (lignes noires) et non invasives (lignes grises) (Richards *et al.*, 2006).

Ces hypothèses doivent ressembler qualitativement à l'un des deux modèles suivants ;(a) les espèces invasives présentent une valeur sélective plus élevée face aux conditions environnementales stressantes, ce qui pourrait leur conférer une plus grande étendue écologique (Jack-of-all-trades) ;(b) les espèces invasives sont plus en mesure de réagir en améliorant leur valeur sélective, face à des conditions favorables, permettant éventuellement des densités de population plus élevées dans des conditions favorables (Master-of-some);
(c) ll est aussi possible d'imaginer qu'une norme de réaction de la valeur sélective présente des caractéristiques de robustesse et de réactivité des deux modèles précédents (Jack-and-master).

environnemental et la production du phénotype est trop longue (Gibert, 2012). Les études sur les coûts et les limites de la plasticité sont rares, car complexes à étudier (Tableau 5).

3.4.Plasticité phénotypique et espèces invasives

Plusieurs études se sont intéressées au rôle de la plasticité chez les espèces invasives (Li *et al.*, 2016; Oduor *et al.*, 2016; Szabó *et al.*, 2019). Certaines mettent en avant le rôle clé que joue la plasticité phénotypique dans la réussite de l'invasion et la décrivent comme une caractéristique importante des espèces invasives chez les plantes (Sexton *et al.*, 2002 ; Daehler, 2003 ; Davidson *et al.*, 2011) comme chez les animaux (Trussell & Smith 2000 ; Morris, 2014). Les espèces invasives seraient supposées être plus plastiques que les espèces natives. Ainsi, Davidson *et al.* (2011) montrent, à travers une méta-analyse de 75 paires d'espèces de plantes invasives et non invasives que la plasticité phénotypique des traits morphologiques et physiologiques des espèces invasives est plus importante. De la même manière, Daehler, (2003) a étudié la plasticité phénotypique en faisant 79 comparaisons entre plantes natives et invasives et a montré également une plus grande plasticité phénotypique chez les espèces invasives. Richards *et al.* (2006) décrivent plusieurs situations dans lesquelles la plasticité participe au succès de l'invasion. La première situation est appelée « J*ack-of-all-trades* ». Ce scénario permet à la plante invasive de maintenir sa valeur sélective dans de nombreux environnements. La seconde intitulée « *Master-of-some* » décrit un système où la plante invasive est plus compétitive dans un environnement favorable. Et enfin, la troisième situation nommée « *Jack-and-Master* » combine les deux situations précédentes (Figure 16).

Cependant d'autres études affirment que la plasticité phénotypique n'est pas plus importante chez les espèces invasives que chez les espèces natives (Chown *et al.*, 2007 ; Godoy *et al.*, 2011 ; Matzek, 2012 ; Lamarque *et al.*, 2013). Ainsi Godoy *et al.* (2011) ont comparé 20 paires de plantes invasives et natives en mesurant 20 traits différents. Ils concluent sur l'absence de différences significatives vis-à-vis de la plasticité. Cependant, les plantes invasives et natives diffèrent quant à leurs traits. Les plantes invasives présentent un meilleur rendement sur une gamme large de ressources nutritives. L'étude de Matzek (2012), sur 10 espèces du genre Pinus, va dans le même sens en montrant que la valeur de trait explique davantage les performances des espèces invasives que la plasticité phénotypique. La question n'est pas tranchée et dépend du modèle étudié et de l'approche utilisée.

4. Épigénétique

4.1.Bref historique de l'épigénétique

L'histoire commence il y a plus de 2 000 ans avec Aristote (384 av. J.-C. 322 av. J.-C). Ce dernier se pose la question fondamentale de l'origine de la vie. Est-ce que l'individu est issu d'un développement progressif ou est-il déjà préformé ? Se basant sur des observations d'animaux et en particulier d'œufs de poules, il constate la formation progressive de l'organisme et émet l'hypothèse dite d'« épigenèse ». Cette théorie sert de base à d'autres scientifiques des 16e et 17e siècles. Ainsi, Girolamo Fabrici (1533-1619) a regardé le développement de l'embryon chez le poulet, la souris et le requin et arrive aux mêmes conclusions qu'Aristote. Son élève William Harvey (1578-1657) a poursuivi ses recherches en soutenant l'hypothèse de l'épigenèse.

Les questions religieux et philosophiques de l'époque voient ces constatations être débattues et nombreux sont les scientifiques à être eux-mêmes victimes de ce que l'on considère aujourd'hui comme un biais cognitif, car malgré les progrès dans la microscopie, certaines « observations » vont dans le sens d'un embryon déjà formé. Entre épigenèse et préformation, la controverse a fait rage durant plusieurs décennies jusqu'au milieu du 19e et la découverte de la cellule comme structure du vivant, clôturant définitivement le débat en faveur de l'épigénèse (Felsenfeld, 2014; Heard and Martienssen, 2014).

Les progrès successifs, par Flemming (1882), sur le rôle du noyau et la découverte de la chromatine puis les débuts de la génétique ont conduit à la naissance en 1942 du terme épigénétique par Conrad Waddington (Choudhuri, 2011). Il décrit ainsi les liens causaux entre génotype et phénotype pour comprendre le développement et voit l'épigénétique comme l'étude des mécanismes de développement à travers les gènes qui permettent d'observer des effets phénotypiques.

Les découvertes plus récentes des mécanismes moléculaires et de phénomènes qui ne s'expliquaient pas avec la génétique mendélienne (chromosome X, paramutation…) ont conduit à l'apparition d'une nouvelle définition. L'épigénétique concerne les modifications moléculaires de l'expression du génome, sans changement de la séquence ADN, qui sont héritables (au cours du

développement par mitose ou entre générations par méiose). Cette définition prend en compte plusieurs niveaux de modifications de la chromatine : la méthylation de l'ADN, les modifications post-

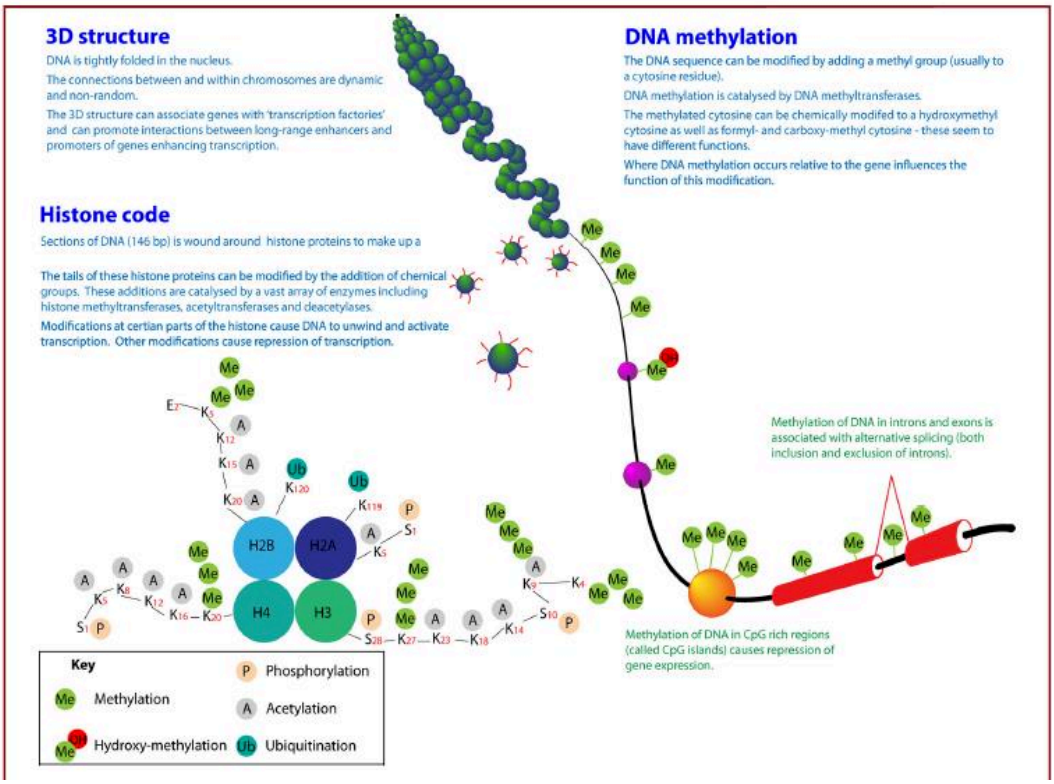


Figure 17 : Modifications épigénétiques et leurs effets potentiels sur l'expression des gènes et sur la structure de la chromatine (Duncan *et al.*, 2014).

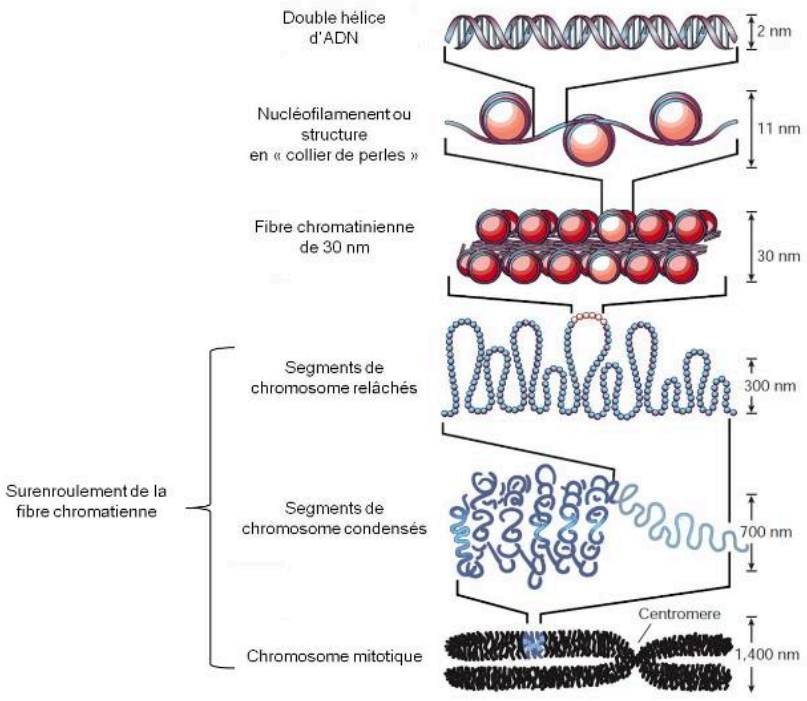


Figure 18 : Différents niveaux de condensation de la chromatine (Felsenfeld & Groudine, 2003).

traductionnelles des histones ou des variants histones et les ARN non codants. (Duncan *et al.*, 2014 ; Allis & Jenuwein, 2016) (Figure 17).

4.2.Mécanismes épigénétiques

4.2.1. État de la chromatine

La molécule d'ADN support de l'information génétique est, chez les cellules eucaryotes, confinée dans le noyau. Sa compaction est assurée par des protéines histones formant des nucléosomes constituant ainsi l'unité fondamentale de ce qu'est la chromatine. Les nucléosomes sont constitués d'un octamère d'histones (2 de quatre types : H2A, H2B, H3, H4) entourés de 147 pb d'ADN et sont reliés les uns aux autres par 50 pb d'ADN sur lesquelles on retrouve l'histone H1 (Lämke & Bäurle, 2017). En 1928, Emil Heitz a observé, chez les chromosomes eucaryotes, deux structures de la chromatine. La première appelée euchromatine est dite génétiquement « active », l'autre dite hétérochromatine est génétiquement « passive » (Figure 18). L'état de la chromatine, c'est-à-dire la structure et la compaction de la molécule d'ADN, influence les processus de transcription, réplication, recombinaison … et joue également un rôle dans le contrôle des éléments transposables (Bucher *et al.*, 2012). La compaction de la chromatine est dynamique et évolue dans le temps et l'espace. Il existe trois sources principales de variation qui sont les modifications des histones (PTMs), l'utilisation de variants d'histone et des modifications de l'ADN comme la méthylation (Yung & Elsässer, 2017).

4.2.2. Marque de la chromatine

Modification des histones

L'état de la chromatine est notamment garanti par les histones. Ainsi, des variants d'une même histone existent (Kiefer, 2007) et sont soumis à une gamme importante de modifications possibles sur leur extrémité N-terminale, comme l'acétylation, la phosphorylation, l'ubiquitination, la sumoylation, l'ADP ribosylation, la déamination, la proline isomérisation ou encore la méthylation (Kouzarides, 2007). Les fonctions de ces modifications sont aussi diverses que leur nombre et dépendent également de leur combinaison et de leur localisation dans le génome. Ces modifications chimiques jouent notamment sur

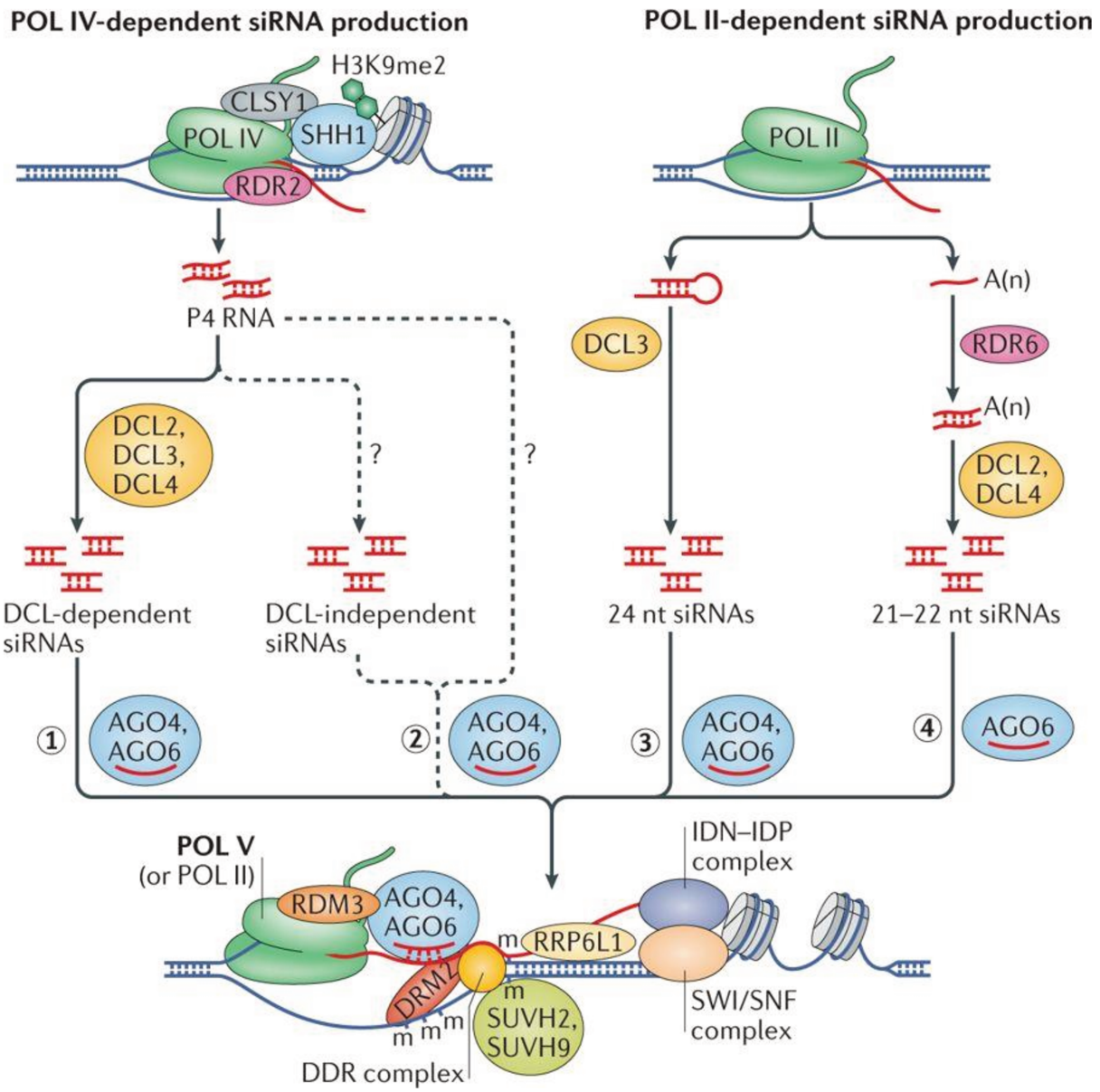


Figure 19 : Voies des ARN dirigées par la méthylation de l'ADN (RNA-directed DNA methylation) chez *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.*, 2018).

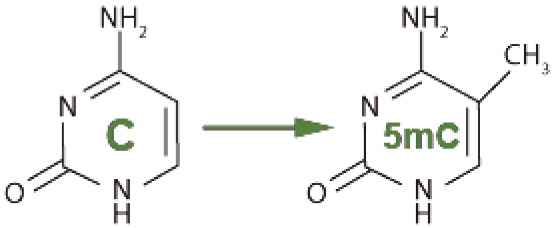


Figure 20 : Conformation de la cytosine et de la cytosine méthylée.

La cytosine méthylée présente un groupement méthyle CH_3 sur le 5ème carbone (https://www.epigentek.com/catalog/dna-methylation-c-75_21.html)

l'accessibilité de la molécule d'ADN et donc *in fine* dans la régulation et l'expression des gènes. Ces marques sont réversibles et peuvent dans certains cas être transmises à la descendance ce qui répond à la définition de l'épigénétique (Roudier *et al.*, 2009).

ARN non codant

Les ARNs non codants (ncRNAs) sont des molécules d'ARN transcrits depuis l'ADN, mais non traduits en protéines. On distingue deux groupes d'ARNs non codant basés sur leur taille. Le premier inclut les petits ARNs que sont les miRNAs, siRNAs, piRNAs et le deuxième des ARNs dit « longs » avec les IncRNAs. Ils sont reconnus comme régulateurs de l'expression des gènes (Wei *et al.*, 2017). En outre, certains ARN non codants interagissent avec d'autres mécanismes épigénétiques comme la méthylation de l'ADN. Ainsi, chez les plantes, l'ARN polymérase IV produit des transcrits de certains loci qui vont servir de substrat pour la biosynthèse de petits ARN interférents (siRNA). Ces derniers orientent la méthylation de l'ADN *via* ce qu'on appelle la voie des *RNA-directed DNA méthylation* (RdDM) (Bucher *et al.*, 2012 ; Zhang *et al.*, 2018). (Figure 19)

La méthylation de l'ADN

Définition

La méthylation de l'ADN, marque épigénétique la plus étudiée, correspond à l'addition d'un groupement méthyle (-CH3) sur le carbone en position 5 d'une cytosine. On obtient alors une cytosine méthylée ou 5-methylcytosine (5mC). Cette action est réalisée par des enzymes de type ADN méthyltransférases à partir du substrat S-adénosyl-L-méthionine. Découverte en 1925, chez *Mycobacterium tuberculosis*, par Jonson et Coghill, la 5-méthylcytosine n'a été identifiée que plus tard chez les animaux et les végétaux (Johnson & Coghill, 1925) (Figure 20).

Mécanismes de méthylation et déméthylation

Chez les plantes, les méthylations s'effectuent dans les contextes CG, CHG et CHH (où H = À, C ou T). On distingue les méthylations de maintenance et celles *de novo* qui font appel à des enzymes de la famille des méthyltransférases. La méthylation de maintenance consiste à permettre la conservation du

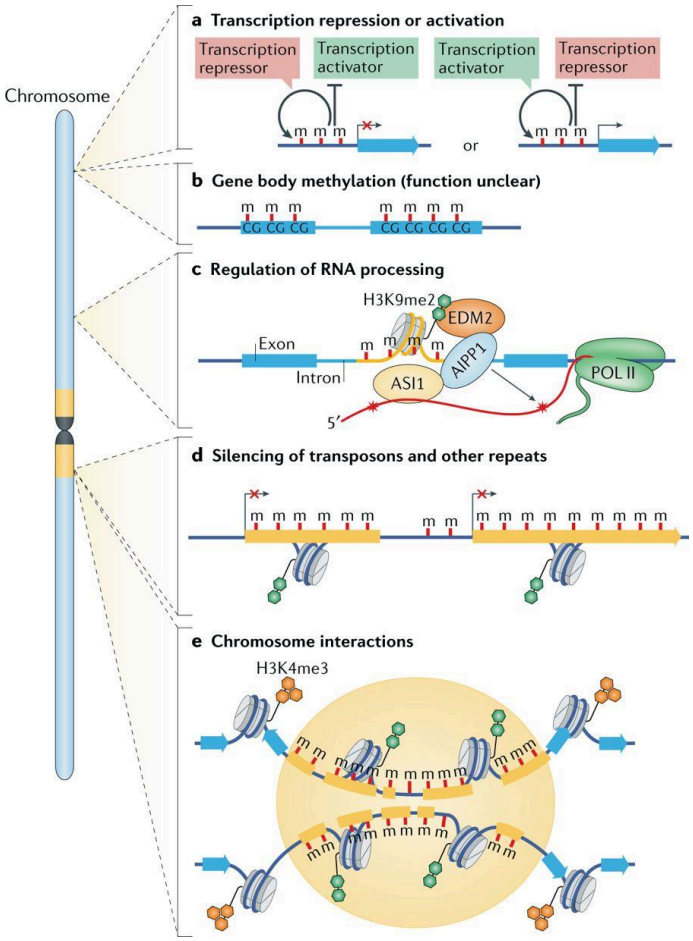


Figure 21 : Rôles des mécanismes épigénétiques et particulièrement de la méthylation de l'ADN chez les plantes (Zhang *et al.*, 2018).

La méthylation de l'ADN contrôle l'expression des gènes, les éléments transposables et les interactions entre chromosomes.
a. La méthylation de l'ADN (m) dans les promoteurs des gènes réprime couramment la transcription, mais dans certains cas, la transcription peut être augmentée.
b. La méthylation de l'ADN dans le corps des gènes se trouve principalement sur des sites CG, et ses fonctions sont encore peu connues.
c. La méthylation de l'ADN chez certains introns de l'hétérochromatine interagit avec le complexe ANTI-SILENCING 1 (ASI1)–ASI1-IMMUNOPRECIPITATED PROTEIN 1 (AIPP1)–ENHANCED DOWNY MILDEW 2 (EDM2) ce qui promeut la sélection d'autres sites de polyadénylation distale (astérisques rouges) durant le processus de création des ARNm. ASI1 s'associe avec la chromatine et se lie avec l'ARN ; EMD2 reconnait l'histone diméthylée H3 lysine 9 (H3K9me2) dans l'hétérochromatine.
d. La méthylation de l'ADN est également importante pour la régulation des éléments transposables et autres séquences répétées, qui sont principalement localisés dans les régions péricentromériques de l'hétérochromatine.
e. La méthylation de l'ADN est impliquée dans les interactions chromosomiques entre les régions péricentromériques et dans certains îlots hétérochromatines interactives, qui sont des régions de chromatine répressives situées sur les bras du chromosome euchromatique et sont caractérisées par des transposons abondants et un petit ARN.
Dans tous les panneaux, les transposons et autres répétitions sont en jaune et les gènes sont en bleu. Les régions chromosomiques noires et jaunes représentent respectivement les régions centromériques et péricentromériques POL II, RNA POLYMERASE II.

patron de méthylation au travers de la réplication. Les enzymes telles que les méthyltransférases 1 (MET1) maintiennent la méthylation sur des sites CG grâce à la reconnaissance du brin hémi-méthylé de l'ADN par un cofacteur (Law & Jacobsen, 2010). De la même manière, la méthylation sur le motif CHG peut être transmise au brin d'ADN répliqué grâce aux enzymes chromométhylases (CMT3). Enfin pour les motifs CHH, la voie des RdDM, avec les petits ARN cités précédemment, intervient conjointement avec les méthyltransférases DRM 1 et 2 (Eichten *et al.*, 2014 ; Niederhuth & Schmitz, 2017). Ces mécanismes de maintien de la méthylation permettent une stabilité et une transmission par mitose et méiose. D'autres mécanismes engendrent des déméthylations, d'abord par un manque de maintenance, mais aussi grâce à des enzymes telles que les glycosylases (Eichten *et al.*, 2014). On parle communément de déméthylase, chez Arabidopsis où la déméthylation active est catalysée par le gène Demeters (*DME*, *DML2* et *3*) (Pikaard & Mittelsten Scheid, 2014).

Rôle de la méthylation

Le niveau de méthylation est différent selon le contexte (CG, CHG, CHH), l'organisme et le stade de développement considéré. La méthylation ne se distribue pas de manière aléatoire le long du génome et touche les gènes, les séquences répétées et les transposons (Roudier *et al.*, 2009 ; Jones, 2012 ; Schübeler, 2015 ; Zhang *et al.*, 2018). Ainsi, la méthylation est souvent associée avec l'hétérochromatine. Par exemple, chez *Arabidopsis thaliana*, Cokus *et al.* (2008), ont montré un pourcentage de méthylation respectivement de 24%, 6,7% et 1,7% pour les motifs CG, CHG et CHH. La méthylation est aujourd'hui reconnue comme intervenant dans un nombre pléthorique de processus en lien avec le développement, la réponse aux stress, la variabilité phénotypique, l'inhibition des éléments transposables et plus généralement dans l'expression des gènes (Cui & Cao, 2014 ; Niederhuth *et al.*, 2016 ; Zhang *et al.*, 2018).

4.3.Les stratégies pour l'étude de l'épigénome

L'étude des mécanismes épigénétiques est complexe, car les variations génétiques et épigénétiques co-varient dans la nature. En d'autres termes, il est difficile de déterminer ce qui dans le phénotype est la

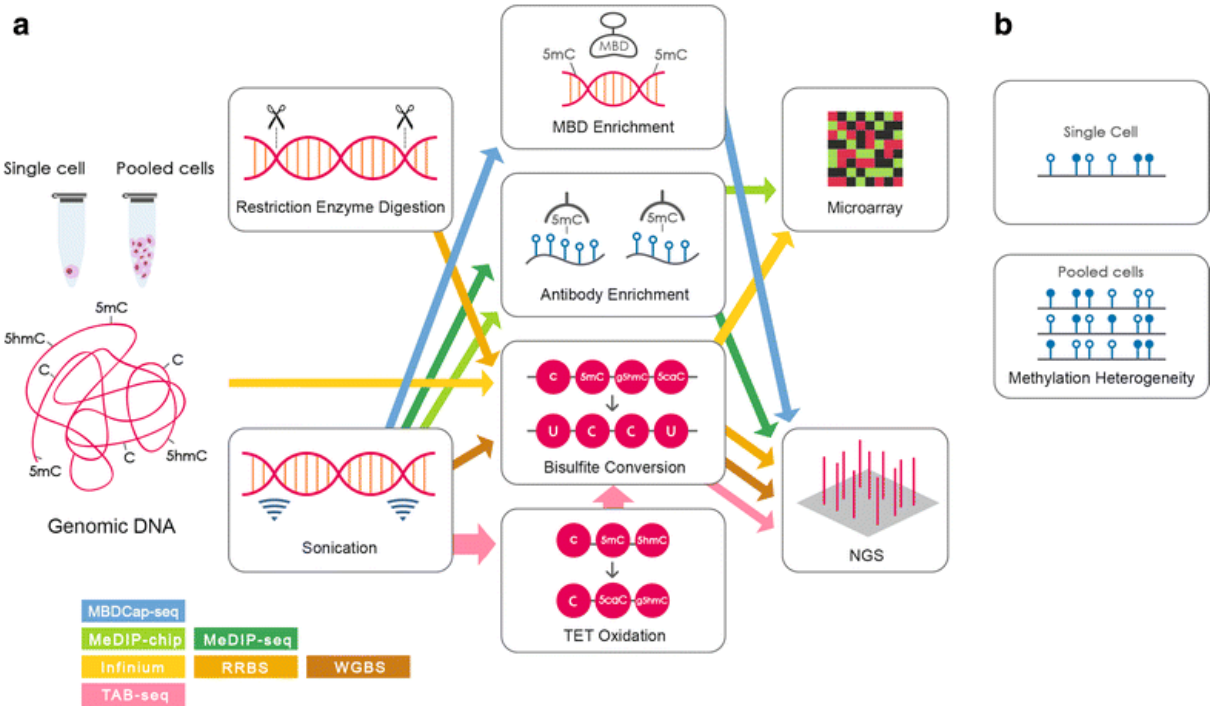


Figure 22 : Méthodes d'analyses génomiques de la méthylation de l'ADN (Yong *et al.*, 2016).

(a) Ces techniques impliquent la fragmentation de l'ADN génomique grâce à la digestion par des enzymes de restriction ou la sonication. L'ADN génomique est ensuite enrichi par des MBD «methyl-CpG binding domain» ou des anticorps, ou convertis par traitement bisulfite ou par oxydation TET. Pour finir, cet ADN est analysé par une plateforme microarray ou de séquençage.
(b) L'analyse de la méthylation de l'ADN à l'échelle d'une seule cellule implique son isolement. Les points bleus représentent les cytosines méthylées et les vides les cytosines non méthylées.

conséquence de la variation génétique et/ou de la variation épigénétique (Zhang *et al.*, 2013). Plusieurs stratégies permettent de surmonter cette difficulté.

La première stratégie consiste à étudier des systèmes présentant de faibles (à nulles) variations en séquence ADN, comme des populations clonales ou des lignées recombinantes (epiRILs) (Richards *et al.*, 2017). Ces dernières, créées artificiellement, possèdent une variabilité génétique faible, mais des divergences épigénétiques fortes.

La seconde stratégie cherche à produire des mutants dans des zones clés du génome pour la machinerie épigénétique, les modifications engendrées pouvant se répercuter sur le phénotype. L'étude des conséquences de l'utilisation d'un agent chimique modifiant les marques épigénétiques, comme la 5-azacytidine qui va perturber la méthylation de l'ADN, peut permettre de corréler phénotype et épigénétique (Bossdorf *et al.*, 2010).

Ces différentes approches bénéficient également des technologies développées ces quinze dernières années, notamment en génomique (Figure 22). Concernant l'étude de la méthylation de l'ADN, on peut citer trois grandes familles de techniques. La plus descriptive est la quantification de la méthylation globale par HPLC (Le Gac *et al.*, 2018). La seconde évoquée plus haut est l'utilisation de marqueurs sensibles à la méthylation (MS-AFLP) et permet de distinguer des profils de méthylation entre populations (Richards *et al.*, 2012). Les autres méthodes utilisent les méthodes de séquençage classique et bisulfite (*WGBS : whole genome bisulfite sequencing*) qui consistent à convertir à l'aide du bisulfite des cytosines non méthylées en uracile alors que les cytosines méthylées restent intactes, ce qui permet d'identifier les régions méthylées. On peut ainsi déterminer quels gènes sont différentiellement méthylés entre populations et environnements (van Gurp *et al.*, 2016).

5. Évolution génétique et espèces invasives

Parmi les dernières sources de flexibilité viennent les mécanismes génétiques. Ainsi, tout changement dans la séquence d'ADN qui peut permettre d'améliorer la valeur sélective, transmissible à la descendance et soumis à la sélection intervient comme moteur de l'adaptation. Pour qu'il y ait sélection naturelle, il faut une variation dans les traits au sein de la population, que ces traits possèdent des valeurs sélectives différentes (différences de fitness) et qu'il y ait transmission à la descendance vis-à-vis des traits considérés. Ainsi l'évolution génétique en réponse à la sélection naturelle est un processus long, mais cette évolution peut également se faire en quelques générations (Messer *et al.*, 2016). Parmi ces mécanismes, on retrouve les composantes de la théorie de l'évolution, comme les (1) mutations, (2) la dérive génétique, (3) les hybridations et la polyploïdie, ou encore, (4) les éléments transposables. Ces mécanismes sont encore peu étudiés chez les espèces invasives, mais font l'objet d'hypothèse forte.

5.1. Mutation

Ces mécanismes sont également importants dans l'évolution des espèces invasives qui subissent notamment un goulet d'étranglement génétique lors de l'introduction (Prentis *et al.*, 2008). En effet, une variabilité génétique importante au sein d'une population offre davantage d'opportunités d'allèles favorables. Les mutations de l'ADN, avec une fréquence de 7×10^{-9} mutation par site CG et par génération, sont un moteur de l'évolution et une source de flexibilité, tout comme les recombinaisons durant la reproduction (Ossowski *et al.*, 2010 ; van der Graaf *et al.*, 2015).

5.2. Dérive génétique

Quand le nombre d'individus introduits est généralement faible, il s'en suit souvent un effet de fondation qui peut conduire à une dépression de consanguinité. À cela s'ajoute la dérive génétique qui représente une modification de la fréquence d'un allèle d'un gène au hasard. D'après Monty et Mahy (2009), la dérive génétique est un des moteurs de la création de nouvelles espèces ainsi qu'un des processus évolutifs qui entrent en jeu lors de l'invasion.

5.3.Hybridation et Polyploïdie

Il est possible chez certains animaux et chez de nombreux végétaux de croiser deux espèces entre elles, ou des individus au sein d'une même espèce. On parlera alors respectivement de croisements interspécifique et intraspécifique. L'hybridation peut permettre la création d'une espèce invasive (Genton, 2005). De tels hybrides ont été observés chez les plantes invasives comme dans le cas de la spartine, *Spartina anglica,* qui est issue d'un hybride entre *S. alterniflora* et *S. maritima* (Kercher and Zedler, 2004). L'hybridation peut soit produire un hybride stérile soit donner de nouveaux génotypes pouvant être mieux adaptés à l'environnement, ceci par introgression de gènes favorables comme des gènes de résistances par exemple (Prentis *et al.*, 2008). Ces hybridations peuvent notamment mener à la création d'espèces polyploïdes. La polyploidïe est un doublement du génome qui peut se produire après une hybridation et restaurer la fertilité de l'hybride. Ce doublement peut être spontané : Autopolyploïde, ou se produire après croisement avec une autre espèce : Allopolyploïde. Chez des espèces présentant différents niveaux de ploïdie dans leur aire native, les populations invasives de ces mêmes espèces ont fréquemment des niveaux de ploïdie élevés. C'est le cas pour la renouée japonaise en Europe (*Fallopia japonica*) (Prentis *et al.* 2008).

Un nombre important de plantes invasives polyploïdes sont allopolyploïdes. En effet, l'allopolyploïdie aurait pour avantage de fixer l'hétérosis (vigueur hybride) en évitant les recombinaisons et de masquer les allèles délétères récessifs portés par l'un des deux parents (Soltis and Soltis, 2000; Comai, 2005; Pandit *et al.*, 2006).

5.4.Les éléments transposables

Les plantes subissent de nombreux stress qui peuvent entrainer des modifications morphologiques, mais également génétiques. L'une de ces modifications peut impliquer l'activation d'éléments transposables, ce qui peut conduire à l'extinction de certains gènes. Chez *Triticum aestivum* (le blé), il a été démontré que les rétrotransposons, sous l'action d'un stress abiotique, modifiaient le profil d'expression génétique de la plante (Prentis *et al.*, 2008). Les éléments transposables font l'objet d'un intérêt particulier dans de nombreux processus liés à la polyploïdie, la spéciation (Parisod *et al.*, 2009 ; Serrato-Capuchina & Matute, 2018) et l'adaptation rapide, notamment chez les espèces invasives (Schrader *et al.*, 2014 ;

Stapley *et al.*, 2015 ; Specchia & Pinna, 2017). Ces éléments transposables sont sous la régulation épigénétique de la méthylation de l'ADN (Galindo-González *et al.*, 2018). Ceci montre une fois de plus l'interaction entre ces différences sources de flexibilité.

Les sources de flexibilité interviennent conjointement et à différentes échelles de temps et participent ainsi à l'adaptation au sens large d'un organisme ou d'une population (Yona *et al.*, 2015). Ces mécanismes interviennent également à chaque étape du processus d'invasion (Figure 4) (Marin/Genitoni *et al.*, 2019). Dans mes travaux, je m'intéresserai particulièrement à l'adaptation au sens large et à l'acclimatation et notamment aux mécanismes de plasticité phénotypique et épigénétique en lien avec l'invasion du milieu terrestre par *Ludwigia grandiflora*.

IV. Objectifs de la thèse

1. Contexte des travaux dans le cadre de l'unité

Les travaux de cette thèse s'intègrent dans les problématiques des équipes EPIX (Ecologie évolutive des perturbations liées aux invasions biologiques et aux xénobiotiques ; https://www6.rennes.inra.fr/ese//L-UMR-ESE/Equipes-de-recherche/) de l'UMR ESE à Rennes et ARCHE (Arbres et Réponses aux Contraintes Hydriques et Environnementales; http://www.univ-orleans.fr/fr/lblgc/equipes/arbres-et-reponses-aux-contraintes-hydriques-et-environnementales) du LBLGC de l'Université d'Orléans.

L'équipe EPIX a pour objectif l'étude des perturbations écologiques d'origine anthropique liées aux espèces invasives et aux contaminants chimiques. J'ai pu bénéficier des publications du laboratoire sur la jussie et également de la littérature grise riche sur le sujet, en particulier les travaux de Jacques Haury (Haury *et al.*, 2011; Haury *et al.*, 2014) sur la caractérisation de la jussie et les méthodes de luttes. Cette thèse s'inscrit dans le projet de recherche de Dominique Barloy sur la jussie. Ses travaux cherchent d'une part à comprendre les mécanismes d'adaptation de *Ludwigia grandiflora* en réponse aux changements de milieux, particulièrement au niveau génétique. Et d'autre part, ils visent à décrypter l'impact des modes de reproduction de la jussie sur son potentiel invasif (Thèse de Luis Portillo, 2017-2020, financement Projet FEDER Centre Val de Loire – Agence de l'eau, 2017-2020). Les premiers résultats sur l'adaptation de la jussie au milieu terrestre ont été obtenus durant mon stage de master M2 réalisé en 2014 ainsi que durant celui de Kevin Billet (2015). Ces premiers travaux réalisés en conditions contrôlées ont confirmé l'existence de deux formes de jussie (forme aquatique et forme terrestre) comme identifiées par J. Haury sur le terrain. Ils ont également montré des comportements physiologiques différents de ces deux formes en fonction du milieu (milieu aquatique et milieu terrestre). Ces résultats ont servi de point de départ à mon travail de thèse.

L'équipe ARCHE, dirigée par Stéphane Maury, étudie les réponses des arbres aux contraintes environnementales, et notamment des mécanismes épigénétiques en lien avec la plasticité phénotypique

avec comme modèle d'étude le peuplier notamment dans le cadre du projet ANR EPITREE (2018-2021, https://www6.inra.fr/epitree-project/). Ainsi, le projet sur la jussie a pu disposer d'une expertise sur la stratégie épigénétique avec notamment les travaux de Lafon-Placette *et al.* (2013), réalisés sur le peuplier mais également la collaboration avec le Dr Jörg Tost pour une partie de (épi)séquençage (Laboratoire Épigénétique et Environnement, LEE, CNRGH CEA, Evry, France). Cette collaboration EPIX-ARCHE a été rendue possible par le réseau épigénétique, écologie et évolution (RTP3E, https://rtp-3e.wixsite.com/rt3e et son école chercheurs en 2015 à Oléron). La collaboration a ensuite été soutenue par le département EFPA par le biais d'un projet innovant et le cofinancement de ma bourse de thèse (Région Bretagne et INRA, 2016-2019). Le financement des travaux de thèse a été réalisé à travers un projet financé par l'ONEMA (Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques ; 2014-2017)

2. Objectifs spécifiques de la thèse

L'invasion secondaire des prairies inondables par la jussie dans un laps de temps court, 5 ans pour le marais de Mazerolles, questionne sa rapidité d'acclimatation et/ou d'adaptation à un nouvel habitat. Nous avons posé l'hypothèse que l'existence de deux morphotypes aquatique et terrestre reposait sur l'expression d'une plasticité phénotypique et de sources de flexibilité génétique et/ou épigénétique. Mon travail de thèse a été décliné autour de différentes questions : (1) Quelles sont les caractéristiques physiologiques des morphotypes aquatique et terrestre de *Ludwigia grandiflora* dans leur habitat d'origine et en réponse à un changement de milieu ? (2) Est-ce que la plasticité phénotypique est impliquée dans la réponse aux changements de milieu ? (3) Est-ce que les conditions de vie hétérogènes de la jussie en milieu terrestre (fluctuations du niveau d'eau) participent à son acclimatation ? (4) L'épigénome, *via* la méthylation de l'ADN, est-il une source de plasticité entre les deux morphotypes et entre les deux environnements (aquatique et terrestre) ?

Ce manuscrit est ensuite organisé comme suit : deux chapitres de résultats expérimentaux et un troisième chapitre de conclusion-discussion-perspectives générales sur les travaux de la thèse.

Tableau 6. Valorisation des travaux réalisés pendant ma thèse.

Liste publications	Titre	Doi	revue	chapitre	type
Billet *et al.*, 2018	Aquatic and terrestrial morphotypes of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora*, show distinct morphological and metabolomic responses	https://doi.org/10.1002/ece3.3848	Ecology and Evolution	1	Expérimental
Genitoni *et al.*, en prep	Aquatic and terrestrial morphotypes of the invasive plant L g exhibit distinct plasticity during the transition between environments in relation to their adaptive potential		Mis en forme pour Journal of Ecology (soumission fin 2019)	1	Expérimental
Marin/Genitoni *et al.*, 2019	Biological invasion: the influence of the hidden side of the (epi)genome	https://doi.org/10.1111/1365-2435.13317	Functional Ecology	2	Revue
Maury *et al.*, 2019	Phytohormone Crosstalk: The Missing Link For Developmental Plasticity?	https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00395	Frontiers in Plant Science	2	Opinion paper
Genitoni *et al.*, resoumission autorisée	Hypomethylation of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora*, mimics the adaptive transition into terrestrial morphotype		Physiologia Plantarum (re-soumission en novembre 2019)	2	Expérimental

La première partie des résultats vise à caractériser les deux morphotypes terrestre et aquatique de *Ludwigia grandiflora* en réponse aux changements de milieux au niveau physiologique (traits morphologiques, phytohormones et métabolomiques). J'ai également estimé la plasticité phénotypique de la jussie en réponse aux changements de milieux de ces deux morphotypes. L'objectif était ici de caractériser la plasticité phénotypique à l'échelle morphologique, physiologique et métabolique des deux morphotypes entre les deux environnements. Ce chapitre contient ainsi deux manuscrits : un publié (Billet *et al.*, 2018) dans Ecology and Evolution dont je suis 2ème auteur et un manuscrit en cours (Genitoni et al) dont je suis 1er auteur mis en format publication pour Journal of Ecology et intitulé «Aquatic and terrestrial morphotypes of the invasive aquatic plant L g exhibit distinct plasticity during the transition between environments in relation to their adaptive potential». Ces résultats sont valorisés à travers la rédaction d'un article (Tableau 6).

La deuxième partie des résultats, teste l'hypothèse épigénétique et son implication dans la plasticité de la jussie lors de la transition aquatique-terrestre. A cette occasion, j'ai participé à la rédaction de deux articles de revue et un article issu des travaux expérimentaux de ma thèse. Le premier article de revue, pour lequel je suis co-1er auteur avec Pierre Marin (doctorant de l'université de Lyon), est intitulé « Biological invasion: the influence of the hidden side of the (epi)genome » paru dans Functional Ecology (https://doi.org/10.1111/1365-2435.13317). Nous proposons un état des lieux des connaissances sur les liens entre épigénétique et espèces invasives. Le second article de revue est un Opinion Paper intitulé "Epigenetics and Phytohormone Crosstalk : The Missing Link For Developmental Plasticity?" publié dans Frontiers in plant science (https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00395). Il aborde notamment les liens entre balance hormonale et épigénétique. Le dernier article soumis en 2019 à *Physiologia plantarum* et intitulé « Hypomethylation of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora*, mimics the adaptive transition into terrestrial morphotype » vise à tester l'hypothèse d'une source épigénétique, ici la méthylation de l'ADN, dans la réponse aux changements de milieu de la jussie. Cet article qui a fait l'objet d'une revue par trois experts dans le domaine est en cours de modification et sera re-soumis avant la soutenance de ma thèse (Tableau 6).

Maintien en serre des morphotypes aquatique (Am) et terrestre (Tm)

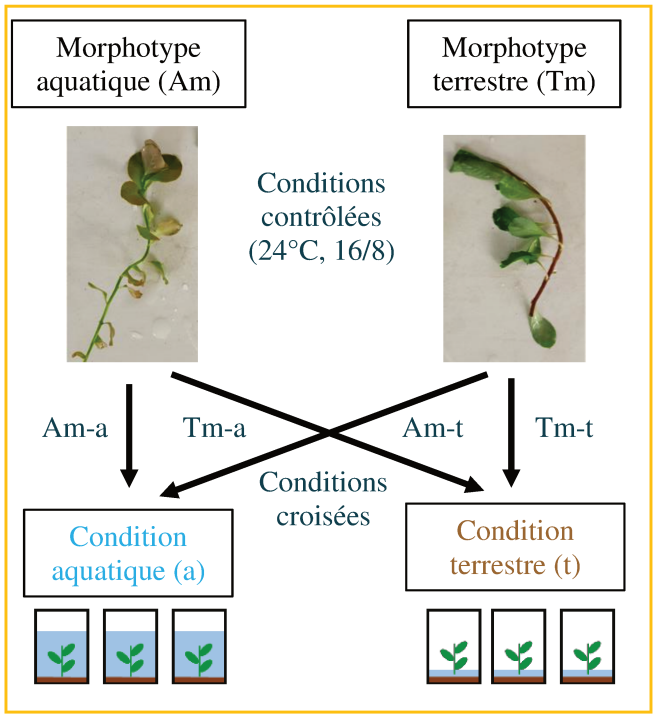
Pré conditionnement en conditions contrôlées

- 1 semaine condition aquatique
- 1 semaine en condition aquatique (Am-a et Tm-a) ou en condtion terrestre (Am-t et Tm-t

Codifications des morphotypes et des conditions

	Aquatique	Terrestre
Am	Am-a	Am-t
Tm	Tm-a	Tm-t

Dispositif commun



Méthodologies

Phenotypage

*Traits morphologiques :
-Longueur de la plante (Lp)
-Nombre de feuilles (nbL)
-Nombre d'entrenœuds (nbI)
-Nombre de bourgeons (nbB)
-Nombre de nœuds avec racine (nbNR)
-Biomasses fraiches des racines et tiges (FWS et FWR)
-Biomasse sèches des racines et tiges (DWS et DWR)
-Contenus en eau (Ratio des tiges, ratio des racines)

Effectifs : 12 plantes par morphotype x condition, 2 répétitions biologiques

*Dosage de 56 métabolites (sucres, acides aminés, polyols, acides organiques)
*Dosage de phytohormones (acide abscissique, auxine, acide jasmonique, acide salicylique)
*Dosage HPLC de la méthylation globale

Effectifs : 6 plantes par morphotype x condition, 3 répétitions biologiques

Chapitre I

Quelles sont les caractéristiques des deux morphotypes aquatique et terrestre ?

Première caractérisation des 2 morphotypes (Am et Tm)
(Expérience sur 7 jours (Billet *et al.*, 2018))

Analyse de laplasticité phénotypique

Expérience sur 1 mois avec phénotypage à 14 et 28 jours (Genitoni *et al.* en prep) et calcul des RDPI (Valladares *et al.*, 2006)

Chapitre II

La méthylation de l'ADN est-elle impliquée dans la réponse aux changements de milieu ?

Approche pharmacologique (Genitoni et al en révision)

Expérience sur 14 jours avec utilisation d'une drogue hypoméhylante la zébularine (150uM) (Baubec *et al.*, 2009)

Figure 23 : Dispositif expérimental commun.

Deux morphotypes aquatique et terrestre sont conduits en condition contrôlées dans leur environnement d'origine mais également en condition croisée. La condition aquatique correspond à une immersion complète de la plante. La condition terrestre consiste à un niveau d'eau affleurant la surface du sol.

Enfin, nous avons mis au point et réalisé les premières étapes d'une stratégie originale en épigénomique qui prend en compte l'absence de ressources génomiques chez *Ludwigia grandiflora* et *Ludwigia peploides*. Ce travail en collaboration avec Dr Jörg Tost (Laboratoire Épigénétique et Environnement, LEE, CNRGH CEA, Evry, France) a permis de réaliser en août 2019 le séquençage et épi-séquençage des 2 morphotypes acclimatés dans les 2 environnements. Les données obtenues en fin de thèse feront l'objet d'un point de perspectives à la fin de ce manuscrit.

Dans une dernière partie, l'ensemble des résultats obtenus au cours de ma thèse seront discutés. J'aborderai notamment les questions ouvertes suivantes : (1) Quelles stratégies développées pour l'étude de l'adaptation de la jussie au milieu terrestre ? (2) Comment estimer le rôle des sources de flexibilité génétique et épigénétique dans l'adaptation de la jussie au milieu terrestre ? (3) Les espèces invasives représentent-elles des modèles pertinents pour l'étude des mécanismes épigénétiques ?

3. Stratégie et dispositif

Le matériel biologique a été prélevé dans le marais de Mazerolles. Afin de tenir compte d'une éventuelle diversité génétique au sein de la population de jussie, 5 prélèvements par morphotype ont été réalisés sur le terrain, chaque point de prélèvement étant séparé de 10 m, soit des prélèvements sur une distance de 40 m. (Figure 23). Les plantes ainsi prélevées ont été maintenues dans leur condition originelle (aquatique pour le morphotype aquatique et terrestre pour le morphotype terrestre) en serre au sein de l'unité expérimentale U3E (https://www6.rennes.inra.fr/u3e). Toutes les expériences de ma thèse ont été réalisées à partir de ce matériel.

Pour répondre aux différents objectifs de la thèse, nous avons mis en place différentes approches s'articulant autour d'un dispositif expérimental commun. La stratégie retenue consiste en une mise en place d'expérimentations en conditions contrôlées basées sur le changement de milieu (aquatique *versus* terrestre) des morphotypes aquatique et terrestre de *Ludwigia grandiflora* (Figures 23). Ainsi, les deux morphotypes sont élevés dans leur condition d'origine et dans la condition reverse (terrestre pour le

Tableau 7. Stratégie globale et spécificités des dispositifs expérimentaux réalisés pendant ma thèse.

Problématique	**Adaptation de la jussie au milieu terrestre**			
Structuration	Chapitre 1		Chapitre 2	
Questions de recherche	Quelles sont les caractéristiques physiologiques des morphotypes aquatique et terrestre de *Ludwigia grandiflora* dans leur habitat d'origine et en réponse à un changement de milieu?	Les conditions de vie hétérogène (fluctuation du niveau d'eau) participent-t-elle à l'acclimatation du morphotype terrestre ?	L'épigénome, *via* la méthylation de l'ADN, participe-t-il à la transition du milieu aquatique au milieu terrestre de la jussie ?	
Stratégie globale	Stratégie commune basée sur le conditionnement croisé de deux morphotypes aquatique et terrestre de jussie en conditions contrôlées.			
Spécificités	(1) Première caractérisation des morphotypes : Expérimentation conduite sur 1 semaine (2) Analyse de la plasticité phénotypique : Expérimentation conduite sur 1 mois (T14 et T28 jours)	Mise en place d'une alternance dans les niveaux d'eau pour les morphotypes aquatique et terrestre (3) En chambre de culture durant 1 mois : 7 jours en aquatique puis 7 jours en terrestre (2 cycles) (4) En serre durant 8 mois : Mise en place d'une alternance du niveau d'eau 14 jours en condition aquatique puis 14 jours en condition terrestre pour le morphotype aquatique	(5) Approche pharmacologique : Utilisation d'une drogue hypométhylante ; expérimentation sur 14 jours	(6) Approche épigénomique : Morphotypes maintenus en serre dans leur condition d'origine et en réponse au changement de milieu (Am-a, Am-t, Tm-a et Tm-t)
Méthodes communes	Analyses physiologiques (traits morphologiques et dosage de métabolites)			
Méthodes spécifiques	Analyse de la plasticité phénotypique (2, 3 et 4) Dosage de phytohormones (2)		Analyse du pourcentage méthylation globale et dosage de phytohormones (5)	Séquençage classique et séquençage bisulfite (6)

morphotype aquatique et aquatique pour le morphotype terrestre) durant des durées et spécificités variables selon l'expérience (Tableau 7). Une étape de pré-conditionnement a été intégrée afin de favoriser l'enracinement des boutures avant de les conduire en condition aquatique et en condition terrestre (Figure 23). Pour chaque question scientifique, une méthodologie commune a été mise en place avec des analyses physiologiques qui consistaient à mesurer des traits morphologiques (Figure 23) et des dosages d'une soixantaine de métabolites impliqués dans des grandes voies physiologiques comme la respiration la glycolyse, la fermentation… (Figure 23, Tableau 8) (en collaboration avec David Renault, UMR CNRS 6553 EcoBio, Université de Rennes 1, France). Ces mesures ont été complétées dans certains cas par des dosages de phytohormones (réalisées sur le Plateau Technique de Chimie du Végétal, Institut Jean-Pierre Bourgin de Versailles par Sylvie Citerne ; Figure 23). Ces analyses ont permis la comparaison entre morphotypes et conditionnements et ainsi participé à la caractérisation des deux morphotypes.

Dans le premier chapitre, la caractérisation des deux morphotypes a été réalisée à travers deux expérimentations en conditions contrôlées (Tableau 7, première colonne, Figure 23). La première s'est déroulée sur une durée de sept jours et la seconde sur une durée d'un mois avec des mesures à 14 et 28 jours, chacune étant valorisée par un article scientifique. La spécificité du deuxième dispositif réside, en partie dans la durée d'expérimentation et la quantification de certaines phytohormones, mais surtout, elle a permis d'évaluer la plasticité phénotypique des traits mesurés ainsi que de son évolution au cours du temps. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'hypothèse de l'alternance des niveaux d'eau comme un facteur important dans l'acclimatation de la jussie au milieu terrestre (Question 3, Tableau 7 deuxième colonne). Pour tester cela, nous avons mis au point une stratégie reposant sur deux dispositifs. Le premier dispositif visait à faire varier les niveaux d'eau pour les morphotypes terrestre et aquatique en conditions contrôlées et de simuler ainsi l'alternance de condition aquatique et de condition terrestre durant 1 mois. Chaque cycle dure 2 semaines (7 jours en condition aquatique puis 7 jours en condition terrestre), et 2 cycles d'alternance ont été réalisés (Tableau 7, deuxième colonne). Le second dispositif repose sur le même principe, mais sur une durée de 8 mois (Tableau 7) et a été conduit en serre. Chaque cycle d'alternance dure un mois avec un changement de milieu tous les 15 jours. Cette stratégie est abordée dans la discussion du chapitre I.

Tableau 8. Métabolites ciblés lors des analyses métaboliques

Familles	Métabolites
Acides aminés	Alanine, Asparagine, Aspartate, Citrulline, GABA, Glutamate, Glycine, Isoleucine, Leucine, Lysine, Méthionine, Ornithine, Phénylalanine, Proline, Serine, Thréonine, Tyrosine, Valine
Acides organiques	Acide phosphorique, Acide quinique, Ascorbate, Citrate, Fumarate, Galactonolactone, Galacturonate, Glycérate, Lactate, Malate, Pipecolate, Succinate
Polyamines	Cadavérine, Ethanolamine, Putrescine, Spermidine, Spermine
Polyols	Adonitol, Arabitol, Erythritol, Galactitol, Glycerol, Glycerol-3-Phosphate (Glycérol3P), Inositol, Mannitol, Sorbitol, Xylitol
Sucres	Fructose-6-Phosphate (F6P), Fructose, Glucose-6-Phosphate (G6P), Galactose, Glucose, Maltose, Mannose, Ribose, Tréhalose, Xylose

Dans le second chapitre, nous avons posé l'hypothèse d'un rôle de la méthylation de l'ADN dans la réponse au changement de milieu de *Ludwigia grandiflora*. Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé le dispositif expérimental en conditions contrôlées commun au chapitre 1, en y ajoutant une approche pharmacologique sur une durée de 14 jours. En effet, nous avons utilisé une drogue hypométhylante qui perturbe les méthylations de l'ADN *de novo* (Tableau 7, troisième colonne). La comparaison des différents traits morphologiques et de biomasse, des quantités de phytohormones et métabolites en réponse à cette drogue. Pour aller plus loin, nous avons également mis au point une stratégie épigénomique reposant sur le séquençage classique et bisulfite des deux morphotypes dans leur condition originelle et en réponse au changement de milieu (Tableau 7, quatrième colonne et voir Chapitre II pour plus de détails).

CHAPITRE I :

Caractérisation des morphotypes terrestre et aquatique

I. Introduction

1. Contexte de l'étude

L'invasion d'une grande partie des cours d'eau du territoire français par la jussie témoigne de sa capacité de dispersion et de nuisance. Plus récemment, *Ludwigia grandiflora* a été observée dans des prairies humides et en zone terrestre où elle est également invasive (Haury *et al.*, 2014). Sur le terrain, on observe deux formes de jussies (morphotypes), une forme aquatique, et une forme dite terrestre. Ces deux morphotypes se distinguent par leur morphologie, leur cycle de vie et évidemment le milieu dans lequel elles se développent (voir introduction). Cette invasion secondaire peut être très rapide puisque le laps de temps entre l'apparition de la jussie en milieu aquatique et l'invasion des prairies humides a été de 5 ans pour les marais de Mazerolles (près de Nantes, France, entre 1995 et 2000) et de l'Isac (près de Redon, France, entre 2000 et 2005). À ce jour, nous manquons d'informations expliquant la capacité de la jussie à s'acclimater/s'adapter dans un laps de temps court à un nouvel environnement. L'invasion secondaire des prairies peut engendrer la perte d'aide financière de l'Europe pour les agricultures et questionne les capacités d'adaptation et d'acclimatation de la jussie.

2. Objectif de l'étude

L'objectif de notre étude est de caractériser les deux formes de *Ludwigia grandiflora* en réponse au changement de milieu (aquatique versus terrestre). Il a déjà été montré sur le terrain des différences au niveau morphologique entre le morphotype aquatique et le morphotype terrestre (Haury *et al.*, 2014). Nous faisons l'hypothèse que ces différences sont en partie liées à l'expression d'une plasticité phénotypique différente entre les 2 morphotypes, mais également à des différences génétique et/ou épigénétique. Il s'agira dans ce chapitre de présenter les résultats obtenus pour répondre aux questions suivantes :

(1) quelles sont les caractéristiques physiologiques des morphotypes aquatique et terrestre de *Ludwigia grandiflora* dans leur habitat d'origine et en réponse à un changement de milieu ?

(2) Existe-t-il des différences de plasticité phénotypique entre les deux morphotypes en lien avec leur acclimatation à leur environnement d'origine ?

(3) les conditions de vie hétérogènes de la jussie en milieu terrestre (fluctuations saisonnières du niveau d'eau) participent-elles à son acclimatation en morphotype terrestre ?

Pour réaliser ces objectifs, deux étapes ont été effectuées.

1 – La réalisation d'une synthèse bibliographique sur les contraintes et les adaptations relatives aux milieux aquatique et terrestre chez les plantes. Ce travail est complété par une partie spécifique traitant de la plasticité phénotypique et son lien avec les invasions biologiques et les milieux aquatiques.

2 – La caractérisation des deux morphotypes à travers une approche expérimentale. Cette dernière consiste à conduire les deux morphotypes dans les conditions aquatique et terrestre et à comparer leurs traits morphologiques et les quantités de certains métabolites et phytohormones. Ces travaux ont été valorisés par deux publications (une acceptée et l'autre en préparation) : la première de Billet *et al.* (2018) (Ecology and Evolution, https://doi.org/10.1002/ece3.3848) pour laquelle j'ai contribué à la mise en place de l'expérimentation, au recueil d'une partie des données (stage de M2) et à la correction du manuscrit. La seconde publication, (Genitoni *et al.*, en préparation pour la revue « Journal of Ecology ») a permis d'affiner la caractérisation en y ajoutant un volet sur la plasticité phénotypique.

3 – Enfin, nous avons testé l'impact de fluctuation d'eau sur la physiologie de la jussie. Pour ce faire, nous avons mené deux expérimentations en conditions contrôlées. La première concerne une expérience réalisée en chambre de culture sur une période d'un mois. La seconde a été effectuée en chambre de culture à partir de plantes ayant subi de variations de niveaux d'eau en serre sur une période de 8 mois. L'analyse de ces résultats en fin de thèse n'est pas encore finalisée, mais l'approche menée et les premiers résultats sont présentés dans la partie discussion de ce chapitre.

II. Contraintes et adaptation des plantes aux milieux aquatique et terrestre

1. Contraintes des milieux aquatique et terrestre

Les milieux aquatiques ou zones humides (wetlands en anglais) regroupent selon la convention de Ramsar (traité international adopté en 1971) une grande variété d'écosystèmes : « étendues de marais, de fagnes, de tourbières ou d'eaux naturelles ou artificielles, permanentes ou temporaires, où l'eau est stagnante ou courante, douce, saumâtre ou salée, y compris les étendues d'eau marine dont la profondeur à marée basse n'excède pas six mètres ». Les organismes vivants dans des zones humides subissent la submersion (flooding en anglais). Cela peut faire référence à la submersion des racines (waterlogging) et de tout ou partie de la plante (Sasidharan *et al.*, 2018). La submersion peut être une condition stressante pour les plantes non adaptées à cet environnement. L'importance du stress dépend de plusieurs facteurs comme la profondeur, la turbidité de l'eau, la présence de courant ou encore le caractère salé ou non de l'eau. En effet, la submersion complète ou partielle modifie l'accessibilité pour la plante à la lumière et aux gaz (0_2 et $C0_2$) ce qui peut mener à un état d'hypoxie (faible concentration en oxygène) voire d'anoxie (absence d'oxygène). En effet, la diffusion des gaz dans l'eau est réduite, de l'ordre de -10^4 fois environ, par rapport à sa diffusion dans l'air (Bailey-Serres *et al.*, 2012).

Les environnements terrestres présentent des contraintes reposant sur les mêmes propriétés physico-chimiques que celles présentées pour le milieu aquatique. En effet, le milieu terrestre se définit par une accessibilité plus importante à la lumière et aux gaz tels que l'oxygène et le dioxyde de carbone. Les environnements terrestres présentent une disponibilité en eau variable allant de sols hydromorphes riches en eau à des sols touchés par la sécheresse. De même, une composition physicochimique différente de celle du milieu aquatique et dépendante de la nature du sol caractérise le milieu terrestre. Les conditions terrestres peuvent être perçues comme un stress pour les plantes. Ainsi, la quantité

Tableau I-1. Ajustements morphologiques en réponse à la submersion (flooding) (Garssen *et al.*, 2015).

Plant trait	Author	Trait explanatory for response success during flooding (number of papers from a total of 39)
Increase shoot biomass / shoot elongation	Asamoah & Bork, 2010+; Banach *et al.*, 2009+; Hussner *et al.*, 2008+; Kercher *et al.*, 2004+, Klimesova, 1994; Lowe *et al.*, 2010+; Smith & Moss, 1998+; Van der Sman *et al.*, 1993+; Visser *et al.*, 2000+; Voesenek *et al.*, 1992+.	9
Aerenchyma development / increased root porosity	Chen *et al.*, 2002+; Chen *et al.*, 2009*; Hussner *et al.*, 2008+; Kercher *et al.*, 2004+; Lenssen *et al.*, 1998; Li *et al.*, 2006+; Luo *et al.,* 2011*; Nabben *et al.*, 1999*; Pezeshki *et al.*, 1998+; Sakio, 2005*; Smith & Moss, 1998*; Stoecker *et al.*, 1995+; Visser *et al.*, 2000+; Voesenek *et al.*, 1992+.	8
Adventitious root development	Banach *et al.*, 2009+; Chen *et al.*, 2002+; Kercher *et al.*, 2004+; Klimesova, 1994; Li *et al.*, 2006; Lockhart *et al.*, 2012*; Lowe *et al.*, 2010*; Nabben *et al.*, 1999*; Natale *et al.*, 2010*; Pezeshki *et al.*,1998*; Sakio, 2005*; Schaff *et al.*, 2002*; Stoecker *et al.*, 1995; Tallent-Halsell & Walker, 2002+; Voesenek *et al.*, 1992*.	4
Stomatal closure / increased stomatal regulation	Chen *et al.*, 2009*; Li *et al.*, 2004+; Nakai *et al.*, 2010+; Pezeshki *et al.*, 1998+; Smith & Moss, 1998+; Li *et al.*, 2006; Nakai *et al.*, 2009*.	4
Slowdown of growth; decrease in leaf area / reduced transpiration area	Chen *et al.*, 2009; Luo *et al.,* 2011; Nakai *et al.*, 2009+; Nakai *et al.*, 2010+; Pezeshki *et al.,*1998+; Van der Sman *et al.*, 1993+.	4
Hypertrophic lenticels development	Nakai *et al.*, 2009+, Nakai *et al.*, 2010+; Lockhart *et al.*, 2012*; Pezeshki *et al.*, 1998+; Sakio, 2005*, Tallent-Halsell & Walker, 2002.	3

+ = les traits expliquent la tolerance à la submersion* = les traits mentionnés dans l'article sont importants pour l'ajustement mais testés expérimentalement dans d'autres études
pas de symbole = traits mentionnés dans l'article comme importants dans la réponse à la submersion.

importante d'UV reçus peut surcharger les photosystèmes, ce qui va provoquer une production d'espèces réactives d'oxygène (ROS) (Wang *et al.*, 2018). Par ailleurs le manque d'eau dans le sol peut conduire à un stress hydrique.

Les plantes possèdent différentes stratégies pour éviter les stress environnementaux que peuvent être la submersion ou la sécheresse. Le premier moyen est appelé l'échappement (escape en anglais), c'est la capacité d'une plante à faire son cycle biologique en dehors des conditions défavorables. La seconde stratégie appelée évitement (avoïd en anglais) consiste à mettre en place des structures morphologiques, anatomiques permettant d'échapper aux stress. Enfin, la stratégie dite de tolérance représente la capacité de la plante à endurer directement le stress et à y répondre pour maintenir sa croissance et sa survie (Basu *et al.*, 2016)

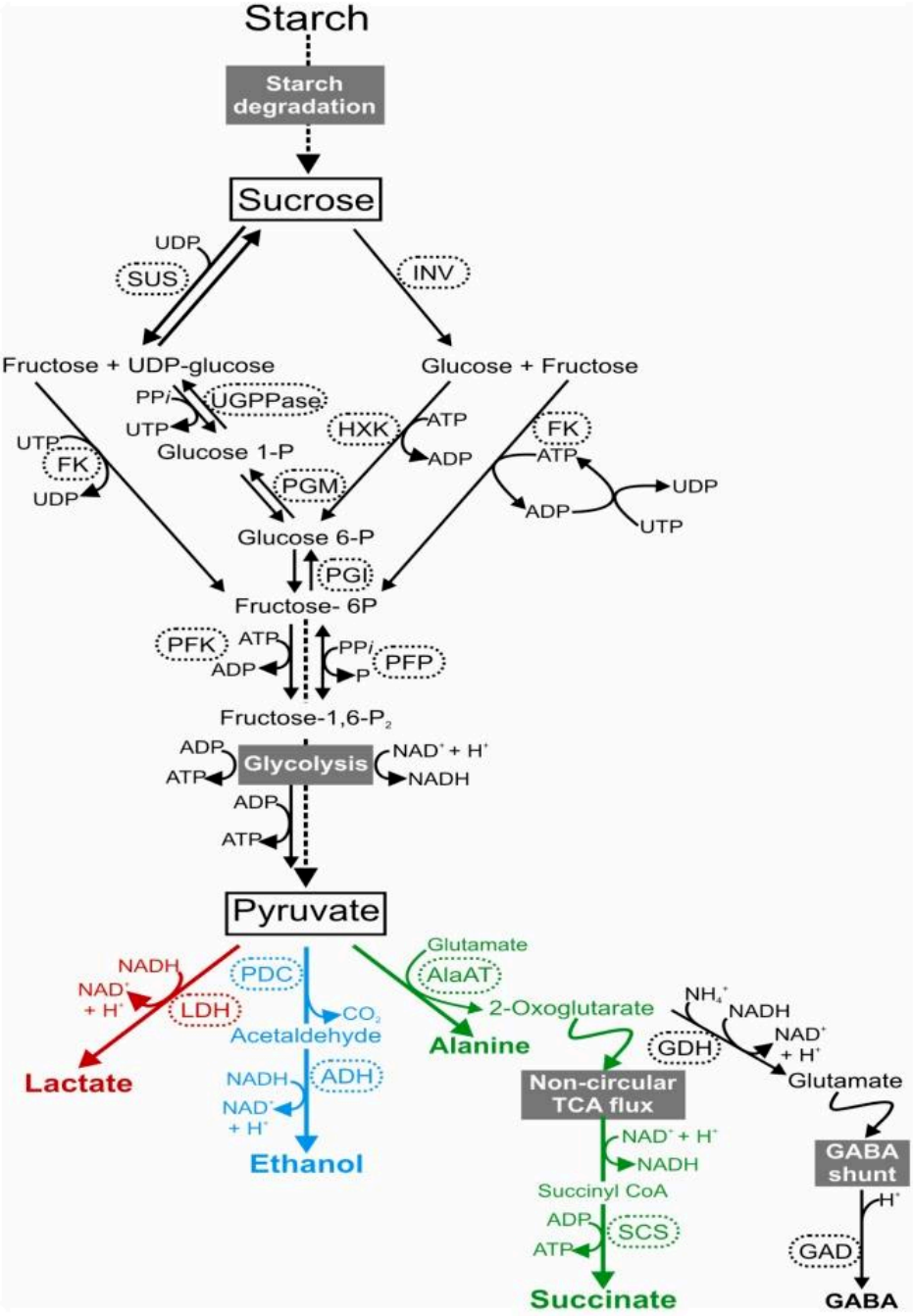


Figure I-1 : Voies métaboliques principales impliquées dans la réponse à un stress hydrique (Banti *et al.*, 2013).

Sous de faibles quantités d'oxygène, les plantes reconfigurent leur métabolisme pour maximiser la production d'ATP. Trois voies fermentatives sont activées en utilisant le pyruvate comme substrat de départ, dérivé du catabolisme du sucre et de la glycolyse. Les produits directs de ces voies et d'autres métabolites impliqués dans ce mécanisme sont indiqués en gras. Abréviations : Alaat, alanine aminotransférase; ADH, alcool déshydrogénase; GABA, acide γ-aminobutyrique; GAD, acide glutamique décarboxylase; FK, fructokinase; GDH, glutamate déshydrogenase; HXK, hexokinases; INV, invertase; LDH, lactate déshydrogenase; PDC, pyruvate décarboxylase; PFK phosphofructokinase ATP-dépendant; PFP, phosphofructokinase Ppi-dépendant; PGI, glucose-6-phosphate isomerase; PGM, phosphoglucomutase; SCS, succinyl Coa; SUS, sucrose synthase; TCA, tricarboxylique

2. Réponses des plantes à la submersion et à la sécheresse

Les évènements de modifications d'accessibilité à l'eau (sécheresse et submersion) sont particulièrement bien étudiés chez les plantes cultivées, car cela constitue une menace pour la production végétale (Fukao *et al.*, 2019).

2.1.Réponses des plantes au milieu aquatique

2.1.1. La submersion

La submersion peut, par la diminution d'oxygène dans les racines et la réduction de l'efficacité de la photosynthèse due à une quantité de lumière plus faible, mener à une réduction de la croissance et *in fine* à la mort de la plante. Les plantes, pour faire face à ces stress, vont mobiliser des réponses morphologiques et métabolomiques spécifiques.

Parmi les réponses morphologiques on peut citer, la production de racines adventives (Steffens & Rasmussen, 2016), la création d'aérenchymes, l'élongation des tiges pour préserver l'apport en oxygène (Tableau I.1). Les plantes ajustent leur physiologie via la fermeture de leurs stomates, une diminution de la surface des feuilles qui conduit à une réduction de la surface de transpiration. Ces modifications conduisent à une diminution de l'activité photosynthétique et indirectement de la croissance de la plante (Tableau I.1)

En parallèle des réponses morphologiques, les plantes voient leur métabolisme modifié en l'absence d'oxygène. Ce manque d'oxygène conduit à une diminution du flux d'électrons des chaines respiratoires, ce qui amène la plante à utiliser d'autres voies. On observe alors le passage de la respiration à la fermentation qui est un marqueur du métabolisme sous condition anaérobique. Ce métabolisme implique trois voies que sont celles des carbohydrates, de la glycolyse et de la fermentation (Banti *et al.*, 2013) (Figure I.1). La fermentation consiste en une conversion du pyruvate, produit de la glycolyse, en éthanol et acide lactique (fermentation éthanolique et fermentation lactique). Ce processus permet la production de NAD+ qui alimente la glycolyse pour produire de l'énergie sous forme d'ATP.

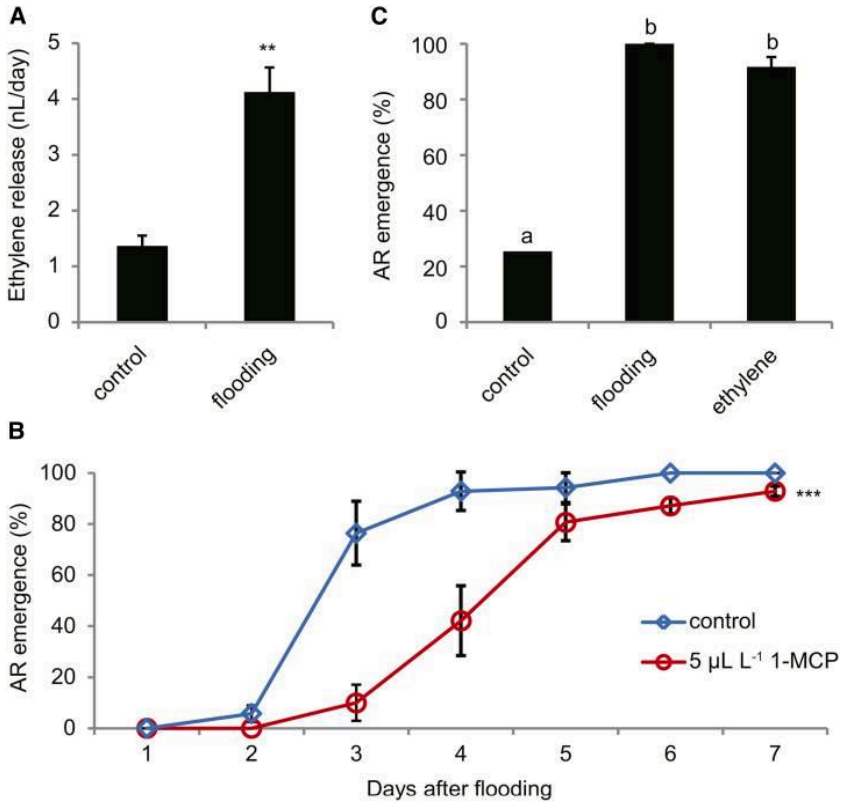


Figure I.2 : Rôle de l'éthylène sur la formation de racines adventives lors d'un stress à la submersion (Dawood *et al.*, 2016).

L'éthylène est un important régulateur de l'activation des racines adventives induite par la submersion. A, Libération d'éthylène de la tige de *S. dulcamara* après 24h de submersion (flooding). B, Effet de l'inhibition de la perception de l'éthylène par 1-methylcyclopropene (1-MCP) sur la production de racines adventives durant 7 jours après submersion. C, Effet du traitement à l'éthylène (contrôle), immersion partielle (inondation) ou 4 $\mu L.L^{-1}$ éthylène (éthylène) sur les racines adventives.

Dawood *et al.* (2016) ont étudié les voies de signalisation impliquées dans la formation des racines adventives en réponse à la submersion et à l'hypoxie chez *Solanum dulcamara* ou Morelle douce-amère (plante utilisée en phytothérapie). Ces auteurs ont analysé le transcriptome en réponse à ce stress et montrent qu'il y a 3354 gènes différentiellement exprimés dans les racines adventives, la tige ou les deux tissus en réponse à la submersion. Un certain nombre de ces gènes étaient impliqués dans les voies de biosynthèses et de signalisation des phytohormones. Ces auteurs ont également traité les plantes avec différentes phytohormones et montré que la submersion mène à une accumulation d'éthylène à la base de la tige puis à une baisse du niveau d'acide abscissique dans les racines adventives (Figure I.2). L'utilisation d'un inhibiteur de la perception de l'éthylène retarde également la production de racines adventives (Figure I.2c). Ces travaux montrent que l'éthylène a un rôle central dans la production de racines adventives en réponse à la submersion.

Loreti *et al.* (2016) synthétisent ces réponses possibles dans la Figure I.3. L'éthylène joue un rôle central dans la réponse des plantes à la submersion (Loreti *et al.*, 2016). L'éthylène interagit avec d'autres phytohormones et les ROS pour favoriser le développement des racines primaires et adventives (Figure I.3a). Les impacts sur la morphologie et le métabolisme de la plante sont différents selon la durée du stress et le type de stratégie employée par l'organisme. Lors d'un stress court, la plante peut via une stratégie d'échappement (escape) jouer sur son métabolisme (glycolyse), sur la mise en réserve des ressources ou encore le développement de réponse morphologique comme l'élongation des tiges et la production de racines adaptées (Figure I.3). Lorsque le stress est plus long, la plante peut retrouver le contact avec l'air et ainsi une photosynthèse et des concentrations d'oxygène normales.

Ce sont les interactions entre l'ABA, l'auxine et l'éthylène qui régulent la production de racines adventives en réponse à la submersion (Fukao *et al.*, 2019). Fukao *et al.* (2019) font la synthèse des avancées sur la réponse des plantes face au stress de la submersion (flooding et waterlogging). Ils montrent en particulier les interactions complexes existant entre les mécanismes permettant la perception du stress et ceux qui sont impliqués dans la réponse des plantes (Figure I.4).

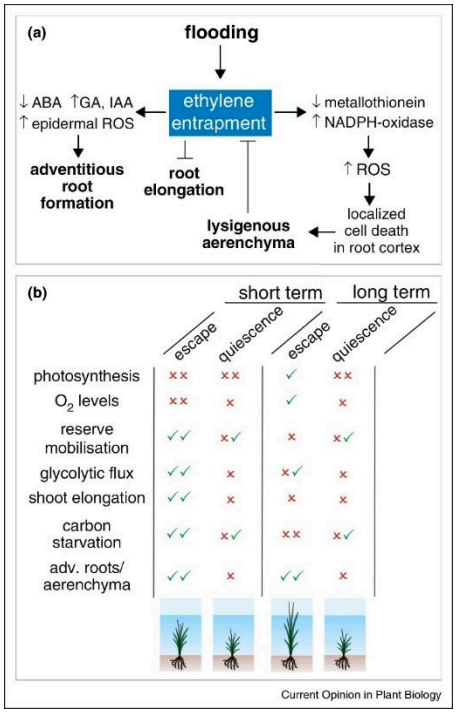


Figure I.3 : Stratégies et réponses des plantes à la submersion (Loreti *et al.*, 2016).

L'éthylène est un régulateur essentiel pour la croissance (a) et le développement des racines (b) durant un stress de submersion (flooding et waterlogging). Durant une submersion complète, les stratégies de croissances induites par l'éthylène sont essentielles à la survie (a), mais les deux ont des effets différents à court et à long terme sur les performances de la plante, notamment lorsque la submersion est longue, car certaines plantes auront retrouvé le contact aérien. Naturellement, la photosynthèse est fortement réduite par la submersion, mais via la stratégie d'évitement, une certaine photosynthèse peut être récupérée par le rétablissement du contact aérien. Cela réduit par la suite le besoin de mobilisation des réserves et limite la pénurie d'oxygène par des aérenchymes. Dans un premier temps, les plantes évitant le stress auront de faibles niveaux internes d'O_2, en raison de leur activité métabolique élevée qui est alimentée par un fort flux glycolytique et la mobilisation de réserves. Ces exigences élevées signifient généralement que les plantes souffrent fortement de la pénurie de carbone. Ces effets sont atténués une fois le contact aérien réalisé. Les plantes ayant une stratégie impliquant une faible activité (quiescence), leurs besoins en réserves et en énergie sont limités. Par la suite, les niveaux internes d'O_2 seraient à un état stable et la pénurie de carbone serait considérablement plus faible. Toutefois, les plantes comptent toujours sur la mobilisation des réserves pour maintenir leurs fonctions cellulaires, tant pendant la submersion à court terme que pendant celles à long terme. Le développement des racines est également essentiel pour survivre aux inondations. L'environnement aquatique empêche l'éthylène de quitter facilement les tissus végétaux par diffusion gazeuse. Ce piégeage de l'éthylène amorce une cascade qui entraîne un changement dans l'architecture de la racine (b), par exemple la formation de racines adventices. Cela comprend une cascade hormonale et la mort de cellules épidermiques induite par les ROS.

Ces mécanismes combinent les voies de la glycolyse et de la fermentation, des espèces réactives d'oxygène (oxyde nitrite par exemple) et des carbohydrates (Figure I.4a) en interaction avec des facteurs de transcription (Figure I.4b,c)

Au niveau génétique, chez *Arabidopsis thaliana*, le facteur de transcription ERF-VII (groupe VII ethylene response factor) qui régule notamment 5 gènes (HRE1, HRE2, RAP2.2, RAP2.3, et RAP2.12) est impliqué lors de stress de submersion (Gasch *et al.*, 2016) (Figure I.4c ; Fukao *et al.*, 2019). Plus récemment, des études se sont intéressées aux rôles des micro ARN (miRNA) dans la tolérance à la submersion (Fukao *et al.*, 2019). Chez les plantes, les miRNAs sont de petits ARN qui régulent l'expression des gènes en ciblant les ARN messagers (Rogers and Chen, 2013). Il a été montré, chez le maïs en réponse à la submersion (waterlogging), que le microARN miR159 régulait deux ARN messagers codant les génes GAMYBs, MYB33, et MYB101. Ces gènes sont impliqués dans la croissance des racines primaires chez *A. thaliana* et seraient donc inhibés par miR159 (Liu *et al.*, 2012). Malgré une littérature riche sur le sujet, les différents mécanismes de réponse à la submersion ne sont pas encore élucidés et certains restent peu étudiés comme l'activation des éléments transposables en réponse à la submersion.

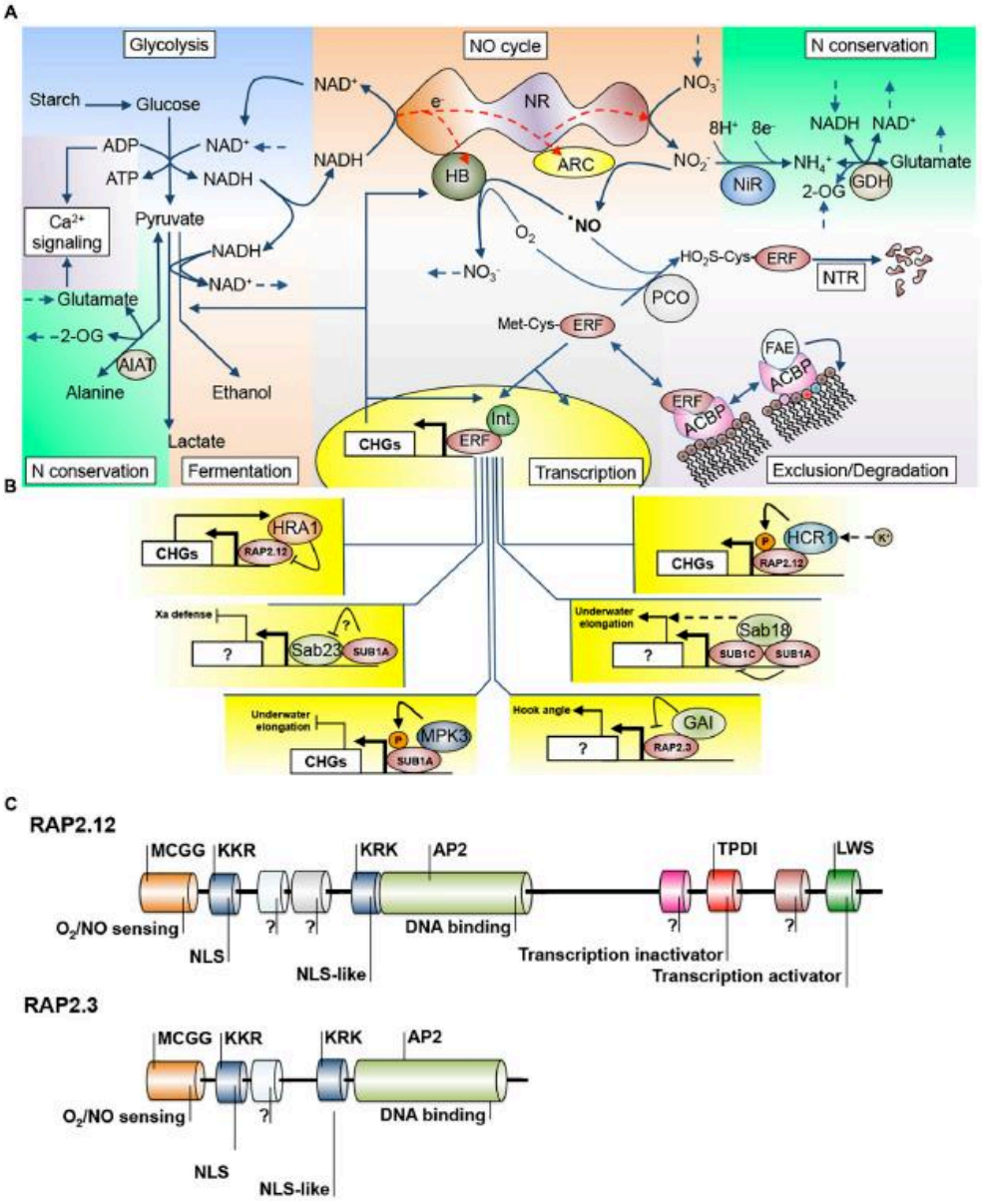


Figure I.4 : Interconnexion de différents événements de signalisation et de transduction durant un stress de submersion (Fukao *et al.*, 2019).

(A) Intégration des voies métaboliques (glycolyse, fermentation, conservation et assimilation de l'azote), homéostasie hormonale (cycle NO), voie de signalisation élié au calcium (signalisation Ca2c), facteur de transcription (TF), abondance (règle N-terminale, NTR), disponibilité (exclusion de la membrane) et le contrôle de la transcription. (B) Interactions nucléaires connues des facteurs de transcriptions hypoxiques/anoxiques avec des protéines régulatrices. (C) Comparaison de la structure de domaine de RAP2.12, un TF ERF-VII très complexe (l'autre étant RAP2.2) et RAP2.3, un TF ERF-VII peu complexe (d'autres étant HRE1 et HRE2) et des détails des fonctions de domaine démontrées. 2-OG, 2-oxoglutarate; ACBP, protéine de liaison acyl-Coa; ALAT, alanine aminotransférase ; ARC, composant réducteur d'amidoxime; Chgs, hypoxia core gene; ERF, facteur de réponse de l'éthylène; FAE, elongase d'acide gras; GAI, insensible à l'acide gibbérylique; GDH, glutamate déshydrogenase; HB, hémoglobine; HCR1, conductivité hydraulique de la racine; HRE1, hypoxia response attenuator; Int., interactor protein; MPK3, MAP kinase 3; NiR, nitrite reductase; NO, oxyde nitrique; NTR, N-terminal route; PCO, plant cell oxidase; SAB, Sub1a binding.

2.1.2. Le stress post-submersion

Les événements de submersion sont souvent temporaires et impliquent une période où l'eau se retire (desubmergence en anglais). La capacité d'une plante à récupérer après une étape de submersion est importante. Ainsi, des études se sont intéressées à cette étape spécifique, car elle peut présenter également un stress et est un aspect important de la tolérance à la submersion (Yeung *et al.*, 2019). En effet, la réoxygénation après une période d'hypoxie ainsi qu'une intensité lumineuse plus forte conduisent à une production importante de ROS ce qui peut provoquer des dommages cellulaires (Yeung *et al.*, 2019). Une fois l'eau retirée, la plante qui a mis en œuvre des réponses adaptées au milieu aquatique peut être sujette à un stress de dessiccation. Yeung *et al.* (2018) ont testé les capacités de récupération de deux accessions d'*A. thaliana*, Bay-0 et Lp2-6. À travers une approche expérimentale et transcriptomique, ils ont montré que ces deux accessions présentaient des niveaux différents de restauration après un stress de submersion.

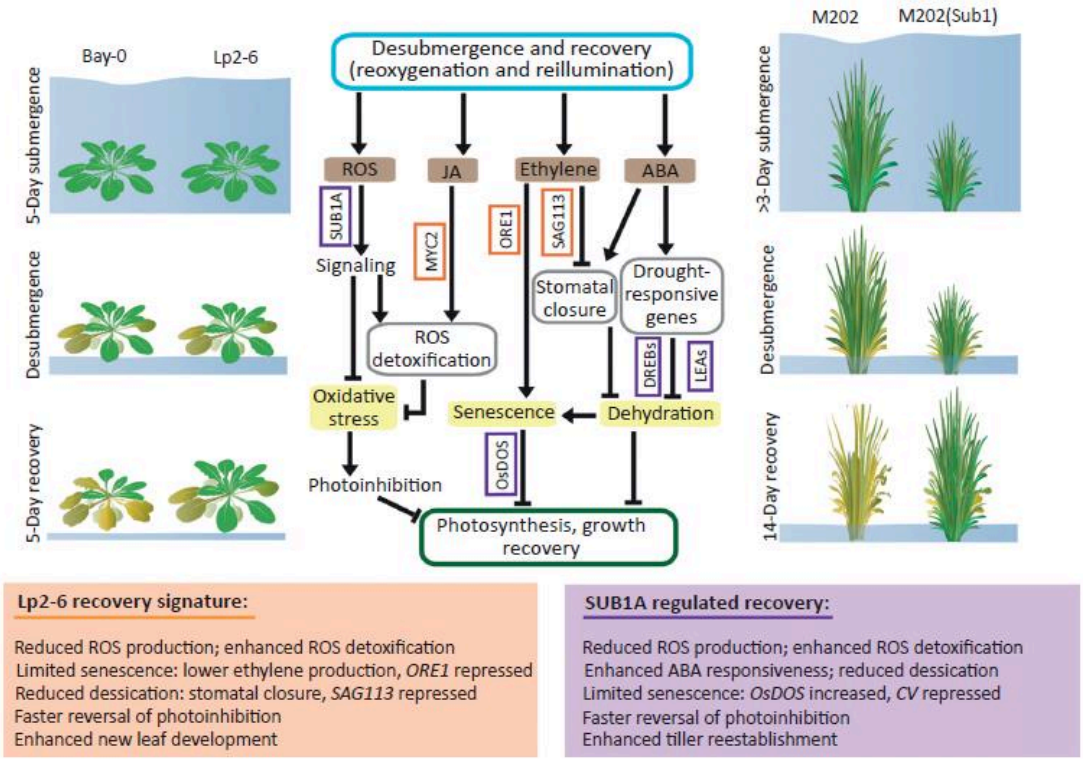


Figure I.5 : Stress de post submersion chez les plantes (Yeung *et al.*, 2019).

Après une submersion prolongée, le passage dans un environnement avec davantage d'oxygène et de lumière conduit à des réponses de stress post submersion médiée par les espèces réactives de l'oxygène (ROS), l'acide jasmonique (JA), l'éthylène et l'acide abscissique (ABA). Les processus de rétablissements physiologiques sont communs entre les espèces, mais les mécanismes moléculaires peuvent varier chez les dicotylédones (i.e. les accessions tolérantes Lp2-6 et intolérante Bay-0 d'Arabidopsis thaliana) et monocotylédones (les cultivars de riz tolérants M202(Sub1) et intolérant M202). Dans le schéma, les flèches indiquent des régulations positives alors que les lignes représentent les régulations négatives. Les gènes d'*A. thaliana* sont encadrés en orange et ceux du riz en violet. La régulation des systèmes de détoxyfication des ROS pour la tolérance aux stress oxydatifs est contrôlée par l'activation de MYC2 par l'intermédiaire des JA chez A. thaliana et l'activation de SUB1A par les ROS chez le riz. La prévention de la sénescence et de la déshydratation chez Lp2-6 (tolérant) dépend de l'accumulation d'éthylène, qui entraine la répression de NAC DOMAINE CONTENANT PROTEIN6/ORESARA1 (ORE1) catabolise la chlorophylle et SENESCENCE ASSOCIATED GENE 113 (SAG113) qui inhibe la fermeture des stomates stomatique. Dans le riz tolérant M202(Sub1), SUB1A favorise la réactivité de l'ABA pour prévenir la déshydratation en activant les gènes sensibles à la sécheresse, y compris les protéines sensibles à la déshydratation (DREB) et les protéines (LEA). SUB1A retarde également la sénescence dans le riz en induisant le gène DELAY OF THE ONSET OF SENESCENCE (Osdos) et réprime CHLOROPLAST VESICULATION (CV) qui déclenche le renouvellement des plastes. Les mécanismes de tolérance chez Arabidopsis accélèrent le développement de nouvelles feuilles réduisant les dommages photoinhibiteurs. Chez le riz, SUB1A rétablit l'homéostasie métabolique et rétablit efficacement la croissance des méristèmes. Les modèles de plantes utilisés dans cette figure proviennent du référentiel Plant Illustrations sur https://figshare.com/articles/Arabidopsis_-_Rosette_drawing_steps/4688839/1 Les panneaux orange et violet indiquent les processus liés à la tolérance menant au rétablissement chez Arabidopsis et le riz, respectivement.

Ces différences sont notamment liées à l'activité de trois gènes RESPIRATORY BURST OXIDASE HOMOLOG D, SENESCENCE-ASSOCIATED GENE113 et ORESARA1. Ces derniers sont impliqués dans des fonctions de régulation des espèces réactives d'oxygène et de phytohormones comme l'éthylène et l'acide abscissique durant la période post-submersion. Yeung *et al.* (2019) synthétisent leurs résultats sur *A. thaliana* et ceux trouvés sur le riz (Figure I.5). Ainsi, les processus de rétablissement après un stress sont communs entre espèces, via les ROS et les phytohormones (éthylène, ABA et JA), mais leurs mécanismes moléculaires varient.

2.2.Réponses des plantes au milieu terrestre

Les plantes, notamment terrestres, peuvent connaitre durant leur cycle de vie des périodes de sécheresse menant à un état de déficit hydrique et une perte de productivité pour les espèces cultivées. Dans un contexte de changements globaux, ce stress a été bien étudié chez des espèces cultivées comme le coton (Deeba *et al.*, 2012), le blé (Bowne *et al.*, 2012) ou encore la vigne (Griesser *et al.*, 2015). La sécheresse impacte chez les plantes la photosynthèse, la régulation des hormones, la transpiration, l'équilibre osmotique ainsi que leur morphologie (Basu *et al.*, 2016). À court terme, un stress hydrique intense impacte la croissance de la plante via la fermeture des stomates et le ralentissement de la photosynthèse. À long terme, la sécheresse modifie le développement de la plante, favorisant la croissance des racines par rapport à la partie aérienne à travers un ajustement osmotique et métabolique (Figure I.6).

Comme nous l'avons vu, une des premières réponses de la plante est la fermeture des stomates (stratégie d'évitement) et la réduction de la croissance foliaire pour limiter les pertes en eau *via* la transpiration (Martin-StPaul *et al.*, 2017). La fermeture des stomates est en partie médiée par l'acide abscissique, phytohormone synthétisée dans les racines et transportée jusqu'aux feuilles (Osakabe *et al.*, 2014). Le stress hydrique engendre une cascade de réactions engendrant l'activation des voies de signalisation de l'ABA (biosynthèse et transport) et également de facteurs de transcription impliqués dans la réponse aux stress (Figure I.7). Plusieurs auteurs ont montré l'implication du gène 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase NCED3 induit par le déficit hydrique chez *Arabidopsis thaliana*. Ce gène code une enzyme clé pour la biosynthèse de l'acide abscissique (Iuchi *et al.*, 2001 ; Hao *et al.*, 2009). D'autres phytohormones interviennent dans le stress hydrique.

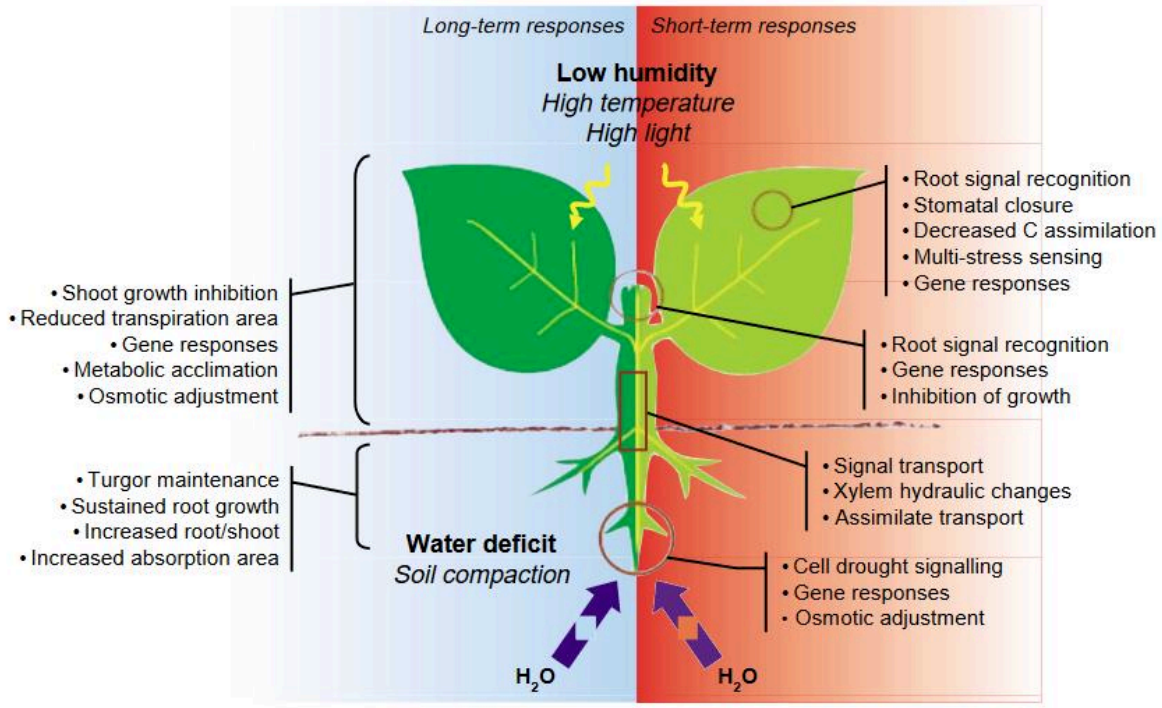


Figure I.6 : Réponses des plantes à un stress hydrique (Chaves *et al.*, 2003).

A gauche, les réponses à long terme (acclimatation) à droite les réponses à court terme.

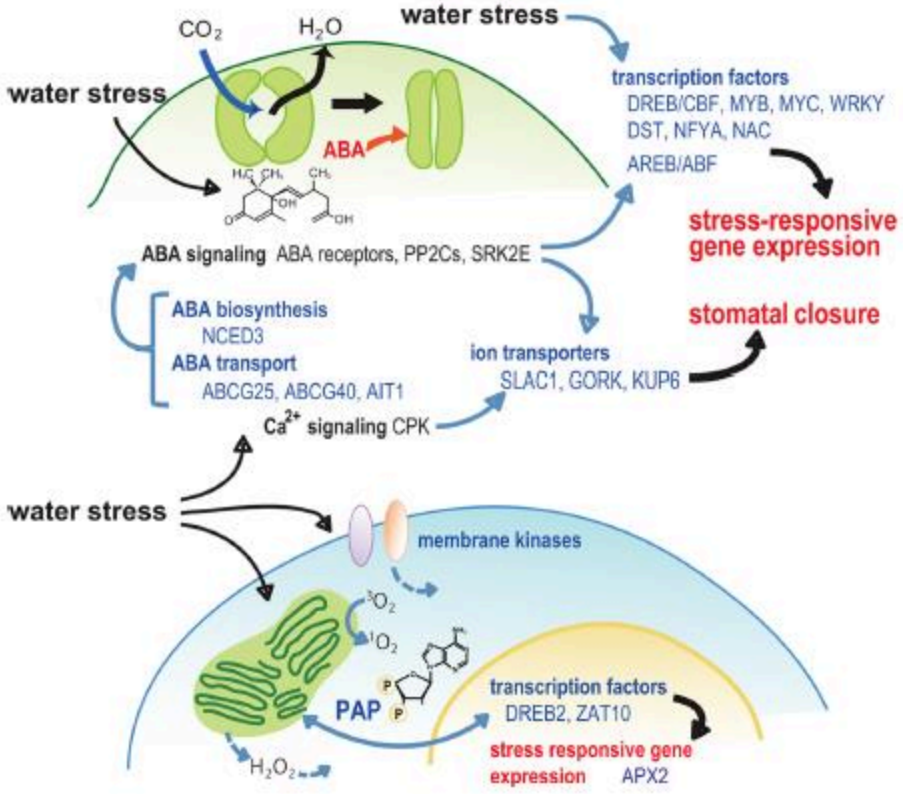


Figure I.7 : Modèle du rôle des facteurs de transcription dans (a) la fermeture des stomates et dans (b) la signalisation en cas de stress hydrique (Osakabe *et al.*, 2014).

Par exemple, l'utilisation de mutants chez le riz a permis de montrer que les cytokinines retardent la sénescence en réponse au déficit hydrique (Peleg *et al.*, 2011) et que la quantité d'auxine diminue en réponse à un déficit hydrique. L'expression de gènes codant des protéines LEA (Late embryogenesis abundant), qui sont impliquées dans la tolérance à la sécheresse, est associée à la diminution de l'auxine (Zhang *et al.*, 2009). Ces phytohormones jouent notamment, comme pour les plantes se développant en condition aquatique, sur la morphogénèse des racines (Basu *et al.*, 2016). Wasaya *et al.* (2018) ont fait une synthèse bibliographique sur les fonctions des racines vis-à-vis d'un stress hydrique. Ainsi, le développement de racines secondaires plus fines est reconnu comme une stratégie permettant de maximiser la surface d'absorption (Comas *et al.*, 2013). D'autres traits comme le diamètre des racines (Uga *et al.*, 2015), la quantité de chevelu racinaire (Wasson *et al.*, 2012), l'orientation des racines (Zhu *et al.*, 2010) ont également un rôle dans l'efficacité de l'absorption en eau et en nutriments.

La photosynthèse est réduite suite au manque d'eau pour la plante, notamment par la diminution en $C0_2$ engendrée par la fermeture des stomates (Yordanov *et al.*, 2000 ; Osakabe *et al.*, 2014 ; Basu *et al.*, 2016). Ainsi, Wang *et al.* (2018) ont montré chez le pommier une réduction de l'efficacité de la photosynthèse en réponse à un déficit hydrique. Lors d'un stress hydrique modéré, cette diminution s'explique par la limitation de la diffusion du $C0_2$ par la fermeture des stomates, mais également par la production de ROS. Lorsque le stress est plus fort, s'ajoute une limitation biochimique avec l'inhibition du photosystème 2 (PSII) dépendante de la protéine D1 ce qui augmente la production de ROS. En outre, l'assimilation du carbone C4 par les plantes est souvent citée comme une adaptation des plantes limitant les pertes en eau, et améliorant l'efficacité de la photosynthèse lors d'un déficit hydrique par rapport aux plantes dites C3 (Taylor *et al.*, 2011 ; Basu *et al.*, 2016). De manière plus marginale, la respiration peut également être perturbée par le stress hydrique (Atkin & Macherel, 2009). Atkin & Macherel, (2009) synthétisent les impacts du stress hydrique sur la respiration chez les plantes. Ils exposent également le rôle important de la coopération entre le chloroplaste et la mitochondrie en réponse au stress hydrique.

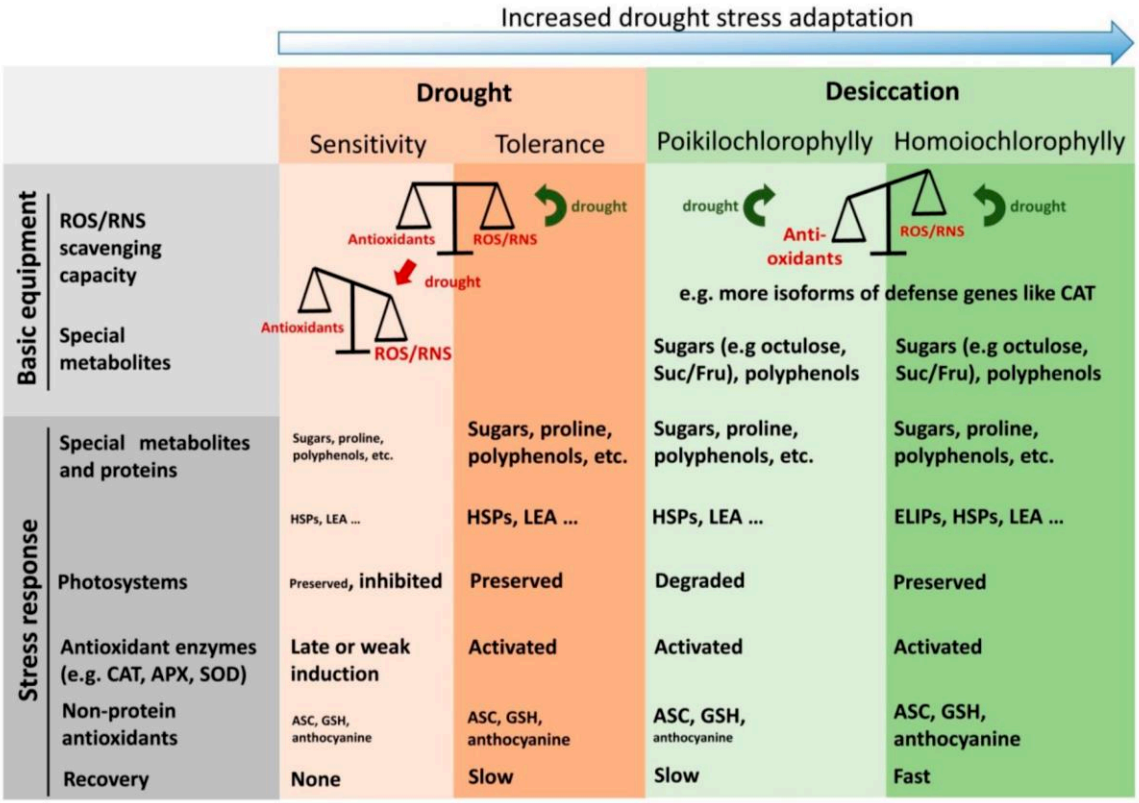


Figure I.8 : Caractéristiques des plantes sensibles (sensitivity), tolérantes (tolerance) à la sécheresse et tolérantes à la dessiccation (Laxa *et al.*, 2019).

La figure résume les propriétés liées au métabolisme, la défense antioxydante, et la récupération qui sont associés aux traits physiologiques. Flèche rouge : espèce d'oxygène réactive (ROS)/azote réactif espèces (RNS) gain de prévalence; flèche verte : statut est préservé après la sécheresse. Taille de police corrélée avec la force des réponses au stress mesurées. ROS, espèces réactives de l'oxygène; RNS, espèces réactives de l'azote; HSP, protéine de choc thermique; LEA, protéine abondante d'embryogenèse tardive; ELIP, early light inducible protein; Suc/Fru, rapport saccharose-fructose; CAT, catalase; APX, peroxydase ascorbate; SOD, superoxyde dismutase; ASC, ascorbate; GSH, glutathion.

Le stress hydrique engendre également des réponses métaboliques chez les plantes (Krasensky & Jonak, 2012). Parmi elles, l'ajustement osmotique consiste à produire des composés qui vont maintenir la turgescence des cellules (Basu *et al.*, 2016). Ainsi, la proline et la glycine bétaïne sont deux osmoprotectants chez les plantes mobilisées dans de nombreux stress. Ashraf & Foolad, (2007) décrivent le rôle de ces deux composés et synthétisent les travaux effectués chez les plantes. Ils montrent que l'exposition de plantes à des quantités exogènes de glycine bétaïne et de proline améliore la tolérance des plantes au déficit hydrique et au stress salin. Yamada *et al.* (2005) ont créé des mutants de pétunia (Petunia hybrida cv 'Mitchell') pour la production de proline. Ces mutants sont plus tolérants au stress hydrique que la variété d'origine. D'autres composés jouent un rôle dans la tolérance au stress hydrique comme les polyamines (Yang *et al.*, 2007), les sucres, les polyols. Mundim & Pringle, (2018) ont mené une méta-analyse sur les réponses métaboliques des plantes aux stress hydriques et à l'herbivorie. Ils montrent qu'il existe des différences métaboliques entre les feuilles et les racines en réponse au stress hydrique. Ainsi, un certain nombre de métabolites voient leurs productions augmentées lors d'un stress hydrique, comme les sucres ou les acides aminés.

L'étude du transcriptome peut également fournir des informations sur les mécanismes de réponses au stress hydrique chez les plantes. Ainsi, You *et al.* (2019) ont effectué une analyse transcriptomique sur deux accessions de sésame, l'une sensible à la sécheresse et l'autre tolérante sur lesquelles a été appliqué un stress hydrique durant 25 jours. L'analyse a révélé que 684 et 1346 gènes ont été différentiellement respectivement sur-exprimés et sous-exprimés entre les deux accessions. Ces gènes étaient notamment associés aux métabolismes des acides aminés, aux espèces réactives d'oxygène et à l'acide abscissique. Ces résultats suggèrent le rôle important dans la tolérance aux stress hydriques de ces métabolites. En outre, tout comme pour le stress de submersion, les microARN jouent un rôle dans la réponse au stress hydrique (Ferdous *et al.*, 2015).

Comme nous l'avons vu précédemment les différents stress (submersion et sécheresse) conduisent à la production d'espèces réactives d'oxygène. Ainsi le système de défense antioxydant, dans lequel on peut citer les enzymes que sont les catalases, peroxidases, superoxide dismutases mais également les composés comme l'ascorbate et le glutathion, est important pour éviter les dommages cellulaires (Laxa *et al.*, 2019) (Figure I.8).

C'est la balance entre la production de ROS et la capacité du système anti-oxydant qui détermine en partie la tolérance et la sensibilité d'une plante à la sécheresse. Ainsi lorsque l'on compare une plante tolérante et sensible à la sécheresse, on constate que la seconde mobilise des sucres, des polyphénols, des protéines spécifiques (LEA et HSP) et parvient ainsi à préserver l'activité photosynthétique et sa croissance (Figure I.8). Au stress hydrique s'ajoute généralement un stress dit de dessiccation qui met en jeu les mêmes composantes métaboliques. Chez les plantes tolérantes à la dessiccation, on distingue les poikilochlorophylles et les homoichlorophylles qui usent de stratégies différentes pour résoudre le stress hydrique. Les premières voient la chlorophylle réduite et recouvrée après le stress tandis que les seconds conservent leur chlorophylle intacte durant le stress (Laxa *et al.*, 2019).

Des études sur *Lolium multiflorum* et le maïs ont montré qu'un stress hydrique menait à des réponses en lien avec le métabolisme antioxydant. Ainsi, Pan *et al.*, (2016) ont étudié, chez *Lolium multiflorum*, les gènes exprimés suite à un stress hydrique. Ils montrent qu'un certain nombre d'entre eux étaient associés à des processus comme la glycolyse, le métabolisme du sucre et en lien avec les ROS. Anjum *et al.* (2017) ont étudié les réponses aux stress hydriques chez trois hybrides de maïs (Dong Dan 80, Wan Dan 13, et Run Nong 35). La quantité de ROS produite s'est révélée plus importante en condition de stress ce qui a conduit à une réduction de la croissance des plantes. L'hybride le plus résistant à la sécheresse, Dong Dan 80, est également celui présentant l'accumulation d'osmolytes et d'enzymes antioxydantes la plus importante.

2.3.Cas des plantes aquatiques

La majorité des études se sont intéressées au stress de la submersion et à la sécheresse sur des espèces modèles et des plantes cultivées, comme *Arabidopsis thaliana* et *Oriza sativum*. Il existe néanmoins des études sur des espèces plus tolérantes à la submersion. En effet, les plantes de zones humides (wetland plant) subissent des stress de submersion (flooding) et de sécheresse (Bornette and Puijalon, 2011). Les études menées sur les écosystèmes aquatiques se focalisent sur des échelles écologiques et cherchent à comprendre les impacts des inondations sur, par exemple, la biodiversité (Cazzolla Gatti, 2016).

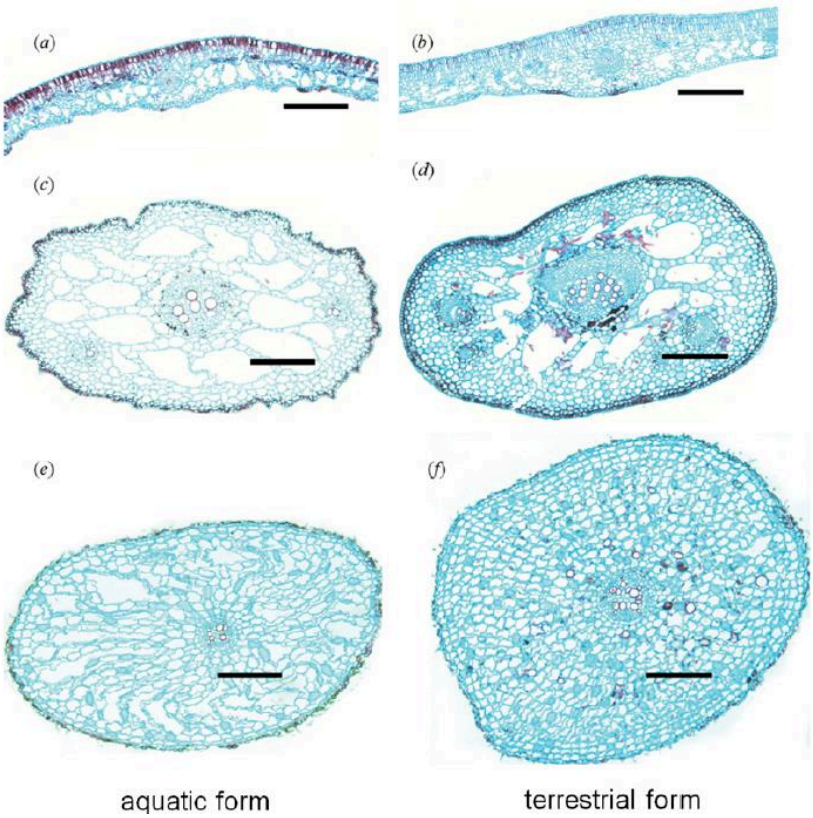


Figure I.9 : Comparaison de coupes anatomiques des tissus chez *Nymphoides. Peltata (*Li *et al.*, 2011).

Les plantes sont conduites en conditions aquatique (à gauche) et terrestre (à droite).
Section transversale de feuilles (a et b), pétioles (c et d) et racines grossières (e et f) de *N. peltata* cultivée sous conditions aquatiques et terrestres : a, c et e sont cultivées dans un habitat aquatique ; b, d et f sont cultivées dans un habitat terrestre. Magnification x50, échelle : 0,05 mm.

D'autres études cherchent également à comprendre les réponses de ces plantes à la submersion et à la sécheresse à l'échelle physiologique. Garssen *et al.* (2015) ont présenté une synthèse des réponses des plantes de zones ripariennes à la submersion. Ils montrent un lien entre la réduction de la survie de la plante et la durée et la profondeur de l'évènement de submersion. La capacité d'élongation des plantes ainsi que la formation de racines adaptées sont des caractéristiques décisives pour la survie des plantes à la submersion.

Quelques études récentes se sont intéressées à l'analyse de l'impact des stress de submersion et de sécheresse sur les plantes aquatiques (Luo *et al.*, 2008 ; Li *et al.*, 2011 ; Pompeiano *et al.*, 2019). Pompeiano *et al.* (2019) ont étudié les réponses à la submersion et post-submersion chez *Arundo donax*, communément appelée canne de Provence. Cette espèce est une plante herbacée invasive en France qui présente une tolérance à la submersion. Ces auteurs ont montré en conditions contrôlées que la submersion partielle (waterlogging) n'a pas impacté significativement la croissance et la photosynthèse des plantes par rapport au témoin. La submersion complète (flooding) a, quant à elle, impacté négativement les traits physiologiques étudiés (biomasses et activité photosynthétique). Néanmoins la rapide restauration des fonctions biologiques après le stress hypoxique témoigne de la plasticité phénotypique de cette espèce.

Li *et al.* (2011) ont étudié la réponse de l'espèce aquatique *Nymphoides peltata* au changement de disponibilité en eau. Ils ont ainsi comparé les traits morphologiques et anatomiques relatifs aux biomasses (feuilles et racines) et à l'anatomie des feuilles entre des plantes conduites en condition terrestre versus d'autres menées en condition aquatique. En condition terrestre, ils montrent que la biomasse totale (racines et feuilles) a diminué de 88.77% et celle des racines a augmenté de 62.75% par rapport à celle observée pour les plantes conduites en condition aquatique. En revanche, en condition aquatique, les plantes présentent un nombre de lacunes dans les feuilles, pétioles et racines respectivement de 28.57%, 56.41% et 82.35% plus important que celui trouvé en condition terrestre pour ces mêmes organes (Figure I.9). Cette étude montre la tolérance à la submersion et l'émersion d'une plante aquatique et sa capacité de réponse morphologique.

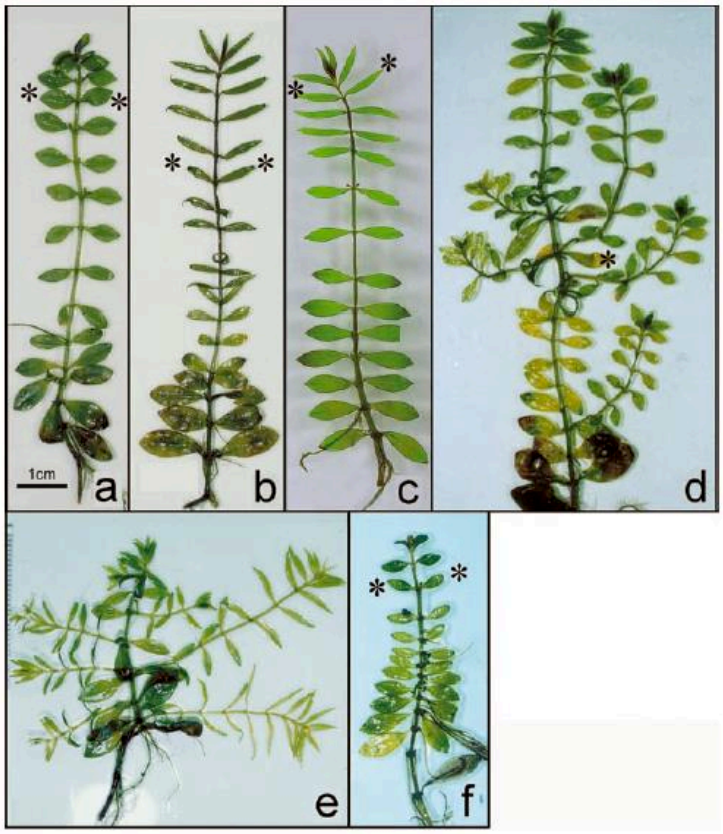


Figure I.10 : Morphologie des tiges de *Ludwigia arcuata* élevées dans différentes conditions (Kuwabara *et al.*, 2003).

a. Tige terrestre avec des feuilles terrestres. b. Tige aquatique conduite durant deux semaines en condition terrestre. c. Tige terrestre traitée avec 100µl l^{-1} d'éthylène. d. Tige aquatique traitée avec 1µM $AgNO_3$ (nitrate d'argent, inhibiteur de la perception de l'éthylène). e. Tige terrestre traitée avec 100 µM ACC (acide 1-amino-cyclopropane-1-carboxylique). f. Tige aquatique traitée avec 1µM d'ABA. Les astérisques indiquent les feuilles les plus jeunes lors du début de l'expérience.

Luo *et al.* (2008) se sont intéressés pour trois plantes de zones humides, *Carex lasiocarpa*, *Carex limosa* et *Deyeuxia angustifolia*, au compromis entre la tolérance à la sécheresse et la tolérance à la submersion. Ces trois espèces se développent à des profondeurs d'eau différentes. On trouve *C. lasiocarpa* entre 10-50cm de profondeur, *C. limosa* entre 10-30cm et *D. angustifolia* entre 0-10cm. À travers une expérimentation en conditions contrôlées de 25 jours, ils ont comparé la production de biomasse, le taux relatif de croissance (RGR), le taux de survie et les réponses physiologiques de ces trois espèces en réponse à la submersion et à la sécheresse. Ils ont montré que la tolérance à la submersion était corrélée à la profondeur à laquelle ces 3 espèces se développent. Ainsi *C. lasiocarpa* présente une tolérance plus importante que celle de *C. limosa* qui montre elle-même une tolérance plus grande que *D. angustifolia* vis-à-vis de la submersion. En revanche en condition de stress hydrique (sécheresse), c'est *D. angustifolia* qui possède un meilleur taux de survie et un taux de croissance plus élevé (RGR). Ces résultats suggèrent qu'il existe un compromis entre les tolérances à ces deux stress.

Par ailleurs, les milieux humides ayant des niveaux qui fluctuent fortement, d'autres études se sont intéressées à l'impact de la variation d'eau à travers des épisodes de submersion et désubmersion (desubmergence) (Luo *et al.*, 2018). Luo *et al.*, (2018) ont étudié les réponses de l'espèce aquatique invasive *Alternanthera philoxeroides* à deux fréquences d'alternance des niveaux d'eau. Ces deux fluctuations des niveaux d'eau correspondent à des fluctuations faible (LFF) et forte (HFF) où le niveau d'eau varie de 0 à 150 cm (submersion) et revient à 0 cm (désubmersion). La première fluctuation du niveau d'eau (LFF) est répétée deux fois (deux cycles comprenant dix jours de submersion et dix jours de désubmersion). La seconde est répétée quatre fois (4 cycles de cinq jours de submersion et 5 jours de désubmersion). Ils montrent un effet négatif de la variation du niveau d'eau sur la croissance (biomasse et activité photosynthétique). Cet effet est plus marqué lors d'une fréquence de fluctuation plus élevée (HFF). Ainsi la biomasse des plantes ayant subi une HFF est deux fois inférieure à celle des plantes conduites en LFF. Par ailleurs, ces impacts sont plus faibles lors du deuxième cycle d'alternance pour les deux fluctuations, ce qui suggère une acclimatation de la plante à ces conditions. Les études concernant les espèces invasives sont rares et ne sont pas focalisées sur la capacité aux changements de milieux pour expliquer leur potentiel invasif.

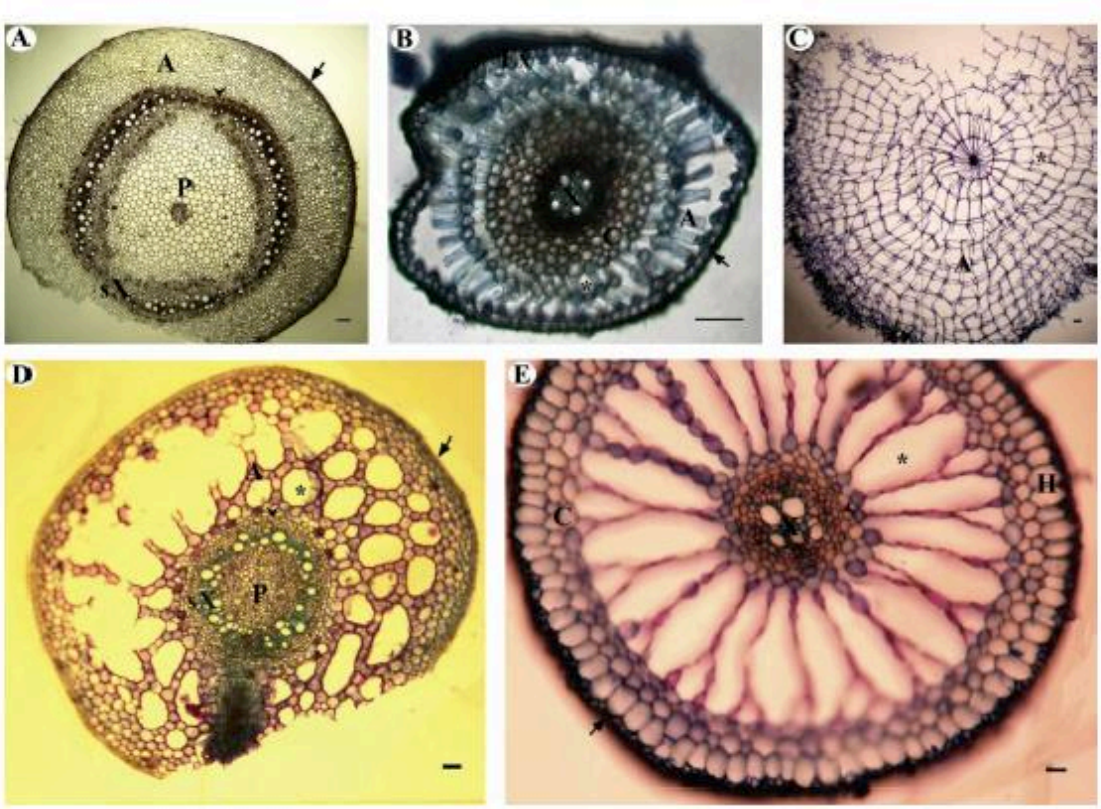


Figure I.11 : Coupes transverses de rhizomes et racines de différentes espèces du genre Ludwigia. (Bedoya and Madriñán, 2015)

P—pith;X—xylem; C—cortex; A—aerenchyme; Ex-exoderme; H—hypoderme; sX—xylème secondaire; sA—aerenchyme secondaire; Épiderme (flèche); Lacune (*); Endoderme (flèche); couche non odermale de l'hypoderme (étoile). (A) *L. helminthorrhiza* rhizome; (B) *L. helminthorrhiza* DGR (racine croissance montante). (C) *L. helminthorrhiza* UGR (racine croissance descendante); (D) *L. sedioides* rhizome;(E) *L. sedioides* root.

Les jussies sont des plantes aquatiques, possédant un certain nombre de caractéristiques témoignant de leur adaptation à des conditions hétérogènes allant de milieux aquatiques jusqu'au milieu terrestre (prairie humide). En effet, les plantes du genre Ludwigia sont capables d'hétérophyllie[8] ce qui témoigne de leur plasticité phénotypique. Kuwabara *et al.* (2003) montrent chez *Ludwigia arcuata* que le traitement des tiges terrestres avec de l'éthylène a conduit à la formation de feuilles de type immergées (Figure I.10c). En revanche, l'utilisation d'acide abscissique a mené chez des tiges immergées à la formation de feuilles terrestres (Figure I.10f). L'hétérophyllie est notamment contrôlée par des phytohormones comme l'acide abscissique et l'éthylène (Kuwabara *et al.*, 2003 ; Wanke, 2011; Nakayama *et al.*, 2017). *Ludwigia grandiflora* est également capable de produire des pneumatophores, racines adaptées à des conditions anoxiques. Bedoya and Madriñán (2015) ont mené une étude de reconstruction phylogénétique du genre Ludwigia, basée sur des caractéristiques morpho-anatomiques des tiges et des rhizomes. Ils constatent la présence, *via* des coupes anatomiques, d'aérenchymes dans ces tissus (Figure I.11).

3. Cas du Marais de Mazerolles.

Notre étude concerne le marais endigué de Mazerolles, situé au Petit-Mars (près de Nantes). C'est une zone protégée Natura 2000 qui est constituée de prairies inondables sur près de 750ha. Les niveaux d'eau y sont en partie régulés grâce à un système de pompage. Le marais est envahi par *Ludwigia grandiflora* depuis 1999 dès lors il a été un milieu d'étude particulier pour l'étude de la jussie (Figure I.12). En effet, on y trouve les deux formes de jussie, une aquatique et la seconde terrestre. La première est apparue en 1995 et se développe aujourd'hui dans la douve qui traverse les prairies et la seconde a été observée 5 ans plus tard dans la prairie (Figure I.12). Le morphotype terrestre de la jussie a colonisé une grande partie des prairies du marais de Mazerolles et subi des conditions de vie

[8] L'hétérophyllie est la capacité de produire des feuilles différentes selon le type d'environnement. Les plantes aquatiques produisent ainsi des feuilles immergées, flottantes, ou émergées. Ces feuilles présentent des différences au niveau de leur forme, de l'épaisseur de la cuticule, de la répartition des stomates.

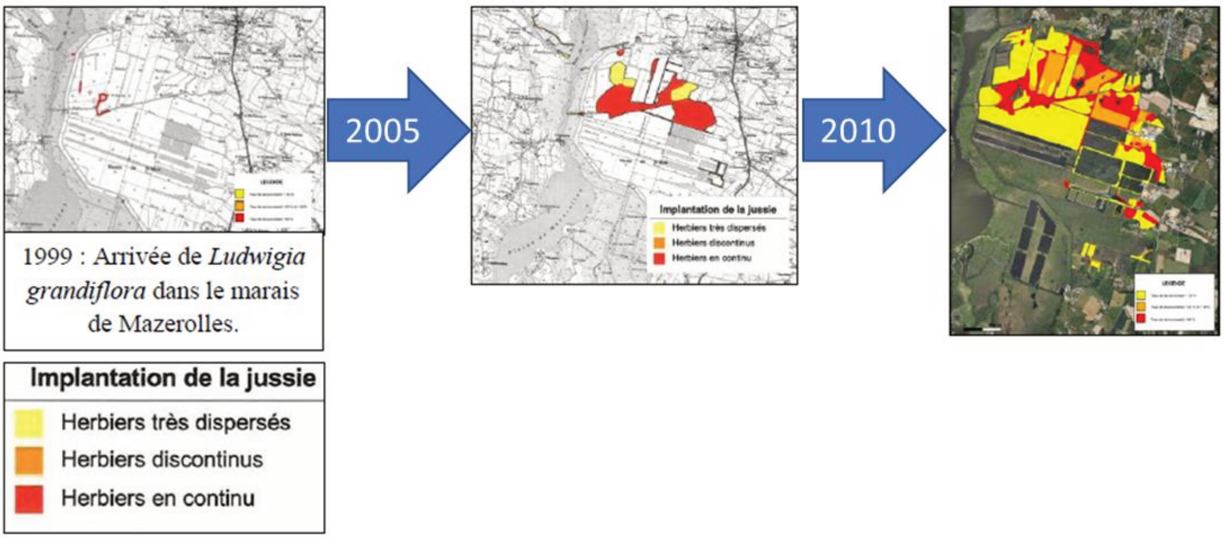


Figure I.12 : Progression de 1999 à 2010 de *Ludwigia grandiflora* en milieu terrestre au sein du marais de Mazerolles (Syndicat Mixte EDENN, 2011).

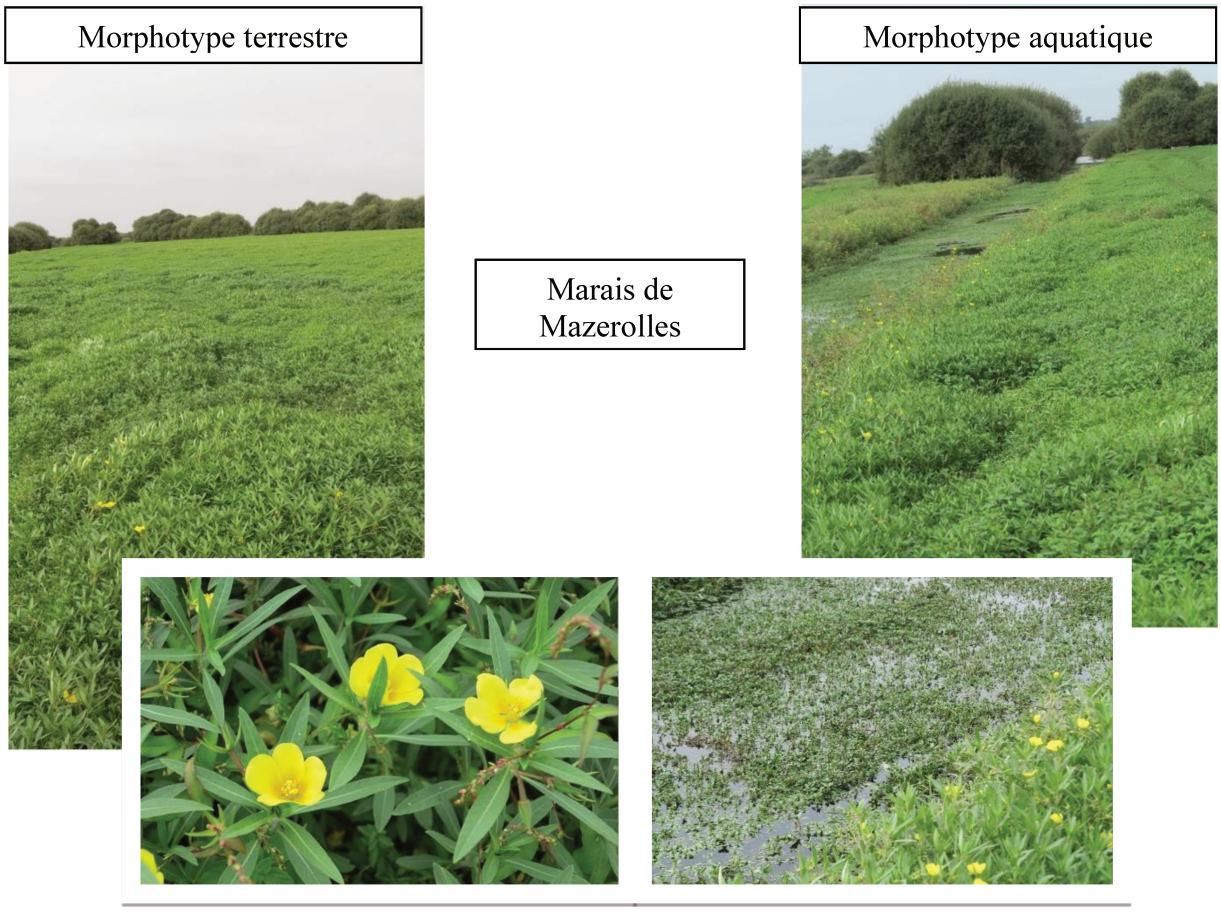


Figure I.13 : Morphotype aquatique et terrestre du marais de Mazerolles en septembre (Crédit photo : Dominique Barloy, 2017).

hétérogènes. En effet, le niveau d'eau varie au cours de l'année, le morphotype terrestre est alors immergé de novembre à avril, mais totalement émergé de mai à octobre. (Figure I.13).

Les contraintes subies par les morphotypes sont différentes et supposent donc, comme nous l'avons vu précédemment, des réponses physiologiques particulières. La tolérance aux stress de submersion et de sécheresse pourrait être une capacité importante de la jussie, déterminant son potentiel invasif. C'est pourquoi nous nous intéressons dans la suite de ce chapitre à la caractérisation physiologique des morphotypes aquatique et terrestre en réponse au changement de milieu.

III. Résultats : caractérisation des morphotypes terrestre et aquatique et évaluation de leur plasticité

1. Présentation synthétique de la publication Billet *et al.*, 2018

En France, l'espèce invasive aquatique *Ludwigia grandiflora*, envahit les prairies humides ce qui conduit à une dépréciation de la valeur fourragère de ces terres pour les agriculteurs. L'apparition de cette forme terrestre s'est déroulée sur un laps de temps de 5 ans pour les marais de Mazerolles (près de Nantes, France, entre 1995 et 2000) et de l'Isac (près de Redon, France, entre 2000 et 2005). Cela questionne les capacités d'adaptation rapide de la jussie. Haury *et al.* (2014) ont montré sur le terrain des différences morphologiques entre les morphotypes aquatique et terrestre.

L'objectif de ce travail est la caractérisation des deux morphotypes de *L. grandiflora* en réponse au changement de milieu au niveau physiologique (morphologie et métabolisme). Nous faisons l'hypothèse que les réponses physiologiques vont être différentes entre les morphotypes.

Afin de caractériser les morphotypes de *L. grandiflora*, nous avons réalisé une expérimentation en conditions contrôlées basée sur une approche de condition croisée. En effet, nous avons conduit les morphotypes terrestre et aquatique dans leur environnement d'origine (Am-a et Tm-t), mais également dans la condition croisée (Am-t et Tm-a) durant une période de 7 jours. Nous avons observé les réponses morphologiques (biomasse et traits développementaux) et métaboliques en réponse au changement de milieu.

Nous avons montré des différences dans le développement et le métabolisme des deux morphotypes en réponse au changement de milieu. En effet, les traits morphologiques du morphotype terrestre se sont révélés plus importants que ceux du morphotype aquatique, et ce, indépendamment des conditions. Au niveau métabolique, la jussie a montré une production plus importante de sucres dans les racines en condition terrestre et davantage d'acides aminés dans les tiges en condition aquatique. En outre, le morphotype terrestre a été capable d'ajuster son métabolisme en mobilisant les voies de la fermentation et de la glycolyse contrairement au morphotype aquatique. Ces résultats suggèrent des capacités et des plasticités phénotypiques différentes entre les morphotypes.

2. Publication Billet *et al.*, 2018 (Ecology and Evolution)

Received: 31 August 2017 | Revised: 15 December 2017 | Accepted: 22 December 2017

DOI: 10.1002/ece3.3848

ORIGINAL RESEARCH

WILEY Ecology and Evolution Open Access

Aquatic and terrestrial morphotypes of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora*, show distinct morphological and metabolomic responses

Kevin Billet[1] | **Julien Genitoni**[1] | **Michel Bozec**[1] | **David Renault**[2,3] | **Dominique Barloy**[1]

[1]ESE, Ecology and Ecosystem Health, Agrocampus Ouest, INRA, Rennes, France

[2]UMR CNRS 6553 EcoBio, University of Rennes 1, Rennes, France

[3]Institut Universitaire de France, Paris Cedex, France

Correspondence
Dominique Barloy, ESE, Ecology and Ecosystem Health, Agrocampus Ouest, INRA, Rennes, France.
Email: Dominique.barloy@agrocampus-ouest.fr

Funding information
ONEMA

Abstract

In the context of expansion of invasive species, survival of invasive plants is conditioned by their ability to adapt. In France, the water primrose *Ludwigia grandiflora*, an aquatic invasive species, invades yet wet meadows, leading to a depreciation of their fodder value. Understanding its potential adaption is necessary to its management, strong differences between both morphotypes were expected. So morphological and metabolic responses to terrestrial environment were analyzed for aquatic and terrestrial morphotypes. All morphological and biomass variables were greater in the terrestrial morphotype than the aquatic morphotype, independent of conditions. In terrestrial condition, both morphotypes showed a high production of sugars in root tissues, especially in the terrestrial morphotype and both morphotypes produced a low level of amino acids in shoot tissues. All results demonstrate that the terrestrial condition seems a stressful situation for both morphotypes, which activates glycolysis and fermentation pathways to improve their survival under hypoxic stress. But, only the terrestrial morphotype has been able to adjust its metabolism and maintain efficient growth. In the future, a differential transcriptomic analysis will be carried out to confirm this result.

KEYWORDS
adaptation, fermentation pathways, glycolysis, hypoxia, water primrose

1 | INTRODUCTION

During geographic expansion of invasive plant species, the ability of the organisms to adapt to novel sets of environmental conditions is crucial for survival and establishment success. According to Dietz and Edwards (2006), an invasion can be subdivided into two phases; a primary phase, during which the abundance of a preadapted species increases rapidly (typically in a resource-rich or disturbed habitat), and a secondary phase, during which spread is contingent upon plastic responses or genetic adaptation to the newly encountered ecological conditions.

The water primrose *Ludwigia grandiflora*, subsp. *hexapetala*, a plant species native to South America, is one of the most important invasive aquatic plants in Europe (Hussner, Windhaus, & Starfinger, 2016). In its native range, *L. grandiflora* is reported in wetlands and in the transition zone between aquatic and terrestrial environments (Thouvenot, Haury, & Thiébaut, 2013). In these habitats, water level fluctuations of up to 3 m during the year occur (Fortney et al., 2004). In its introduced range, it colonizes static or slow-flowing waters, river banks and wet meadows (Thouvenot et al., 2013). In France, *L. grandiflora* has a strong predominance in the Atlantic region and has invaded many

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.
© 2018 The Authors. *Ecology and Evolution* published by John Wiley & Sons Ltd.

types of fresh water ecosystem such as rivers, channels, ponds, and flooded meadows (Dandelot, Verlaque, Dutartre, & Cazaubon, 2005; Lambert, Dutartre, Coudreuse, & Haury, 2010). As an amphibious plant, it can have different forms as submerged, floating at the water's surface or emergent in terrestrial habitats, rooted in the sediment with floating or emergent shoots/leaves (Hussner et al., 2017). The phylogenetic reconstructions of the *Ludwigia* genus suggest that the aquatic distribution may result from a secondary colonization of these habitats by terrestrial plants (Bedoya & Madriñán, 2015). However, recently, specimens of *L. grandiflora* have propagated in wet meadows in France (Haury et al., 2011). As 5–10 years are necessary for the invasion of meadows, the transition from aquatic habitat to the terrestrial habitat is not spontaneous and requires an adaptation time for *L. grandiflora*. So the quasi absence of *L. grandiflora* into terrestrial some few years ago is clearly intriguing.

Several localities of the French Atlantic coast are now being invaded by terrestrial form, where it is continuously expanding with more than 1300 ha in 2017 (Haury, unpublished data). For instance, in the national Park of Brière (nearby Saint Nazaire, Loire Atlantique, France), the terrestrial areas colonized by *L. grandiflora* were multiplied by five between 2011 (156 ha) and 2014 (848 ha), leading to a depreciation of the fodder value of meadows and resulting in the abandonment of pasturing (Haury, Damien, Maisonneuve, & Bottner, 2012). The invasion of terrestrial habitat by *L. grandiflora* can be considered as a secondary invasion following the primary aquatic invasion (primary habitat) of French Atlantic coast.

Aquatic and terrestrial environments differ greatly in terms of oxygen availability and have likely contributed shaping the aquatic and terrestrial morphological types (morphotypes) of *L. grandiflora*. The terrestrial morphotype is characterized by a bushy morphology, with shorter internodes and stems, as well as more secondary ramifications. Conversely, in aquatic habitats, the plant architecture is simpler (Haury et al., 2014) and is most probably driven by the limited gas exchanges of water submerged leaves as O_2 and CO_2 have 10,000-fold lower diffusion coefficients in water compared to air (Voesenek, Colmer, Pierik, Millenaar, & Peeters, 2007). For completely submerged plants, like macrophytes, direct access to atmospheric O_2 is excluded and may cause anoxic or hypoxic conditions. Their only source of oxygen is produced during photosynthesis and diluted in water (Sand-Jensen, Pedersen, Binzer, & Borum, 2005). In these conditions, enhanced glycolytic fluxes and ethanolic fermentation are often characterizing the metabolism of aquatic plants (Fukao & Bailey-Serres, 2004), as the faster consumption of glucose to maintain ATP production (van Dongen et al., 2011; Narsai, Rocha, Geigenberger, Whelan, & van Dongen, 2011). In addition to the accumulation of ethanol and lactate during ethanolic fermentation, increased amounts of alanine, succinate, and γ-aminobutyric acid (GABA) are often measured in aquatic plants (Antonio et al., 2016).

In order to survive prolonged hypoxic conditions, aquatic plants have also developed adaptive mechanisms at the structural level. For roots, the commonest morphological and anatomical changes include the formation of adventitious roots, aerenchyma, and hypertrophied lenticels. These modifications improve the capacity for oxygen capture and transportation to submerged tissues in aquatic, semi-aquatic, and terrestrial plants (Gladish, Xu, & Niki, 2006; Gunawardena, Pierce, Jackson, Hawes, & Evans, 2001; Justin & Armstrong, 1987; Malik, Colmer, Lambers, & Schortemeyer, 2003). Similar to most aquatic plant species, two types of roots are observed in *L. grandiflora* (i) roots that adsorb nutrients and attach the plant to the soil, and (ii) adventitious roots, which are located along the stems and ensure oxygen uptake (EPPO, 2011). Semi-aquatic and aquatic species developed a large amount of aerenchyma in roots, but also in stems and leaves (Jung, Lee, & Choi, 2008; Nowak, Ono, & Cronk, 2010).

The water primerose is a heterophyllous aquatic plant that produces different types of leaves below and above water during its development (EPPO, 2011). Wells and Pigliucci (2000) showed earlier that in amphibious species, submerged leaves are thin and lack both a cuticle and stomata, whereas aerial leaves are thicker, cutinized, and bear stomata. When aerial leaves of amphibious species become submerged, CO_2 entry occurs predominantly via diffusion across the cuticle (Frost-Christensen & Floto, 2007). Similar characteristics may occur in *L. grandiflora*, but this has never been examined before.

In this work, we compared the performance of the terrestrial and aquatic morphotypes of *L. grandiflora* to understand the effect of the habitat change. We expected strong morphological and physiological differences between both morphotypes. We specifically aim (i) to investigate the differences and similarities in plant development and primary metabolism responses of both morphotypes in their original condition and (ii) to compare the same variables in a reversed condition (aquatic condition for terrestrial morphotype and terrestrial condition for aquatic morphotype).

We focused our study on a population of *L. grandiflora* that appeared in 1995 in its aquatic form. In 2000, this morphotype invaded meadows, leading to appearance of the terrestrial morphotype. We collected *L. grandiflora* plants from terrestrial and aquatic habitats and grew them either in their original sampling conditions or reversed their original ecological situation. Terrestrial morphotype comes from the aquatic population and as *L. grandiflora* is a vegetative reproduction species, we consider that terrestrial and aquatic morphotypes correspond to a same genotype.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Collection of the plants and experimental design

Aquatic (Am) and terrestrial (Tm) morphotypes of *L. grandiflora* were collected in autumn of 2014 from swamps of Mazerolles (nearby Nantes, France, N47 23.260, W1 28.206). They were grown under controlled conditions at 22°C and a 16-hr/8-hr (light/dark) cycle.

Starting from the apex, a 10-cm portion of the stem was collected, without roots, buds, and lateral stems. Then, a preconditioning period of 2 weeks was applied to promote the development of roots in different aquariums, as described in Figure S1. During the first week, both aquatic and terrestrial plants were developed in the aquatic condition, with a total immersion of the stems. Then, plants from both

morphotypes were allocated to one of two experimental conditions for one week: (i) terrestrial condition: plants were grown in a mixture of $^1/_3$ soil, $^1/_3$ sand, $^1/_3$ loam where the level of water was maintained flush, hereafter referred to as Am-t and Tm-t for aquatic and terrestrial morphotypes, respectively, and (ii) aquatic condition: plants were placed in the same substrate and were submerged into tap water—these plants are referred to as Am-a and Tm-a for aquatic and terrestrial morphotypes, respectively.

After preconditioning, aquatic and terrestrial morphotypes were randomly placed in containers (Length × Width × Height: 8 cm × 8 cm × 15 cm) in aquatic condition for Am-a and Tm-a and terrestrial condition for Am-t and Tm-t, under controlled conditions (22°C, 16-hr day/8-hr night; Figure S1).

Measurements of morphological traits and metabolomic patterns of the plants were conducted 1 week after this conditioning period; two and three biological replicates were carried out for the morphological and metabolomic analyses, respectively.

2.2 | Morphological analyses

For each experimental treatment, corresponding to aquatic and terrestrial morphotypes grown into two experimental conditions, eight plants were analyzed. The following morphological and biological traits were measured:

1. Length of the plant (LP), number of internodes (nbI), and number of leaves (nbL), which characterized the morphology of the plant;
2. Number of nodes with roots (nbNR), number of nodes with leaves and roots (nbNLR), and number of nodes with buds (nbNB); these three variables were associated with the fitness of the plant. In this work, fitness of *L. grandiflora* was considered to be the ability to produce propagules from buds or nodes with leaves and/or roots. Indeed, *L. grandiflora* shows a high regeneration capacity and the ability to form new shoots from single nodes (with or without leaves) from a small (>1 cm) plant fragments (Hussner, 2009).
3. Biomass of the plants was determined by measuring the fresh mass of shoots (FMS) and of roots (FMR). Their respective dry masses (DMS and DMR) were determined after oven drying the samples at 105°C for 48 hr. The ratios of fresh/dry mass of shoots (Sr) and roots (Rr), and ratio of ratios (rr = Sr/Rr) were calculated to determine water contents.

2.3 | Metabolomic fingerprint

For each experimental treatment, six plants were randomly collected and pooled to constitute one sample. To standardize the samples, ten centimeters from the top of the stem (including stem, leaves, and buds) and roots were sampled and immediately snap-frozen in liquid nitrogen. Then, samples were stored at −80°C until being ground into liquid nitrogen. Samples were lyophilized over 48 hr using a Cosmos 20K (Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc, France). Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) was used to scan for the 60 metabolites in our database, encompassing amino acids, organic acids, polyamines, polyols, and sugars. We used the method described in Serra et al. (2013). Briefly, for each sample, an aliquot of 10 mg of lyophilized powder was homogenized in 600 µl of a solution of ice-cold methanol/chloroform (2:1, v/v). Then, a volume of 400 µl of ultrapure water was added. Samples were homogenized and centrifuged for 10 min at 4,000 ***g*** (4°C). One hundred and twenty microliters of the upper phase containing metabolites was transferred to new glass vials. Samples were vacuum dried (Speed Vac Concentrator, MiVac, Genevac Ltd., Ipswich, England). The derivatization of the samples was conducted with a CTC CombiPAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland), and with the GC-MS settings that were described by Serra et al. (2013). Chromatograms were analyzed with XCalibur 2.0.7. Concentration of each metabolite was calculated using individual quadratic calibration curves.

2.4 | Statistical analysis

The effect of the experimental treatment on the morphological and metabolic phenotypes of the plants was assessed by running principal component analyses (PCAs). Analyses of variance (ANOVAs) was conducted to assess the effect of the experimental conditions on the morphological traits of the plants and metabolite concentrations, with morphotype, experimental conditions, and replicates as factors, and their two-way interactions. The residuals normality and the homoscedasticity were verified by Shapiro–Wilk's and Bartlett's tests, and normality was achieved by transforming morphological traits and the metabolite concentrations (Cos or Log_{10}; Table S1). The Tukey honestly significant difference test was used to compare means for morphological and metabolomic data, respectively. Statistical analyses were performed with the software R 3.2.2 (R Development Core Team 2008) using the package and plugin FactoMineR (Lê, Josse, & Husson, 2008) and the interface Rcmdr (Fox, 2005). Finally, we tried to link metabolites whose concentration varied among the experimental treatments with metabolic pathways. To achieve this goal, we performed pathway enrichment analyses in Metaboanalyst 3.0 (Xia, Sinelnikov, Han, & Wishart, 2015). Fisher's exact test algorithm was performed for these pathway analyses, with *Arabidopsis thaliana* as the reference model. In this procedure, the number of hits between the metabolites in our dataset and all metabolites of a given pathway were calculated. Data presented in the figures are untransformed.

3 | RESULTS

3.1 | Morphology

The separation of the groups according to the experimental treatments is presented in Figure 1. The first axis of the PCA explained 46.65% of the total inertia and separated the Am morphotype of *L. grandiflora* from the Tm morphotype. On this axis, the seven variables being correlated at least at 70% were conserved for investigating the main differentiating factors between morphotypes (Figure 1b). Tm was characterized by greater plant length, fresh and dry masses

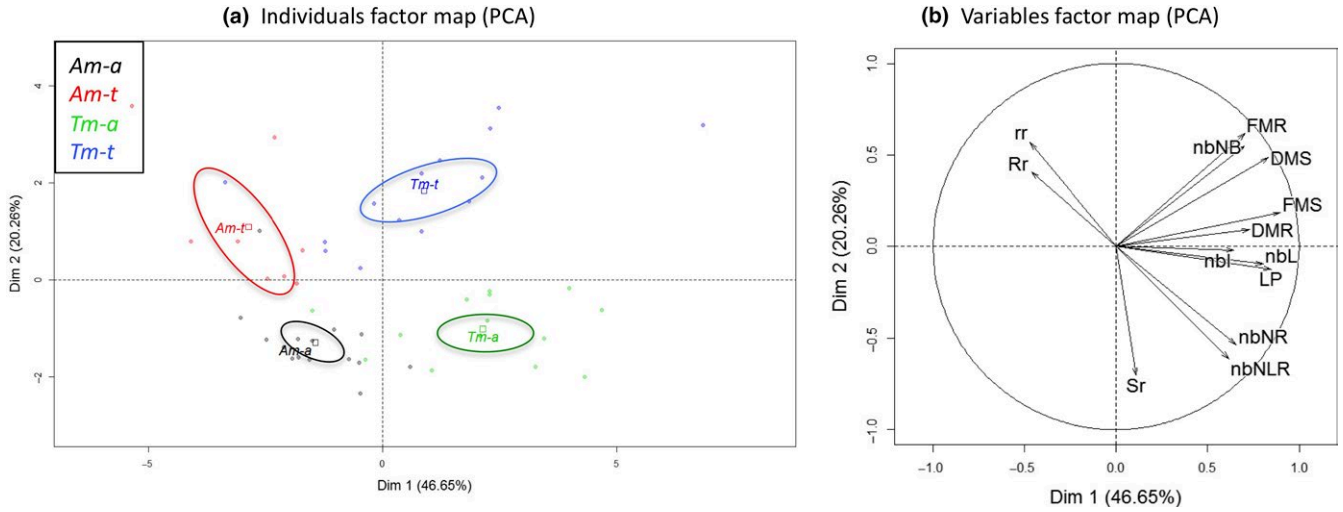


FIGURE 1 Principal component analysis (PCA) of morphological traits for the aquatic and terrestrial morphotypes conducted in aquatic (Am-a, Tm-a) or terrestrial (Am-t, Tm-t) conditions. (a) Individuals factor map. Each data point represented one plant. (b) Variables factor map. Variables were the length of the plant (LP); the number of internodes (nbI); the number of leaves (nbL); the number of nodes with roots (nbNR) and with leaves and roots (nbNLR); the number of nodes with buds alone (nbNB) and with buds and leaves (nbNBL) and/or roots (nbNBLR and nbNBR); the fresh mass of stems (FMS) and roots (FMR); dry mass of stems (DMS) and roots (DMR); ratios of fresh/dry mass for stems (Sr) and for roots (Rr); and the ratio of ratios (rr = Sr/Rr)

of shoots and roots, and number of nodes with buds (Figures 1b and S2). The second axis of the PCA explained 20.26% of the total inertia, and separated plants maintained under aquatic and terrestrial conditions (Figure 1a). In the aquatic condition, *L. grandiflora* plants showed a greater number of nodes with leaves and roots, a larger shoots ratio of fresh and dry masses, and a smaller fresh mass of roots as compared to plants from terrestrial condition (r^2 > 60%; Figures 1b and S2).

Morphotypes and experimental conditions significantly affected the studied variables (Table 1). All morphological, biomass and fitness variables were significantly greater in the terrestrial morphotype (Tm) than in the aquatic morphotype (Am; *p* values ranging from <.01 to <.001; Table 1, Figure 2). Even in aquatic condition, assumed to be less favorable for the terrestrial morphotype (Tm-a), terrestrial morphotype presented length values of about 30.8 cm (LP; Figure 2a), fresh or dry mass values

TABLE 1 Variations of morphological and biomass variables, and variables associated with the fitness and water content as a function of morphotype or condition

		Morphotype				Condition			
	Morphological trait (code)	**Inequality**	***df***	***F***	***p***	**Inequality**	***df***	***F***	***p***
Morphological variables	Length of the plant (LP)	**Am < Tm**	1	12.57	***	*a > t*	1	10.54	**
	Number of internodes (nbI)	**Am < Tm**	1	21.13	***				NS
	Number of leaves (nbL)	**Am < Tm**	1	251.6	***	*a > t*	1	91.38	*
Biomass variables	Fresh mass of shoots (FMS)	**Am < Tm**	1	65.59	***	*a > t*	1	6.749	*
	Fresh mass of roots (FMR)	**Am < Tm**	1	79.89	***	**a < t**	1	10.84	**
	Dry mass of shoots (DMS)	**Am < Tm**	1	101.2	***				NS
	Dry mass of roots (DMR)	**Am < Tm**	1	88.59	***				NS
Variables associated with the fitness	Number of nodes with roots (nbNR)	**Am < Tm**	1	20.2	***	*a > t*	1	52.82	***
	Number of nodes with leaves and roots (NbNLR)	**Am < Tm**	1	7.724	**	*a > t*	1	71.92	***
	Number of buds (NbB)	**Am < Tm**	1	33.06	***	**a < t**	1	5.74	*
Water content	Shoots ratio (Sr)	*Am > Tm*	1	9.052	**	*a > t*	1	284	***
	Roots ratio (Rr)	*Am > Tm*	1	6.269	*	**a < t**	1	7.588	**
	Ratio of ratios (rr)				NS	**a < t**	1	28.2	***

Principal morphological traits significantly higher in the terrestrial morphotype (Tm) than in the aquatic morphotype (Am) are represented in bold, and in italic when Am is significantly higher than Tm. When the terrestrial condition (−t) values are greater than aquatic (−a), it is represented in bold, in italic when (−a) was significantly greater than (−t). Significance codes: 0 "***"; .001 "**"; .01 "*"; nonsignificant "NS."

of shoots (FMS, DMS; Figure 2b,c) of about 3.27 g and 0.24 g, respectively, significantly more than those of the aquatic morphotype (Am-a (LP) = 23.2 cm, Am-a (FMS) = 1.18 g, Am-a (DMS) = 0.09 g). A similar pattern was observed for fitness variables: Tm-a produced 8 and 1.5 times more buds (Figure 2d) and nodes with roots (Figure 2e), respectively, than Am-a. Am showed significantly greater water content in shoots or roots than in Tm (p value < .01 and p value = .016, respectively; Table 1).

Independent of the morphotype, most of morphological and biomass variables were enhanced significantly in plants maintained under the aquatic condition, except for the number of buds and the water content of roots (p value < .01 to p value < .0001; Table 1).

In the terrestrial condition, both morphotypes had less water content in shoots than in aquatic condition. The ratio of shoots (Sr) was significantly different in aquatic or terrestrial conditions (Figure 2f). However, changing conditions did not disturb significantly the water content (rr) in aquatic and terrestrial morphotypes (Table 1).

3.2 | Metabolism

3.2.1 | Metabolomic analyses of shoot tissues

Among the 47 metabolites detected in shoot tissues, 22 compounds were at least 75% correlated with axes of the PCAs and were kept to perform this statistical procedure. The first axis of the PCA accounted for 65.74% of the total inertia. It separated Am and Tm, with Am-a and Tm-t being clearly opposed (Figure 3a). Plants from the Am-a treatment were characterized by higher levels of citrulline, glycine, lysine, and ornithine in the shoots (Figures 3b and S3). Plants from the Tm-t treatment exhibited higher amounts of arabinose, fructose, fumarate, galactose, glucose, malate, maltose, and xylose (Figures 4 and S3).

After this descriptive analysis, ANOVA analyses were run. In the terrestrial condition, shoots of Tm-t contained more organic acids than shoots from Am-t (confidence interval, $\alpha = .05$). It concerned the glycerate ($ratio_{(Tm/Am)} = 4.65$, Figure 4a), the malate ($ratio_{(Tm/Am)} = 2.11$; Figure 4b), and the xylose ($ratio_{(Tm/Am)} = 3.6$, Figure 4c). In the aquatic condition, the shoots of Tm-a had greater contents of 16 of the 22 detected metabolites than the shoots of Am-a (confidence interval, $\alpha = .05$). It concerned organic acids as the glycerate ($ratio_{(Tm/Am)} = 2.19$, Figure 4a), the malate ($ratio_{(Tm/Am)} = 1.98$, Figure 4b) and the xylose ($ratio_{(Tm/Am)} = 3.64$, Figure 4c) as well as most of amino acids as the aspartate ($ratio_{(Tm/Am)} = 2.86$, Figure 4d).

The second axis of the PCA accounted for 31.78% of the total inertia, and a clear-cut separation appeared in between Tm-a and the three others groups. Tm-t plants had greater amounts of fructose 6-phosphate (F6P), glucose 6-phosphate (G6P), isoleucine, leucine,

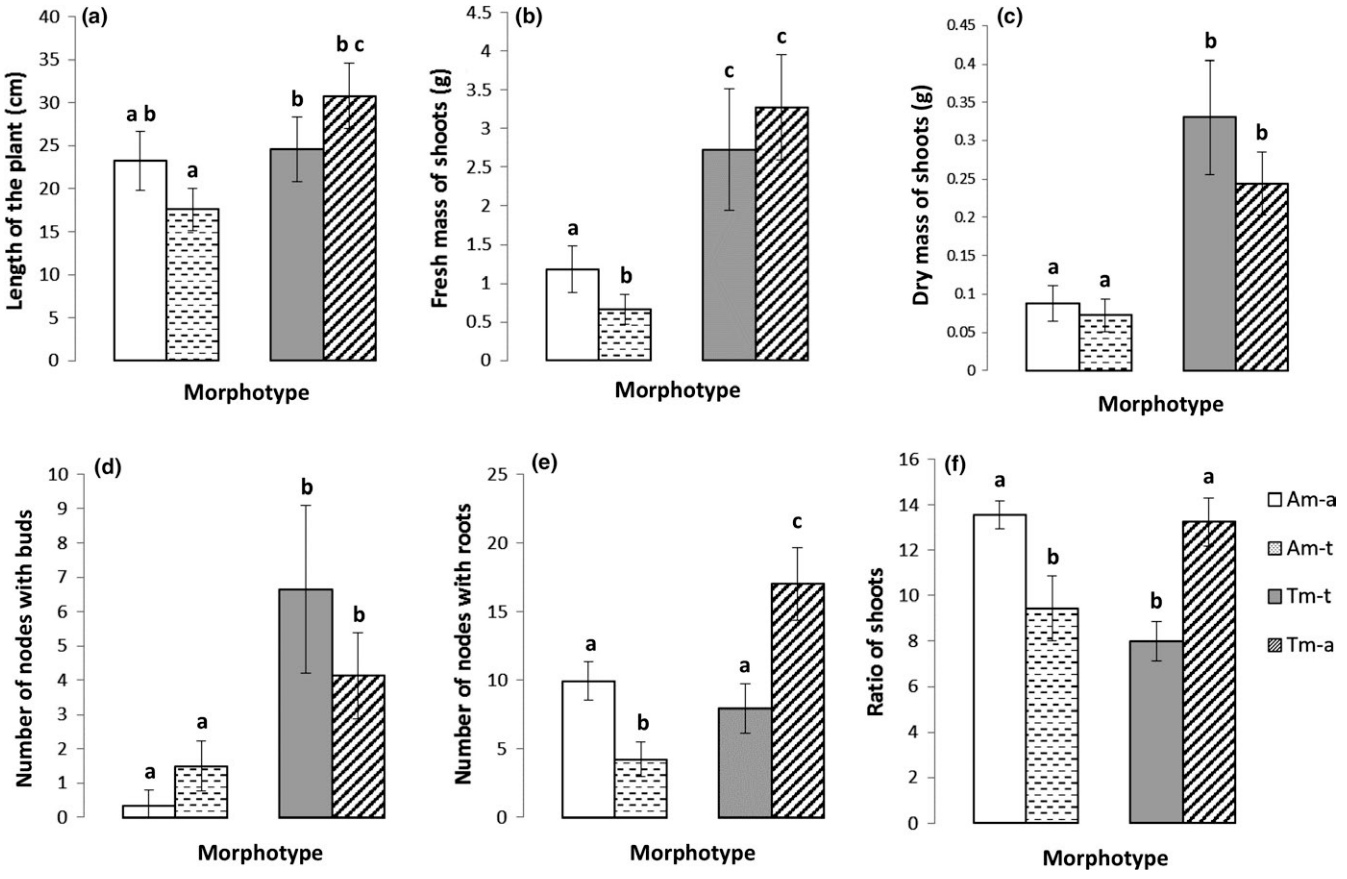


FIGURE 2 Variation of different traits of *Ludwigia grandiflora* for the aquatic and terrestrial morphotypes grown in aquatic (Am-a, Tm-a) or in terrestrial (Am-t, Tm-t) conditions. (a) the length of the plant (LP), (b) the fresh mass of shoots (FMS), (c) the dry mass of shoots (DMS), (d) the number of nodes with buds (nbNB), (e) the number of nodes with roots (nbNR), and (f) the ratio of shoots (Sr). Same letter indicates non-different values ($\alpha = .05$)

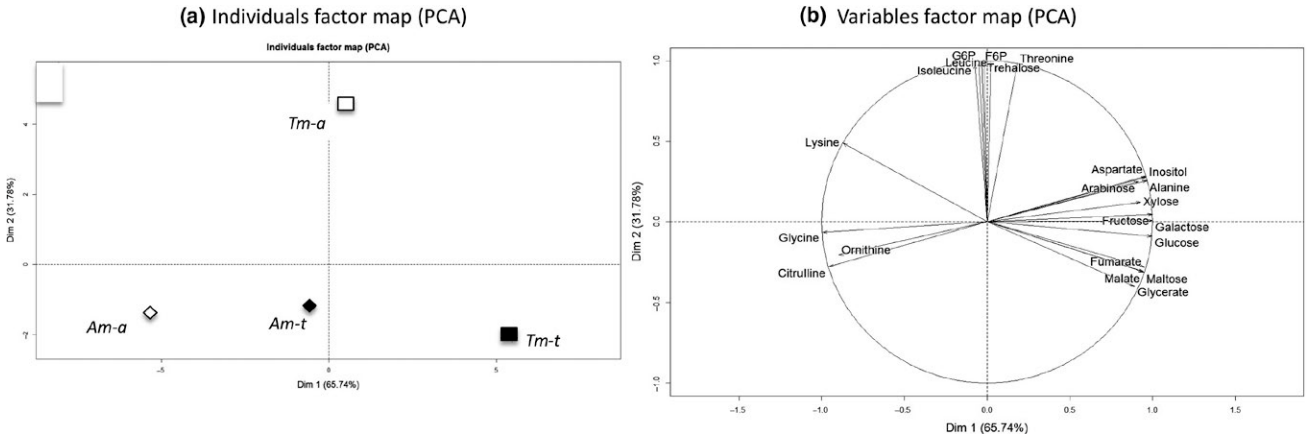


FIGURE 3 Principal component analysis (PCA) of shoot metabolite profiles for the aquatic and terrestrial morphotypes (Am, Tm) conducted in aquatic (Am-a, Tm-a) or in terrestrial (Am-t, Tm-t) conditions. (a) Individuals factor map. Each data point represented the mean of the metabolite in the three biological repetitions. (b) Variables factor map

trehalose, and threonine (Figures 3a,b and 4). ANOVA analyses revealed that valine, isoleucine, and leucine had lower concentrations (p value < .003, Figure 4f–h) in Am independently of condition (Am-a or Am-t), and also in Tm-t, than in Tm-a.

According to metabolite variations, the activity of three principal metabolic pathways was altered in shoots of *L. grandiflora* (Figure 5): the pathway of the glycerolipid metabolism (Holm p value < .01), the aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway (Holm p value = .0654), and the valine, leucine, and isoleucine degradation (Holm p value = .0654).

3.2.2 | Metabolomic analysis of root tissues

Eighteen of the 47 quantified metabolites were used for running the PCA (R^2 > 80%). The first axis explained 72.52% of the total inertia, and discriminated plants from aquatic and terrestrial conditions (Figure 6a), with Am-a and Tm-t again being clearly opposed. Am-a was characterized by higher amounts of adonitol, F6P, G6P, glutamate, glycerol 3-phosphate, phenylalanine, and putrescine in roots (R^2 > 84%; Figures 6b and S4). Conversely, Tm-t had higher levels of arabinose, fructose, galactose, glucose, mannose, serine,

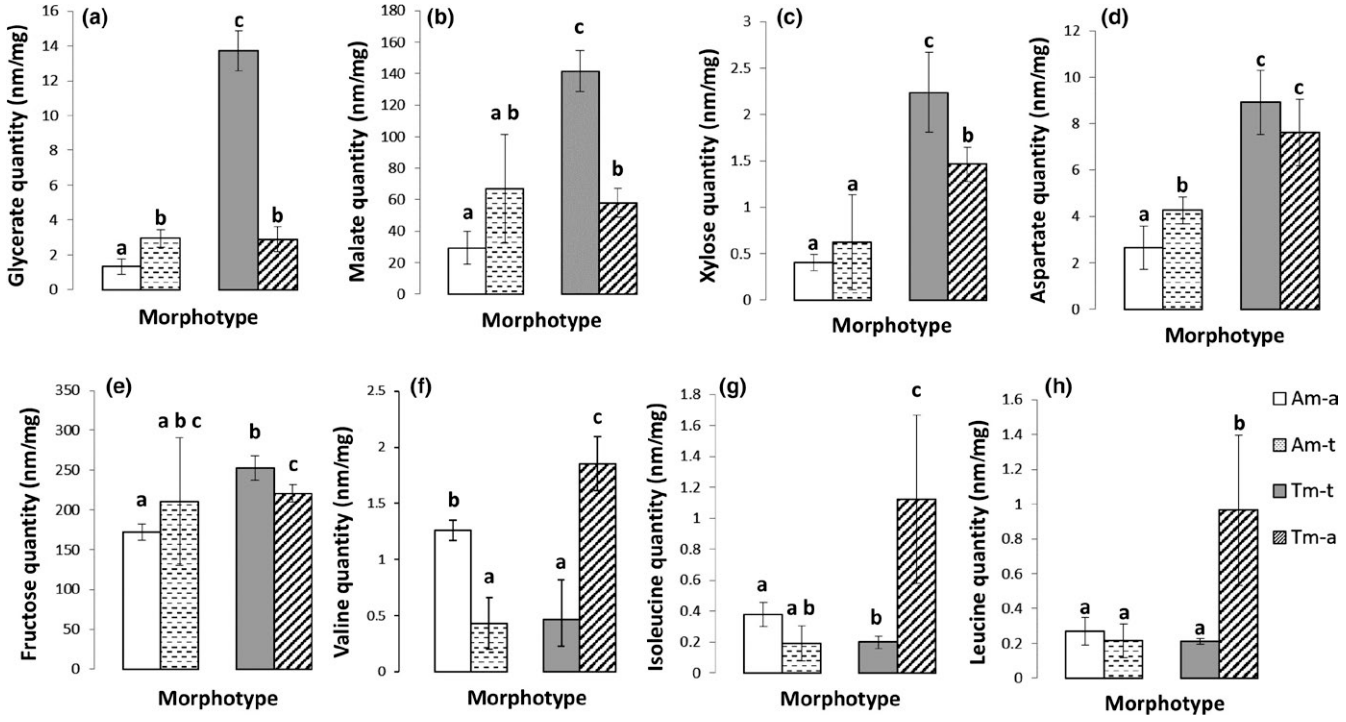


FIGURE 4 Changes in glycerate (a), malate (b), xylose (c), aspartate (d), fructose (e), valine (f), isoleucine (g), and leucine (h) in *Ludwigia grandiflora* shoots of aquatic and terrestrial morphotypes in aquatic (Am-a, Tm-a) or in terrestrial (Am-t, Tm-t) conditions. All values were expressed in nmol/mg of dry mass of stems. Same letter indicates non-different values (α=0.05).

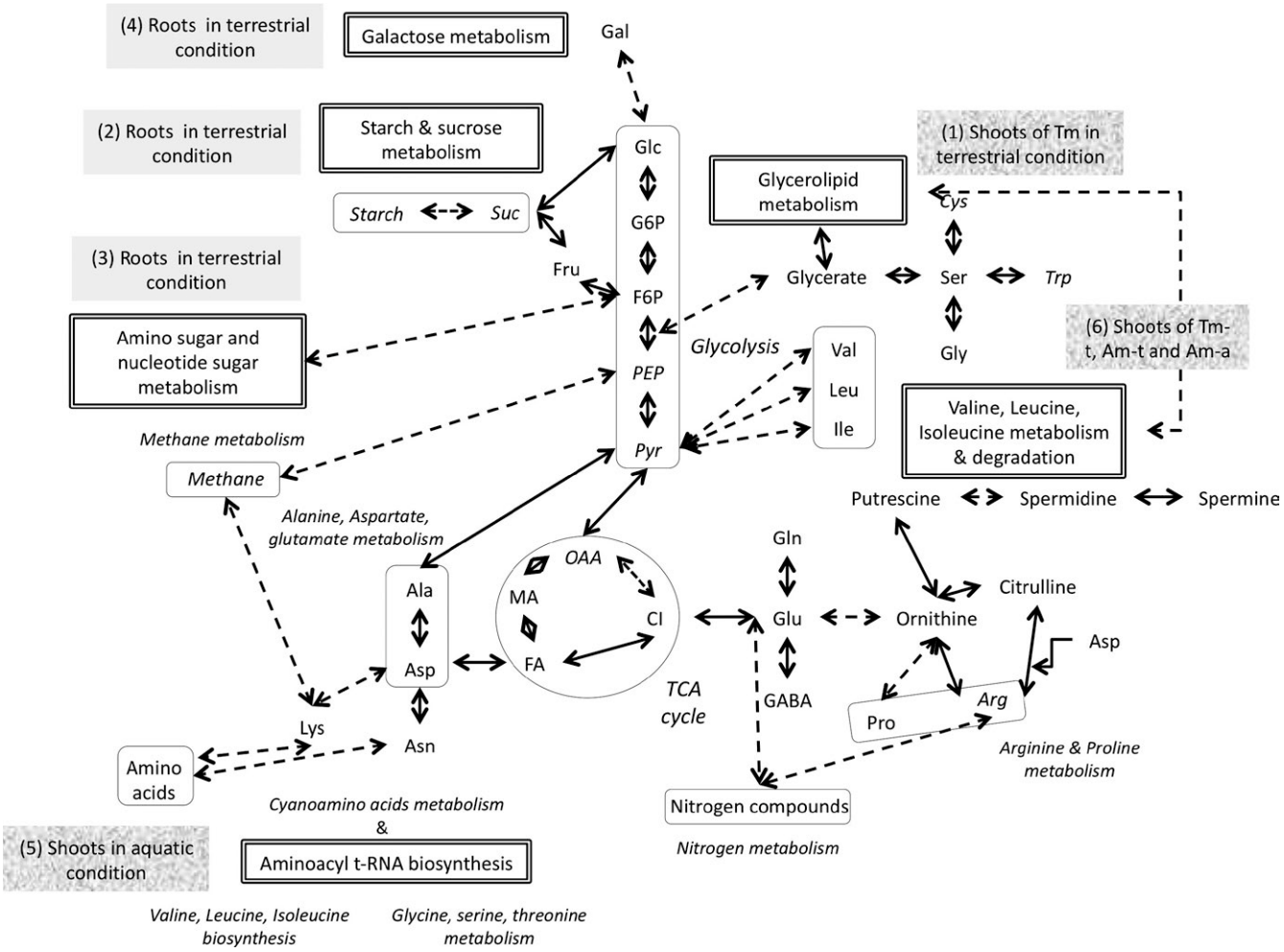


FIGURE 5 Overview of the metabolism of sugars, amino acids, and related compounds. (Elaborated from kegg pathways; http://www.kegg.jp.) The metabolites analyzed by mass spectrometry (GC-MS) and metabolomic pathways identified by MetaboAnalyst's server were indicated in a character box. Metabolites and others pathways noted in italic were not screened or not identified by MetaboAnalyst's server. The adaptation of *Ludwigia grandiflora* to terrestrial condition mobilized four metabolomic pathways (numbers 1–4) in roots or shoots. The aminoacyl t-RNA biosynthesis pathway (no. 5) was specifically involved in shoots in aquatic condition. The valine, leucine, isoleucine metabolism, and degradation (no. 6) were only not involved in terrestrial morphotype in the terrestrial condition (Tm-a, Terrestrial morphotype in aquatic condition; Am-a and Am-t, Aquatic morphotype in aquatic and terrestrial conditions, respectively). Ala, Alanine; Arg, Arginine; Asn, Asparagine; Asp, Aspartate; Cys, Cysteine; Ci, Citrate; FA, Fumarate; Fru, Fructose; F6P, Fructose 6-phosphate; Gln, Glutamine; Glu, Glutamate; Gly, Glycine; Ile, Isoleucine; GABA, Gamma aminobutyric acid; Gal, Galactose; Glc, Glucose; G6P, Glucose 6-phosphate; Leu, Leucine; Lys, Lysine; MA, Malate; OAA, Oxaloacetate; PEP, Phosphoenolpyruvic acid; Pro, Proline; Pyr, Pyruvate; Ser, Serine; Suc, Sucrose; TCA cycle, Tricarboxylic acid cycle; Trp, Tryptophan; and Val, Valine

and spermine (R^2 > 87%; Figures 6b and S4). The second axis distinguished Am-t from Tm-a morphotypes, according to higher contents in glycerol, mannitol and maltose in Am-t. Conversely, Tm-a plants had more amounts in ethanolamine (R^2 > 92%). These two axes explained 95.98% of the total inertia and resulted in a clear-cut separation of the groups, each being projected in one part of the PCA plane.

All sugars quantified from the root tissues were in lower concentrations in Am-a plants as compared to Tm-t plants (Figure 7). In the terrestrial condition, independent of morphotype, lesser amounts of F6P ($ratio_{(t/a)}$ = 0.58; p value < .01) and G6P ($ratio_{(t/a)}$ = 0.57; p value < .01), and greater quantities of arabinose ($ratio_{(t/a)}$ = 2.51; p value < .05; Figure 7a), fructose ($ratio_{(t/a)}$ = 1.43; p value < .05; Figure 7b), malate ($ratio_{(t/a)}$ = 2.91; p value < .01; Figure 7c), and mannose ($ratio_{(t/a)}$ = 2.81; p value < .01; Figure 7d) were found in the roots of *L. grandiflora*. The roots of Tm-a had similar values as Am-a in fructose (Figure 7b), galactose, glucose, and mannose (Figure 7d,e).

According to metabolite variations, the activity of four metabolic pathways was altered: metabolism of amino sugar and nucleotide sugar (Holm p value < .01), galactose (Holm p value < .01), fructose and mannose (Holm p value < .01), and the starch and sucrose (Holm p value < .05). These pathways seemed to be upregulated in roots of Tm-t, and, to a lesser extent, in aquatic Am-t.

4 | DISCUSSION

Using a large range of morphological measurements, we demonstrated that the terrestrial morphotype (Tm) outcompeted its aquatic

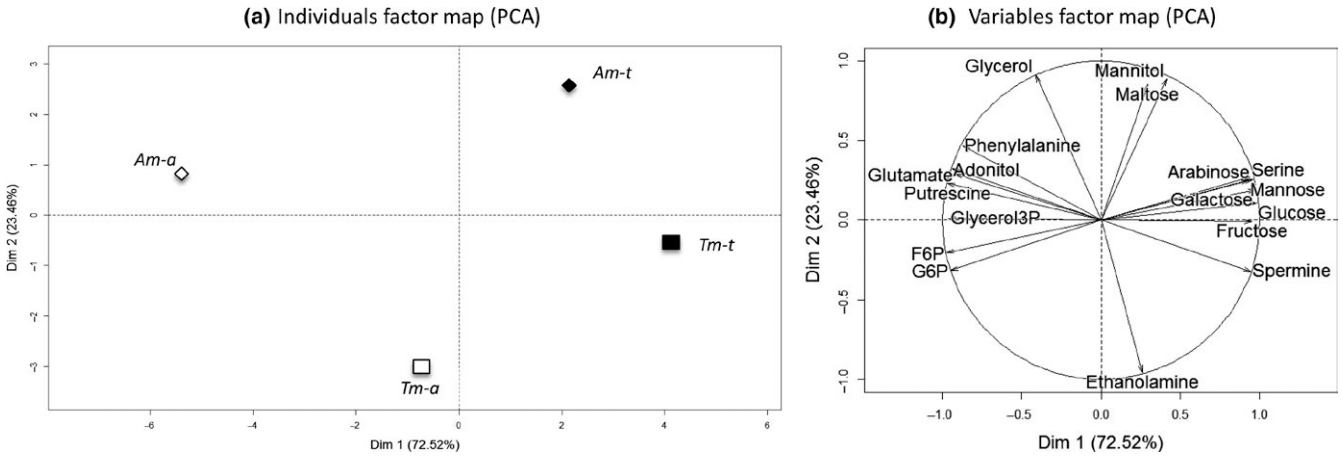


FIGURE 6 Principal component analysis (PCA) of root metabolite profiles for the aquatic and terrestrial morphotypes conducted in aquatic (Am-a, Tm-a) or in terrestrial (Am-t, Tm-t) conditions. (a) Individuals factor map. Each data point represented the mean of the metabolite in the three biological repetitions. (b) Variables factor map

counterpart in both terrestrial and aquatic habitats. The terrestrial morphotype produced plants of higher biomasses and had higher numbers of leaves and roots. While the terrestrial morphotype could be described a fast-growing plant, whereas aquatic morphotype is characterized by comparatively low growth performance. We suggest that this distinction may be partially supported by an increased root network in Tm, especially in the terrestrial condition, as it has been described under natural conditions by Haury et al. (2014). In addition, if the capacity for CO_2 uptake is required for achieving a higher relative growth of the Tm, this morphological change is not sufficient for supporting its higher growth rate, which also involves a higher efficiency in acquiring and assimilating available nutrients.

4.1 | Biomass allocation of *L. grandiflora* depends of the aquatic or terrestrial habitats

Biomass allocation reveals the survival strategies and adaptations to the environmental of the (micro)habitats where plants are developing (Xie, An, & Wu, 2005). Several invasive aquatic weeds are known for their ability to respond to different water levels by adjustments of the root system and/or biomass allocation (Geng et al., 2006; Hussner & Meyer, 2009; Hussner, Meyer, & Busch, 2009; Kercher & Zedler, 2004; Li, Yu, & Xu, 2011). All results indicated that *L. grandiflora* was well adapted to the terrestrial habitat because of its biomass allocation, morphological strategies that depended on the increase in root biomass allocation and water content. Significant morphological changes were also found in *L. grandiflora* plants from aquatic conditions, which developed a larger fresh mass of shoots as compared to plants from the terrestrial condition. Conversely, a larger fresh mass of roots was measured in *L. grandiflora* plants from the terrestrial condition. Accordingly, Hussner (2010) showed that the strong abilities of *L. grandiflora* to grow on drained soils were supported by an increase in the relative amount of root biomass and by changes in the development of the root system. Haury et al. (2014) also observed that the biomasses of field-collected *L. grandiflora* from meadows were characterized by twofold increase than in dykes and the percentage of roots was slightly higher in plants from meadows than in those from dykes.

4.2 | Colonization of terrestrial habitats is supported by metabolic adjustments

When released into a new geographic area, the habitats that best match with the biological requirements of the species should be colonized first, and the invasion success depends on propagules' pressure (Colautti, Grigorovich, & MacIsaac, 2006). Specimens of *L. grandiflora* first settled in different types of ponds and marshes (Lambert et al., 2010) suggesting that this preferred habitat should maximize the biological performance of the plants as compared to their relatives thriving in supposedly less favorable terrestrial habitats. In this work, we thus assumed that the colonization of terrestrial zones corresponded to secondary habitats for this invasive plant species. However, we did not verify this assumption and found that the terrestrial morphotype had higher biological performance, whatever the experimental situation. In order to better understand the changes that facilitated the expansion to terrestrial habitats, we described and compared the functional responses of the two morphotypes throughout metabolomic experiments.

In the terrestrial condition, the amounts of the branched amino acids (BCAAs) isoleucine, leucine, and valine were reduced in the stems of both morphotypes. These three amino acids share four common enzymes in their biosynthesis pathways and are thus jointly regulated (Joshi, Joung, Fei, & Jander, 2010). Protein degradation may have contributed to the elevation of the levels of these three amino acids. BCAAs can indeed provide alternative carbon sources for plants during stressful conditions (Taylor, Heazlewood, Day, & Millar, 2004), and the complete oxidation of these amino acids might have fuelled the particular needs of plants growing in supposedly stressful terrestrial condition. Finally, several amino acids, including BCAAs, play

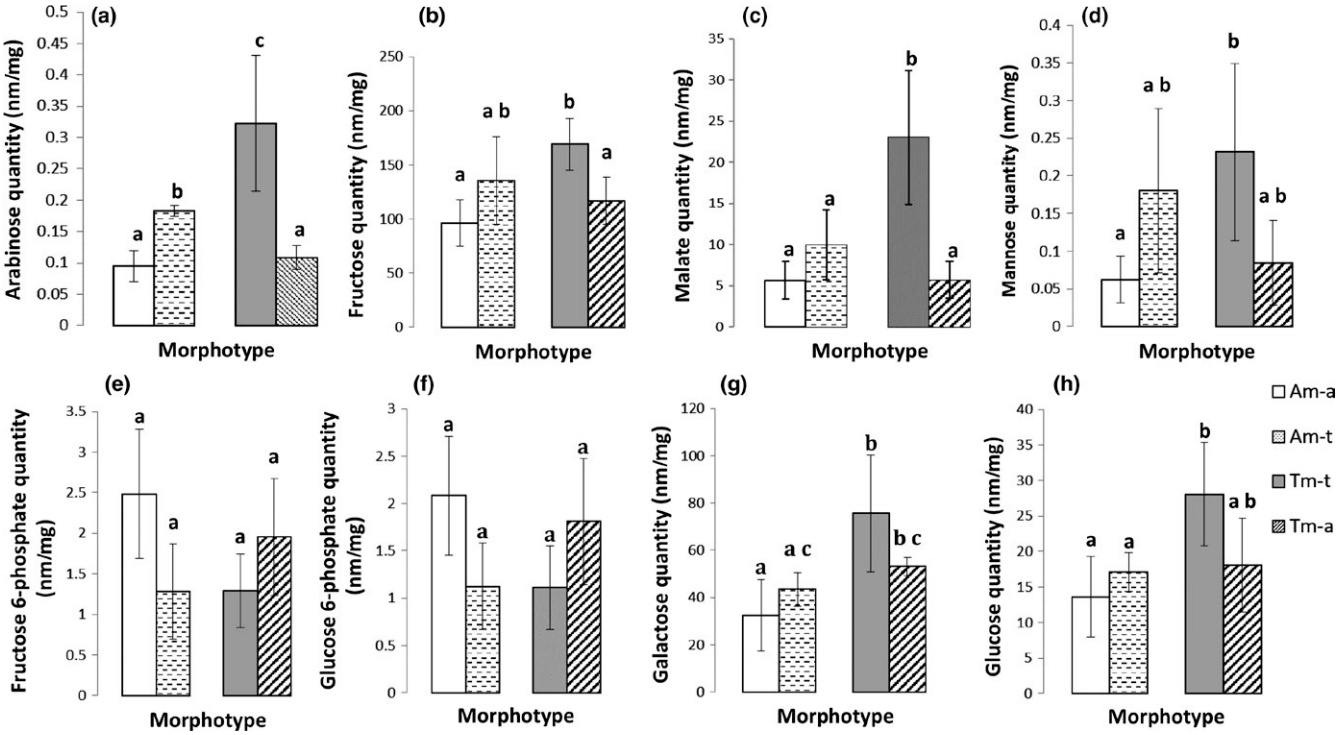


FIGURE 7 Changes in arabinose (a), fructose (b), malate (c), mannose (d), frutose 6-phosphate (e), glucose 6-Phosphate (f), galactose (g), and glucose (h) in *Ludwigia grandiflora* roots of aquatic and terrestrial morphotypes in aquatic (Am-a, Tm-a) or terrestrial (Am-t, Tm-t) conditions. All values were expressed in nmol/mg of dry mass of roots. Same letter indicates non-different values (α = .05)

important roles in stressed plants through their osmoprotective action (Campalans, Messeguer, Goday, & Pages, 1999).

Irrespective of morphotypes, three sugar metabolic pathways were enhanced in the root system of *L. grandiflora* grown in the terrestrial condition (starch and sugar metabolism, galactose metabolism, and amino sugar and nucleotide sugar metabolic pathways). In organs of wetland plant species, reserves of carbohydrates and ethanol fermentation are equally important in maintaining glycolysis and energetic metabolism in general (reviewed in Nakamura et al., 2012). In our study, the significant decrease in glucose-6-phosphate and fructose-6-phosphate levels measured in both morphotypes, and the concomitant increase in fructose and mannose concentrations pinpointed the enhanced glycolytic activities and energetic needs of plants developing in terrestrial condition. The major fermentation end products of ethanol fermentation are lactate and pyruvate, and deficiency of oxygen is also associated with elevation of alanine, GABA, succinate, and occasionally malate (Dixon, Hill, Jackson, Ratcliffe, & Sweetlove, 2006; Drew, 1997). As quantities of malate were greater in plants grown in the terrestrial condition than in those grown in the aquatic condition, it is possible that the former may have partially relied on ethanol fermentation for energy production in their root system. Fermentation processes drastically increase the demand for carbohydrates, and sugars are thus crucially important for surviving prolonged hypoxic conditions (Nakamura et al., 2012). Our results suggested that both morphotypes were able to active glycolysis and fermentation pathways in root tissues in response to the terrestrial condition. However, if glycolysis and fermentation pathways seemed to be similarly regulated between both morphotypes, root system were more developed in Tm. Poorter and Nagel (2000) reported that plants increase biomass allocation to roots in the presence of low levels of belowground resources, such as water and nutrients. This trait could correspond to a root adaptive response of *L. grandiflora* in a terrestrial environment.

4.3 | Adaptation to terrestrial habitats launched a new morphotype with new ability to endure stressful conditions

The greater content of glycerate in Tm-t than those observed for Am-t, Tm-a, and Am-a, suggests that Tm-t plants may have enhanced production of glycerolipids in shoot tissues. The decreased amounts of valine, leucine, and isoleucine from Tm-t plants support this assumption and may evidence the increased activity of the glycerolipid metabolism pathway (Figure 5; Hildebrandt, Nesi, Araujo, & Braun, 2015). Glycerolipids are the main components of biological membranes, especially photosynthetic membranes, like in thylakoids (Boudière et al., 2014), whose amounts might have been increased in Tm-t, in parallel to the general increase of all morphological and biomass variables. In addition, glycerolipids are also one constituent of the cuticular that coats the surface of plants, providing the crucial hydrophobic barrier that prevents water loss (Bird, 2008).

In addition to glycerate, Tm-t plants also had more malate amounts than the three other morphotypes. *Ludwigia grandiflora* is

described as a C4 plant (Madanes, Quintana, Kandus, & Bo, 2015). In these plants, C4 pathway requires the close integration of distinct photosynthetic processes: phosphoenolpyruvate (PEP) carboxylation and regeneration through the Calvin cycle (Gowik & Westhoff, 2011). For C4 plants, CO_2 is converted to bicarbonate by carbonic anhydrase, and fixed by phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPC) using PEP as CO_2 acceptor. The resulting oxaloacetate is rapidly converted to the more stable C4 acids malate whose amounts are high in Tm-t plants, or aspartate. These acids are then decarboxylated to supply CO_2 for ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCo). The product of this reaction is 3-phosphoglycerate (glycerate-3-phosphate).

4.4 | Terrestrial morphotype surprisingly outcompetes aquatic morphotype when reared under the aquatic condition

Am-a and Tm-a have higher contents of glycine and lysine, and, for Tm-a, higher levels of isoleucine, leucine, and threonine, in shoot tissues than plants from the terrestrial condition (Am-t and/or Tm-t). Our analysis of metabolic pathways revealed that the aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway was promoted for both morphotypes grown in the aquatic condition (Figure 5). Aminoacyl-tRNAs are key components of protein synthesis and consist of amino acids esterified to the 3′-end of tRNA, which are essential for ribosomal protein synthesis (Ibba, Curnow, & Söll, 1997). As the terrestrial morphotype of *L. grandiflora* showed a greater amount of isoleucine, leucine, and threonine, especially in the shoots in the aquatic condition, we suggest that this morphotype should be particularly efficient at using the aminoacetyl-tRNA biosynthesis for the production of these amino acids.

Amino acids are essential precursors for a large array of metabolites with multiple functions in plant growth and environmental stress responses (Less & Galili, 2008), and amino acids can also have direct protective mechanism in many terrestrial plants (Rhodes, Verslues, & Sharp, 1999). The terrestrial morphotype of *L. grandiflora* could experience the aquatic condition as a stress and could accumulate amino acids to protect the plant cells from damage (Rhodes et al., 1999). This hypothesis is supported by the fact that the Am-a seemed able to catabolize these three amino acids (Figure 5).

In stressful conditions, increased amino acid concentrations have been associated with decreased growth rates in terrestrial and aquatic plants (Maggio et al., 2002; Wallace, Secor, & Schrader, 1984). In the aquatic condition, most of morphological and biomass variables observed were higher in Tm than in Am suggesting that amino acid accumulation was not associated to reduced growth of Tm. Furthermore, as observed in terrestrial condition, Tm produced higher malate and pyruvate quantities than those observed for Am. This suggests that Tm could have also a high C4 photosynthesis activity in the aquatic condition as it was observed in terrestrial condition. Involvement of both metabolic pathways could reflect an adaptive response of terrestrial morphotype to the aquatic condition.

5 | CONCLUSION

In this work, we have demonstrated that the terrestrial morphotype of *L. grandiflora* showed higher growth capacities in both terrestrial and aquatic habitats as compared to the aquatic morphotype confirming our hypothesis. When transferred to terrestrial conditions, both morphotypes activated glycolysis and fermentation pathways, but, only the terrestrial morphotype had the capacity to maintain efficient growth. In the future studies, comparative analysis of both morphotypes could be carried out to determine whether the terrestrial morphotype shows a loss of secondary tissues and formation of aerenchyma in anoxic conditions, as reported in helophytes. To go further in the understanding of adaptive mechanisms of *L. grandiflora* to terrestrial condition, omics analysis will be realized.

Finally, we suggest focusing management actions on the terrestrial morphotype in order to control the expansion of *L. grandiflora*. Recent studies that assessed the effects of climate changes on the potential distribution of *L. grandiflora* predicts future increase in the size of its bioclimatic range, especially into Ireland, United Kingdom, Germany, the Netherlands, and Denmark (Gillard, Thiébaut, Deleu, & Leroy, 2017). In this context, the dispersal in terrestrial habitat of *L. grandiflora* could also concern in the future these Europeans countries.

ACKNOWLEDGMENTS

We would also like to thank the reviewers for their constructive comments to an earlier version of this manuscript. This research was supported by ONEMA (French National Agency for Water and Aquatic Environments).

CONFLICT OF INTEREST

None declared.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

D. Barloy coordinated all this study. All authors contributed to collecting data. Analysis of data and the first draft of the manuscript were carried out by K. Billet, J. Genitoni, D. Renault, and D. Barloy. All authors read and approved the final manuscript.

ORCID

Dominique Barloy http://orcid.org/0000-0001-5810-4871

REFERENCES

Antonio, C., Päpke, C., Rocha, M., Diab, H., Limami, A. M., Obata, T., … van Dongen, J. T. (2016). Regulation of primary metabolism in response to low oxygen availability as revealed by carbon and nitrogen isotope redistribution. *Plant Physiology*, *170*, 43–56. https://doi.org/10.1104/pp.15.00266

Bedoya, A. M., & Madriñán, S. (2015). Evolution of the aquatic habit in *Ludwigia* (Onagraceae): Morpho-anatomical adaptive strategies in the Neotropics. *Aquatic Botany*, *120*, 352–362. https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2014.10.005

Bird, D. A. (2008). The role of ABC transporters in cuticular lipid secretion. *Plant Science*, *174*, 563–569. https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2008.03.016

Boudière, L., Michaud, M., Petroutsos, D., Rebeille, F., Falconet, D., Bastien, O., … Maréchal, E. (2014). Glycerolipids in photosynthesis: Composition, synthesis and trafficking. *Biochimica et Biophysica Acta*, *1837*, 470–480. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2013.09.007

Campalans, A., Messeguer, R., Goday, A., & Pages, M. (1999). Plant responses to drought, from ABA signal transduction events to the action of the induced proteins. *Plant Physiology and Biochemistry*, *37*, 327–340. https://doi.org/10.1016/S0981-9428(99)80039-4

Colautti, R. I., Grigorovich, I. A., & MacIsaac, H. J. (2006). Propagule pressure: A null model for biological invasions. *Biological Invasions*, *8*, 1023–1037. https://doi.org/10.1007/s10530-005-3735-y

Dandelot, S., Verlaque, R., Dutartre, A., & Cazaubon, A. (2005). Ecological, dynamic and taxonomic problems due to *Ludwigia* (Onagraceae) in France. *Hydrobiologia*, *551*, 131–136. https://doi.org/10.1007/s10750-005-4455-0

Dietz, H., & Edwards, P. J. (2006). Recognition that causal processes change during plant invasion helps explain conflicts in evidence. *Ecology*, *87*, 1359–1367. https://doi.org/10.1890/0012-9658(2006)87[1359:RTCPCD]2.0.CO;2

Dixon, M. H., Hill, S. A., Jackson, M. B., Ratcliffe, R. G., & Sweetlove, L. J. (2006). Physiological and metabolic adaptations of *Potamogeton pectinatus* L. tubers support rapid elongation of stem tissue in the absence of oxygen. *Plant and Cell Physiology*, *47*, 128–140. https://doi.org/10.1093/pcp/pci229

van Dongen, J. T., Gupta, K. J., Ramírez-Aguilar, S. J., Araújo, W. L., Nunes-Nesi, A., & Fernie, A. R. (2011). Regulation of respiration in plants: A role for alternative metabolic pathways. *Journal of Plant Physiology*, *168*, 1434–1443. https://doi.org/10.1016/j.jplph.2010.11.004

Drew, M. C. (1997). Oxygen deficiency and root metabolism: Injury and acclimation under hypoxia and anoxia. *Annual Review of Plant Biology*, *48*, 223–250. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.48.1.223

EPPO (2011). *Ludwigia grandiflora* and *L. peploides* Onagraceae – Water primroses. *EPPO Bulletin*, *41*, 414–418.

Fortney, R. H., Benedict, M., Gottgens, J. F., Walters, T. L., Leady, B. S., & Rentch, J. (2004). Aquatic plant community composition and distribution along an inundation gradient at two ecologically-distinct sites in the Pantanal region of Brazil. *Wetlands Ecology and Management*, *12*, 575–585. https://doi.org/10.1007/s11273-005-1763-0

Fox, J. (2005). The R Commander: A basic-statistics graphical user interface to R. *Journal of Statistical Software*, *14*, 1–42.

Frost-Christensen, H., & Floto, F. (2007). Resistance to CO_2 diffusion in cuticular membranes of amphibious plants and the implication for CO_2 acquisition. *Plant, Cell & Environment*, *30*, 12–18. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2006.01599.x

Fukao, T., & Bailey-Serres, J. (2004). Plant responses to hypoxia—Is survival a balancing act? *Trends in Plant Science*, *9*, 449–456. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2004.07.005

Geng, Y. P., Pan, X. Y., Xu, C. Y., Zhang, W. J., Li, B., & Chen, J. K. (2006). Phenotypic plasticity of invasive *Alternanthera philoxeroides* in relation to different water availability, compared to its native congener. *Acta Oecologica*, *30*, 380–385. https://doi.org/10.1016/j.actao.2006.07.002

Gillard, M., Thiébaut, G., Deleu, C., & Leroy, B. (2017). Present and future distribution of three aquatic plants taxa across the world: Decrease in native and increase in invasive ranges. *Biological Invasions*, *19*, 2159–2170. https://doi.org/10.1007/s10530-017-1428-y

Gladish, D. K., Xu, J., & Niki, T. (2006). Apoptosis-like programmed cell death occurs in procambium and ground meristem of pea (*Pisum sativum*) root tips exposed to sudden flooding. *Annals of Botany*, *97*, 895–902. https://doi.org/10.1093/aob/mcl040

Gowik, U., & Westhoff, P. (2011). The path from C3 to C4 photosynthesis. *Plant Physiology*, *155*, 56–63. https://doi.org/10.1104/pp.110.165308

Gunawardena, A. H. L. A. N., Pierce, D. M., Jackson, M. B., Hawes, C. R., & Evans, D. E. (2001). Characterization of programmed cell death during aerenchyma formation induced by ethylene or hypoxia in roots of maize (*Zea mays* L.). *Planta*, *212*, 205–214. https://doi.org/10.1007/s004250000381

Haury, J., Damien, J.-p., Maisonneuve, J.-l., & Bottner, B. (2012). La gestion des Jussies en milieu aquatique et en prairies humides. In J. Haury & R. Matrat (Eds.), *Plantes invasives, la nécessité de différentes approches* (pp. 171–189). *Actes du colloque régional Les plantes invasives en Pays-de-la-Loire, Æstuaria, collection Paroles des Marais atlantiques* 18.

Haury, J., Druel, A., Cabral, T., Paulet, Y., Bozec, M., & Coudreuse, J. (2014). Which adaptations of some invasive *Ludwigia* spp. (Rosidae, Onagraceae) populations occur in contrasting hydrological conditions in Western France? *Hydrobiologia*, *737*, 45–56. https://doi.org/10.1007/s10750-014-1815-7

Haury, J., Noël, F., Bozec, M., Coudreuse, J., Guil, J., Marrel, G., … Damien, J.-P. (2011). Importance of Ludwigia grandiflora as invasive weed in meadows and pastures in Western France. 3rd International Symposium on Weeds and Invasive Plants October 2–7, 2011 in Ascona, Switzerland: 5. Retrieved from http://www.wsl.ch/epub/ewrs/authors/detail_EN?id=139&type=authors

Hildebrandt, T. M., Nesi, A. N., Araujo, W. L., & Braun, H. P. (2015). Amino acid catabolism in plants. *Molecular Plant*, *8*, 1563–1579. https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.09.005

Hussner, A. (2009). Growth and photosynthesis of four invasive aquatic plant species in Europe. *Weed Research*, *49*, 506–515. https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2009.00721.x

Hussner, A. (2010). Growth response and root system development of the invasive *Ludwigia grandiflora* and *Ludwigia peploides* to nutrient availability and water level. *Fundamental and Applied Limnology*, *177*, 189–196. https://doi.org/10.1127/1863-9135/2010/0177-0189

Hussner, A., & Meyer, C. (2009). The influence of water level on growth and photosynthesis of *Hydrocotyle ranunculoides* L.fil. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*, *204*, 755–761. https://doi.org/10.1016/j.flora.2008.10.005

Hussner, A., Meyer, C., & Busch, J. (2009). The influence of water level and nutrient availability on growth and root system development of *Myriophyllum aquaticum* (Vell.) Verdc. *Weed Research*, *49*, 73–80. https://doi.org/10.1111/j.1365-3180.2008.00667.x

Hussner, A., Stiers, I., Verhofstad, M. J. J. M., Bakker, E. S., Grutters, B. M. C., Haury, J., … Anderson, L. W. (2017). Management and control methods of invasive alien freshwater aquatic plants: A review. *Aquatic Botany*, *136*, 112–137. https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2016.08.002

Hussner, A., Windhaus, M., & Starfinger, U. (2016). From weed biology to successful control: An example of successful management of *Ludwigia grandiflora* in Germany. *Weed Research*, *56*, 434–441. https://doi.org/10.1111/wre.12224

Ibba, M., Curnow, A. W., & Söll, D. (1997). Aminoacyl-tRNA synthesis: Divergent routes to a common goal. *Trends in Biochemical Sciences*, *22*, 39–42. https://doi.org/10.1016/S0968-0004(96)20033-7

Joshi, V., Joung, J. G., Fei, Z., & Jander, G. (2010). Interdependence of threonine, methionine and isoleucine metabolism in plants: Accumulation and transcriptional regulation under abiotic stress. *Amino Acids*, *39*, 933–947. https://doi.org/10.1007/s00726-010-0505-7

Jung, J., Lee, S. C., & Choi, H. K. (2008). Anatomical patterns of aerenchyma in aquatic and wetland plants. *Journal of Plant Biology*, *51*, 428–439. https://doi.org/10.1007/BF03036065

Justin, S. H. F. W., & Armstrong, W. (1987). The anatomical characteristics of roots and plant response to soil flooding. *New Phytologist*, *106*, 465–495. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1987.tb00153.x

Kercher, S. M., & Zedler, J. B. (2004). Flood tolerance in wetland angiosperms: A comparison of invasive and non invasive species. *Aquatic Botany*, *80*, 89–102. https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2004.08.003

Lambert, E., Dutartre, A., Coudreuse, J., & Haury, J. (2010). Relationships between the biomass production of invasive *Ludwigia* species and physical properties of habitats in France. *Hydrobiologia*, *656*, 173–186. https://doi.org/10.1007/s10750-010-0440-3

Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software*, *25*, 1–18.

Less, H., & Galili, G. (2008). Principal transcriptional programs regulating plant amino acid metabolism in response to abiotic stresses. *Plant Physiology*, *147*, 316–330. https://doi.org/10.1104/pp.108.115733

Li, Z. Q., Yu, D., & Xu, J. (2011). Adaptation to water level variation: Responses of a floating-leaved macrophyte *Nymphoides peltata* to terrestrial habitats. *Annales de Limnologie-International Journal of Limnology*, *47*, 97–102. https://doi.org/10.1051/limn/2010029

Madanes, N., Quintana, R. D., Kandus, P., & Bo, R. F. (2015). Species richness and functional groups of angiosperms from the Parana River Delta region (Argentina). *Check List*, *11*, 1803. https://doi.org/10.15560/11.6.1803

Maggio, A., Miyazaki, S., Veronese, P., Fujita, T., Ibeas, J. I., Damsz, B., … Bressan, R. A. (2002). Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal*, *31*, 699–712. https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2002.01389.x

Malik, A. I., Colmer, T. D., Lambers, H., & Schortemeyer, M. (2003). Aerenchyma formation and radial O_2 loss along adventitious roots of wheat with only the apical root portion exposed to O_2 deficiency. *Plant, Cell and Environment*, *26*, 1713–1722. https://doi.org/10.1046/j.1365-3040.2003.01089.x

Nakamura, T., Yamamoto, R., Hiraga, S., Nakayama, N., Okazaki, K., Takahashi, H., … Komatsu, S. (2012). Evaluation of metabolite alteration under flooding stress in soybeans. *Japan Agricultural Research Quarterly*, *46*, 237–248. https://doi.org/10.6090/jarq.46.237

Narsai, R., Rocha, M., Geigenberger, P., Whelan, J., & van Dongen, J. T. (2011). Comparative analysis between plant species of transcriptional and metabolic responses to hypoxia. *New Phytologist*, *190*, 472–487. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2010.03589.x

Nowak, J. S., Ono, J., & Cronk, Q. C. B. (2010). Anatomical study of an aquatic mustard: *Subularia aquatica* (Brassicaceae). *Aquatic Botany*, *93*, 55–58. https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2010.02.004

Poorter, H., & Nagel, O. (2000). The role of biomass allocation in the growth responses of plants to different levels of light CO and water: A quantitative review. *Australian Journal of Plant Physiology*, *27*, 595–607.

R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. ISBN 3-900051-07-0. Retrieved from http://www.R-project.org

Rhodes, D., Verslues, P. E., & Sharp, R. E. (1999). Role of amino acids in abiotic stress resistance. In B. K. Singh (Ed.), *Plant amino acids: Biochemistry and bio- technology* (pp. 319–359). New York, NY: Marcel Dekker.

Sand-Jensen, K., Pedersen, O., Binzer, T., & Borum, J. (2005). Contrasting oxygen dynamics in the freshwater isoetid *Lobelia dortmanna* and the marine seagrass *Zostera marina*. *Annals of Botany*, *96*, 613–623. https://doi.org/10.1093/aob/mci214

Serra, A. A., Nuttens, A., Larvor, V., Renault, D., Couée, I., Sulmon, C., & Gouesbet, G. (2013). Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany*, *64*, 2753–2766. https://doi.org/10.1093/jxb/ert119

Taylor, N. L., Heazlewood, J. L., Day, D. A., & Millar, A. H. (2004). Lipoic acid-dependent oxidative catabolism of alpha-keto acids in mitochondria provides evidence for branched-chain amino acid catabolism in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *134*, 838–848. https://doi.org/10.1104/pp.103.035675

Thouvenot, L., Haury, J., & Thiébaut, G. (2013). A success story: Water primroses, aquatic plant pests. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, *23*, 790–803.

Voesenek, L. A. C. J., Colmer, T. D., Pierik, R., Millenaar, F. F., & Peeters, A. J. M. (2007). How plants cope with complete submergence. *New Phytologist*, *170*, 213–226.

Wallace, W., Secor, J., & Schrader, L. E. (1984). Rapid accumulation of g-aminobutyric acid and alanine in soybean leaves in response to an abrupt transfer to lower temperature, darkness, or mechanical manipulation. *Plant Physiology*, *75*, 170–175. https://doi.org/10.1104/pp.75.1.170

Wells, C., & Pigliucci, M. (2000). Adaptive phenotypic plasticity: The case of heterophylly in aquatic plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *3*, 1–18. https://doi.org/10.1078/1433-8319-00001

Xia, J., Sinelnikov, I., Han, B., & Wishart, D. S. (2015). MetaboAnalyst 3.0 – Making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research*, *43*, 251–257. https://doi.org/10.1093/nar/gkv380

Xie, Y. H., An, S. Q., & Wu, B. F. (2005). Resource allocation in the submerged plant *Vallisneria natans* related to sediment type, rather than water-column nutrients. *Freshwater Biology*, *50*, 391–402. https://doi.org/10.1111/j.1365-2427.2004.01327.x

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Billet K, Genitoni J, Bozec M, Renault D, Barloy D. Aquatic and terrestrial morphotypes of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora*, show distinct morphological and metabolomic responses. *Ecol Evol*. 2018;8:2568–2579. https://doi.org/10.1002/ece3.3848

3. Présentation synthétique de la publication Genitoni *et al.*, en préparation

La plasticité phénotypique est une composante du succès des invasions. La colonisation rapide des prairies par la jussie interroge quant aux mécanismes d'acclimatation permettant le succès de l'invasion. Dans ce cadre, les travaux de Haury *et al.* (2014) et Billet *et al.* (2018) ont permis une première caractérisation de *L. grandiflora* au niveau morphologique et métabolomique.

L'objectif de cette étude était d'une part de caractériser plus précisément les deux morphotypes aquatique et terrestre de *L. grandiflora*, et d'autre part, de quantifier la plasticité phénotypique des deux morphotypes en réponse aux changements de milieux.

La caractérisation des deux morphotypes a été menée sur un temps d'expérimentation plus long (28 jours) que dans la publication Billet *et al.* (2018) (7 jours). Ainsi, des mesures morphologiques et métabolomiques ont été réalisées à 14 et 28 jours chez les morphotypes aquatique et terrestre (Am et Tm) en condition aquatique (Am-a et Tm-a) et en condition terrestre (Am-t et Tm-t). Pour une caractérisation plus fine, le dosage de phytohormones comme l'acide abscissique, l'auxine, l'acide jasmonique et l'acide salicylique a été effectué. Enfin, la plasticité phénotypique a été évaluée via le calcul de l'indice de plasticité « relative distance plasticity index » (RDPI) proposé par Valladares *et al.* (2006).

Nos résultats confirment l'existence de deux morphotypes et les conclusions proposées par Billet *et al.* (2018). Ainsi, le morphotype terrestre présente des traits morphologiques plus importants que ceux du morphotype aquatique, quelle que soit la condition. En revanche, le morphotype aquatique présente une plasticité phénotypique plus importante pour la majorité des traits morphologiques, des métabolites et des phytohormones étudiées. La plasticité phénotypique des 2 morphotypes augmente au cours du temps (T14/T28) pour les traits morphologiques, toujours en faveur du morphotype aquatique. Pour les métabolites analysés, les plasticités observées augmentent chez le morphotype terrestre, ce qui est plus ponctuel chez le morphotype aquatique. Ces résultats suggèrent que la plasticité phénotypique pourrait participer à l'acclimatation du morphotype aquatique à la condition terrestre. Une fois la transition au milieu terrestre réalisée, la plasticité phénotypique de la jussie est réduite. Ce manuscrit en cours de

préparation est mis en format publication pour Journal of Ecology et a fait l'objet à ce stade d'une première relecture par les différents auteurs.

4. Publication Genitoni *et al.*, en préparation (Journal of Ecology)

Aquatic and terrestrial morphotypes of the invasive aquatic plant *Ludwigia grandiflora* exhibit distinct plasticity during the transition between environments in relation to their adaptive potential

Julien Genitoni[1,2], Kévin Billet[1], Danièle Vassaux[1], Michel Bozec[1], Sylvie Citerne[3], David Renault[4,5], Stéphane Maury[2,] Dominique Barloy[1]

[1] UMR ESE, Ecology and Ecosystem Health, Agrocampus Ouest, INRA, 35042 Rennes, France

[2] Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), EA1207 USC1328 INRA, Université d'Orléans, 45067, Orléans, France

[3] Plateau Technique de Chimie du Végétal, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles, France

[4]UMR CNRS 6553 EcoBio, University of Rennes 1, Rennes, France

[5]Institut Universitaire de France, 1 rue Descartes, 75231 Paris Cedex, France

Revue ciblée : Journal of Ecology

Abstract

1. Biological invasion represents the third threat on biodiversity and ecosystems after global change and habitat destruction. The invasive species show the ability to colonize new environments that questioning their ability to adapt rapidly thought phenotypic plasticity expression. *Ludwigia grandiflora*, an aquatic invasive plant, invaded rivers and more recently, especially in France, wet meadows. Two morphotypes have already been described, an aquatic one and another living half of the year in emerged condition.

2. Here, phenotypic plasticity was evaluated by calculating relative distance plasticity index RDPI in response to environmental changes (terrestrial versus aquatic) for the two morphotypes. RDPI were measured for morphological traits, metabolic and phytohormonal contents
3. Our results showed that the aquatic morphotype displayed higher phenotypic plasticity indexes than the terrestrial one. However, the morphological trait values for the aquatic morphotype were of lower magnitude. In addition, plasticity indexes evolved during the acclimation process. *Synthesis*: Our data showed that the two morphologically distinct forms of the invasive L g displayed not only distinct traits values (morphology, metabolism and hormones) but also plasticity when acclimatized in terrestrial or aquatic environments. This distinct potential could participate to the fast adaptation of the aquatic morphotype to the emerged conditions and be then limited after the differentiation into a terrestrial (differentiated) morphotype

Key words: Phenotypic plasticity index, invasive plant, water primrose, changing environment.

Abbreviations

LP : Length of plant

nbL : number of leaves

nbNR : Number of nodes with roots

nbB : number of nodes with buds

FMS : Fresh mass of shoots

FMR : Fresh mass of roots

DMS : Dry mass of shoots

DMR : Dry mass of roots

Sr : Shoot ratio (FMS/DMS)

Rr : Root ratio (FMR/DMR)

WC : Water content ((FMS+FMR)/(DMS+DMR))

Tm : terrestrial morphotype

Am : Aquatic morphotype

Introduction

Adaptation, in the broad sense, refers to acclimation or adaptation *sensu stricto*. Both involve phenotypic changes (morphological, physiological, and behavioural), at the individual scale in the first case with reversible and in the population for the second. Acclimation is a short term and reversible process while the adaptation takes place over a longer period of time and is the product of natural selection (Yona, Frumkin, & Pilpel, 2015). Phenotypic changes involve two mechanisms: selection and phenotypic plasticity (Grenier, Barre, & Litrico, 2016). Selection is associated with an increase of favourable allele's frequency through several generations, and conversely a decrease of unfavourable alleles. Phenotypic plasticity, a concept developed by Bradshaw in 1965, represents the ability of one genotype to produce several phenotypes according to the environment (Pigliucci, 2005). Phenotypic plasticity can play a role in short-term responses of sessile organisms to global changes (Chevin, Lande, & Mace, 2010; Mark Van Kleunen & Fischer, 2005; Matesanz, Gianoli, & Valladares, 2010).

Phenotypic plasticity is a well-studied concept and several studies have shown that morphological and physiological traits could be plastic in context of global change (Bonamour, Chevin, Charmantier, & Teplitsky, 2019), in response to abiotic stress as light (Sultan, 2001; Siebenkäs, Schumacher, & Roscher, 2015; Mendonça *et al.*, 2019), or in combination of drought, salinity and heat stress (Shaar-Moshe, Hayouka, Roessner, & Peleg, 2019). Phenotypic plasticity can be adaptive, i.e. go in the same direction as the optimal value favoured by selection in the new environment, and therefore allows an organism to better adapt to its environment and improve its fitness, or non-adaptive when phenotypes are further away from their optimum (Ghalambor, McKAY, Carroll, & Reznick, 2007; Davidson, Jennions, & Nicotra, 2011; Gibert, Debat, & Ghalambor, 2019). For example, Van Kleunen *et al.* (2007) studied the responses of 52 genotypes of the aquatic plant, *Ranunculus reptans* to flooding and competition stresses. They showed that environmental stresses can affect phenotypic plasticity of morphological traits and can be adaptive. However, Acasuso-Rivero *et al.* (2019) carried out a meta-analysis about phenotypic plasticity and its adaptive character and showed that plasticity is not related to fitness, and seems to be more often neutral or maladaptative. The importance of phenotypic plasticity in rapid adaptation to new environmental conditions is no longer disputed, but the understanding of these mechanisms in evolution and on the part of adaptive, neutral or maladaptive plasticity remains

debated (Acasuso-Rivero *et al.*, 2019). Representation of phenotypic plasticity used reaction norms and various plasticity index (Valladares, Sanchez-Gomez, & Zavala, 2006; Lande, 2009). Valladares *et al.* (2006) tested 17 plasticity index and proposed to use the relative distance plasticity index (RDPI) which showed similar quantification that 12 others index among index studied.

During invasion process, several determinants, including phenotypic plasticity, contribute to the success of the introduced propagules (Li, Du, Guan, Yu, & van Kleunen, 2016; Oduor, Leimu, & van Kleunen, 2016; Szabó, Peeters, Várbíró, Borics, & Lukács, 2019). However the fact that phenotypic plasticity is higher in invasive species, (Trussell & Smith 2000; Sexton *et al.* 2002; Daehler, 2003; Davidson *et al.* 2011; Morris, 2014) is still very much under debate. There are many contradictory studies which have not allowed to as fully understand this matter yet (Chown, Slabber, McGeoch, Janion, & Leinaas, 2007; Godoy, Valladares, & Castro-Díez, 2011; Matzek, 2012; Lamarque *et al.*, 2013). In order to unravel this debate, Lande (2015) and Murren *et al.* (2015) suggested looking at the costs of plasticity. Furthermore, Lande (2015) highlights that adaptation to a new environment can be done by a transient increase in plasticity then by a decrease in plasticity involving slow genetic assimilation. Thus, following the plasticity evolution since introduction seems to be important to assess the role of plasticity in the invasion success (Lande, 2015; Murren *et al.*, 2015).

In Europe, one of the most invasive aquatic plant is *Ludwigia grandiflora, subsp. hexapetala* (Hussner, Windhaus, & Starfinger, 2016). Native to South America, this species arrived in France in 19th century and has rapidly colonized static or slow-flowing waters, river banks and more recently wet meadows (Dandelot, Verlaque, Dutartre, & Cazaubon, 2005; Lambert, Dutartre, Coudreuse, & Haury, 2010). *L. grandiflora* is an amphibious plant, and Haury *et al.* (2014) and Billet *et al.(*2018) have already reported existence of two distinct morphotypes. One of the two morphotypes is considered as aquatic (aquatic morphotype) and spends its entire life cycle in water. The second one is considered as terrestrial (terrestrial morphotype) and growing in wet meadows, undergoes a seasonality of water level. Indeed, this terrestrial morphotype is underwater from November to April and out of the water the rest of the time. Thus, Haury *et al.* (2014) and Billet *et al.* (2018) worked in the field and in the growth chamber respectively and showed morphological differences between aquatic and terrestrial morphotypes. Aquatic morphotype had a lower number of nodes, smaller number of leaves and stronger water content

than terrestrial morphotype. The latter, on the other hand, presented greater number of leaves and mass of roots (Haury *et al.*, 2014; Billet *et al.*, 2018).

Aquatic and terrestrial environments impose special constraints on morphotypes of *L. grandiflora.* In this way, aquatic condition is carrier medium, which favours plant flotation and alters the access to oxygen and light that can lead to hypoxic stress. The shift from an underwater environment (aquatic environment) to an air environment with higher light and oxygen levels (terrestrial environment) may lead to drought stress (Tamang & Fukao, 2015). Specific physiological and morphological responses have been identified in plant according to environment. Under submergence, both decrease of oxygen availability and loss of oxygen production by photosynthesis leads plants to shift metabolism from aerobic respiration to fermentation (Voesenek & Bailey-Serres, 2015). So, anaerobic metabolism involves a modified carbohydrate metabolism coupled with glycolysis and fermentation. Metabolism pathways implicating sugars, amino acids or polyamines and phytohormones are often related as involved in drought and flooding stress responses (Hu, Qi, Zhang, Chen, & Nakazono, 2016; Loreti, van Veen, & Perata, 2016; Loreti, Valeri, Novi, & Perata, 2018). Furthermore, plant adaptation to anaerobic condition involves morphological changes to transportation of oxygen from aerial parts to roots as production of aerenchyma and pneumatophores as it has observed in *Ludwigia sp* (Bedoya & Madriñán, 2015). Plants growing in aquatic habitat showed adaptation such as production of aerenchym in roots and adventitious roots which is allow to maintain oxygen income (Ayi *et al.*, 2016; Fukao, Barrera-Figueroa, Juntawong, & Peña-Castro, 2019). Previously, Billet *et al.* (2018) have identified specific metabolite patterns in shoots in *L. grandiflora* growing in aquatic condition with the involvement of two following pathways, the valine, leucine, and isoleucine metabolism pathway and the valine, leucine, and isoleucine degradation pathway. In addition, in roots, it has showed that *L. grandiflora* mobilized in terrestrial condition the three following pathways: amino sugar and nucleotide sugar metabolism pathway, the starch and sucrose metabolism pathway and galactose, fructose, mannose metabolism pathway.

In this study, we worked on a sympatric population of two morphotypes from a marsh of Mazerolles (near Nantes, France) where aquatic morphotype appeared in 1995 and terrestrial morphotype five years later. The 5-year period between the arrival of the aquatic form and the transition to the terrestrial environment raises the question of the rapid adaptation of *L grandiflora* and the fate of the invasion (Billet *et al.*, 2018). To investigate whether the fast-transition to terrestrial habitat changes physiological responses of *L. grandiflora* and to explore how the phenotypic plastic is affected, we compared the behaviour of aquatic and terrestrial morphotypes in their original condition or in changing environment (aquatic versus terrestrial) in controlled conditions. We characterized morphological, phytohormone and metabolomic responses in function of condition at 14 and 28 days after beginning of experiment. We evaluated the phenotypic plasticity using the "Relative distance plasticity index" RDPI recommended by Valladares *et al.* (2006) and followed their evolution during the time of experiment. We tested the following two hypotheses: (1) Water primrose can adjust its morphology and physiology according to habitats (Billet *et al.*, 2018) through expression of phenotypic plasticity; (2) As terrestrial morphotype undergoes consecutive submergence and desubmergence conditions, its phenotypic plasticity could be greater that those of aquatic morphotype (Murren *et al.*, 2015).

Materials and methods

Plant material and experimental design

Aquatic (Am) and terrestrial (Tm) morphotypes of *L. grandiflora* were collected in autumn 2014 from swamps of Mazerolles (nearby Nantes, France, N47 23.260 W1 28.206). Plants were grown in a greenhouse at 22 °C, 16h/8h light/darkness cycle.

Starting from apices, a 10cm-portion of the stem was collected, without roots, buds and lateral stems. Then, a preconditioning period of two weeks was applied to promote the development of roots of the plants into different aquariums, as described in Billet *et al.*, 2018. For each aquatic and terrestrial morphotype, ten for morphological, and six for metabolomics analyses, plants were randomly placed into containers (Length x Width x Height: 8cm x 8cm x 15cm) in aquatic and terrestrial conditions, under controlled conditions (22 °C, 16h day/8h night). Measurement of morphological traits and

metabolic phenotypes of the plants were subsequently conducted two (t14) and four (t28) weeks after the transfer into containers. Two and three biological replicates were carried out for the morphological and metabolomic analyses, respectively. For metabolomics analyses, samples were pooled and immediately snap-frozen into liquid nitrogen, then lyophilized over 48 hr using a Cosmos 20K (Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc, France) and stored at -80 °C.

Morphological analyses

Ten plants per morphotype, treatment and condition were analysed for investigating the effects of our experimental conditions on the growth and fitness traits. Length of the plant (LP, in centimeter), and leaf number (nbL), which characterized plant morphology. The ability to produce propagules from buds or nodes with roots are considered as fitness of the plant with Number of nodes with roots (nbNR), and number of nodes with buds (nbB), as in Billet *et al.* (2018). *L. grandiflora* has the ability to form new plants from small (>1 cm) plant fragments (Hussner, 2009). Biomass of plants in grams (g) was determined by measuring the fresh mass of shoots (FMS) and roots (FMR). After oven drying the samples at 105°C for 48 hr, we obtained their respective dry masses (DMS and DMR). To determine water content, the ratios of fresh/dry mass of shoots (Sr =FMS/DMS) or roots (Rr=DMS/DMR) and water content (WC = ((FMR+FMS)-(DMR+DMS))/(DMR+DMS) were calculated.

Metabolomic fingerprint

Six plants per morphotype and per experimental condition were sampled at 14 and 28 days, as described in the section “Plant material and experimental design”. We used a gas-chromatograph coupled to a mass-spectrometer (GC-MS) to scan for the 59 metabolites of our database, encompassing amino acids, organic acids, polyamines, polyols, and sugars. The method described in Serra *et al.* (2013) was used and adapted as in Billet *et al.* (2018). The derivatization of the samples was conducted with a CTC CombiPAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland), and with the GC-MS settings that were described by Serra *et al.* (2013). For each sample, an aliquot of 10 mg of lyophilized powder was homogenized into 600 µL of a solution of ice-cold methanol/chloroform (2:1, v/v). Then, a volume of

400 µL of ultra-pure water was added. Samples were homogenized and centrifuged for 10 min at 4,000 g (4 °C). One hundred and twenty or 80 µL of the upper phase containing metabolites were transferred to new glass vials for roots and shoots, respectively. Chromatograms were analyzed with XCalibur 2.0.7. Concentration of each metabolite was calculated using individual quadratic calibration curves.

Phytohormone quantification

Quantification of abscisic acid (ABA), salicylic acid (SA), jasmonyl Leucine acid (JLA) and auxins (IAA) were carried out in shoots at day 28 of the experiment. For each sample, 1 mg of dry powder was extracted with 0.8 mL of acetone/water/acetic acid (80/19/1 v/v/v). Phytohormones stable labelled isotopes used as internal standards were prepared as described in (Roux *et al.*, 2014).

Each dry extract was dissolved into 100 µL of acetonitrile/water (50/50 v/v), filtered, and analyzed using a Waters Acquity ultra performance liquid chromatograph coupled to a Waters Xevo Triple quadrupole mass spectrometer TQS (UPLC-ESI-MS/MS). The compounds were separated on a reverse-phase column (Uptisphere C18 UP3HDO, 100*2.1 mm*3µm particle size; Interchim, France) using a flow rate of 0.4 mL min-1 and a binary gradient: (A) acetic acid 0.1 % in water (v/v) and (B) acetonitrile with 0.1 % acetic acid, the column temperature was 40 °C, for abscisic acid, salicylic acid, jasmonic acid, and indole-3-acetic acid we used the following binary gradient (time, % A): (0 min., 98 %), (3 min., 70 %), (7.5 min., 50 %), (8.5 min., 5 %), (9.6 min., 0%), (13.2 min., 98 %), (15.7 min., 98 %). Mass spectrometry was conducted in electrospray and Multiple Reaction Monitoring scanning mode (MRM mode), in positive ion mode for the indole-3-acetic acid and in negative ion mode for the other hormones. Relevant instrumental parameters were set as follows: capillary 1.5 kV (negative mode), source block and desolvation gas temperatures 130 °C and 500 °C, respectively. Nitrogen was used to assist the cone and desolvation (150 L h-1 and 800 L h-1, respectively), argon was used as the collision gas at a flow of 0.18 mL min-1.

Phenotypic plasticity

The phenotypic plasticity of the plants exposed to the different experimental conditions was calculated by using morphological variables and metabolite amounts and computing a “Relative distance plasticity

index" RDPI, as suggested by Valladares *et al.*, 2006. RDPI = ∑(dij→i'j'/(xi'j'+xij))/n), where n is the total number of distances, and j and j' are two individuals belonging to different treatments (i and I'). This index ranges from 0 (no plasticity) to 1 (maximal plasticity). The different RDPIs were calculated for morphological and metabolomic data by comparison of aquatic and terrestrial morphotype values in aquatic *versus* terrestrial conditions. The evolution of phenotypic plasticity between t14 and t28 was evaluated for each data and morphotype during time-course.

Statistical analysis

The effect of conditioning of both morphotypes was assessed on morphological and physiological data by running principal component analyses (PCAs) and analyses of variance (ANOVAs). ANOVA were carried out with morphotype, condition, biological replicate and morphotype x condition interaction as factors. The residuals normality and the homoscedasticity were verified by Shapiro–Wilk's and Bartlett's tests, and normality was achieved in some cases by transforming morphological traits and the metabolite concentrations (Log10). The Tukey test was used to compare data for different times (t14 vs t28). Statistical analyses were performed with the software R 3.5.2 with FactoMineR (Lê, Josse, & Husson, 2008) and interface Rcmdr packages (Fox, 2005). For all ANOVA, no biological replicate effect was observed

For metabolites, which varied significantly among condition and morphotype, we performed pathway enrichment analyses in Metaboanalyst 3.0 (Xia, Sinelnikov, Han, & Wishart, 2015). Fisher's exact test algorithm was performed for these pathway analyses, with *Arabidopsis thaliana* as the reference model. In this procedure, the number of hits between the metabolites in our dataset and all metabolites of a given pathway were calculated. Metabolite data presented in the figures are untransformed. We compared: aquatic and terrestrial conditions whatever morphotype (Am-a and Tm-a *vs* Am-t and Tm-t), aquatic and terrestrial morphotypes whatever condition (Am-a and Am-t *vs* Tm-a and Tm-t), for each morphotype between condition (for example, Tm-a vs Tm-t) and between morphotype in same condition (for example, Tm-a vs Am-a)

We used "ameztegui/Plasticity" packages to calculate RDPI and statistically analyses by t-test comparison between morphotypes (Am vs Tm) and times (t14 vs t28).

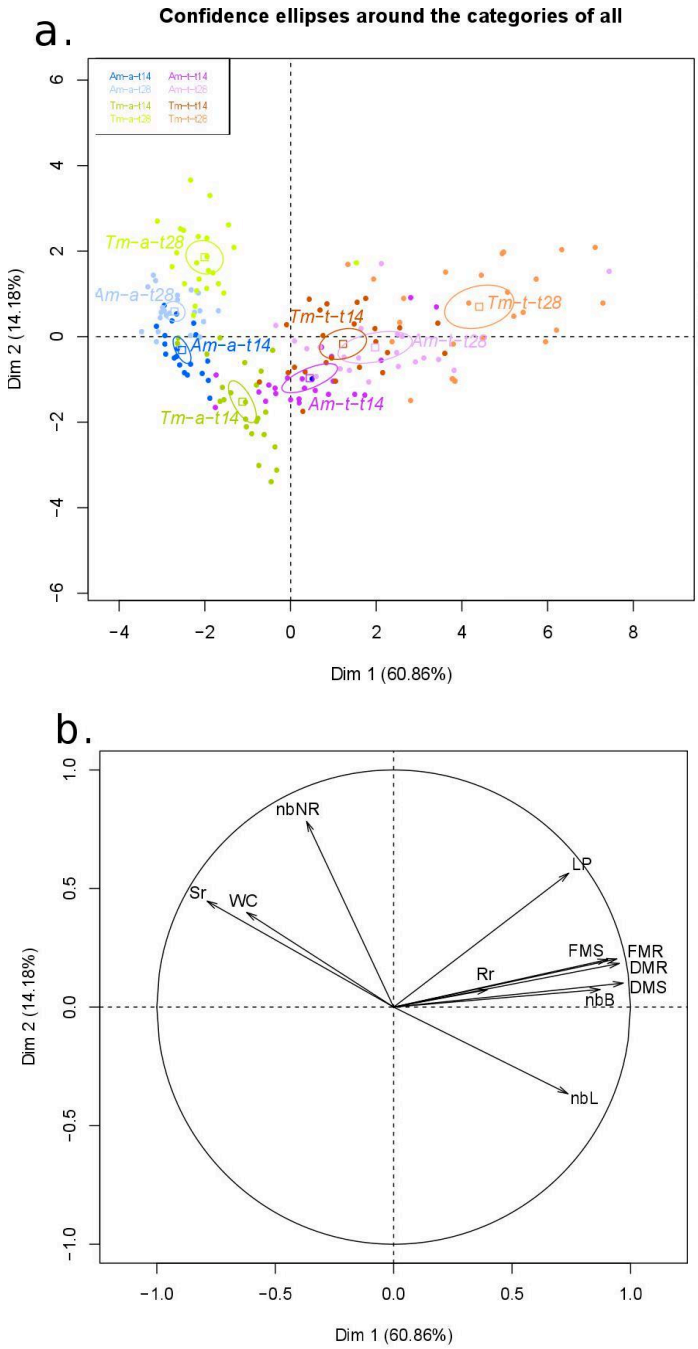


Fig. 1. Principal component analysis (PCA) representation allowing the characterization of the morphological variability at 14 and 28 days of experiment (-t14 and –t28) of aquatic and terrestrial morphotypes in aquatic (Am-a, Tm-a) and terrestrial (Am-t, Tm-t) conditions. (a) Individuals factor map. Each data point represented one biological repeat. (b) Variables factor map. Morphological variables represented are number of leaves (nbL), number of nodes with roots (nbNR), number of buds (nbB), fresh and dry mass of roots and shoots (FMS, FMR, DMS and DMR), shoots and roots ratio (FMS/DMS = Sr; FMR/DMR = Rr), water content (WC).

Results

Terrestrial morphotype shows greater morphological trait values in both aquatic and terrestrial conditions

Principal component analyses (PCAs) were carried out and combined the measured morphological variables at days 14 and 28 (Fig 1ab). The first axis (F1) explained 60.86% of the total variance, and separated plants grown in aquatic and terrestrial conditions. Furthermore, F1 discriminated temporality for terrestrial condition. Moreover, we observed that in terrestrial condition, morphological values of Am plants at day 28 were close to those observed at day 14 for Tm-t (Fig 1a). The second axis explained 14.18% of the total variance and discriminated the temporality in aquatic condition. Data integration through PCA suggested that the greatest shift between t14 and t28 was observed for terrestrial morphotype in both conditions (Fig 1a). Stronger biomass variables (FMS, FMR, DMS, DMR), number of leaves (nbL), number of buds (nbB) and root ratio (Rr) characterized the plants growing in terrestrial condition, while greater water content (WC), shoot ratio (Sr) and number of nodes with roots (nbNR) characterized plants growing in aquatic condition (Fig 1b).

Analyses of variance were carried out (morphotype, condition, biological replicate, morphotype x condition interaction; Table S1 and S2; Fig S1). We observed significant effects for all factors, excepted for biological replicate, for most measured variables and at both collection times ($p<0.05$; Tables S1 and S2). The experimental conditions affected all variables ($p<0.05$, Tables S1 and S2).

Altogether, these data showed that terrestrial morphotype presented higher values regardless of conditions than aquatic one and his for most of the morphological variables (but not water content variables) and stably over time of experiment.

Aquatic and terrestrial conditions shaped the metabolic responses of *L. grandiflora*, and morphotype responses converge over the course of the experiment

Principal component analyses (PCA) using only metabolites showing a significant effect for morphotype or/and condition were carried out (Fig 2ab). The F1 axis explained 32.56% of the total variance, for a total of 58.68% and discriminated slightly both morphotypes in aquatic condition and Am-t-t14 to the

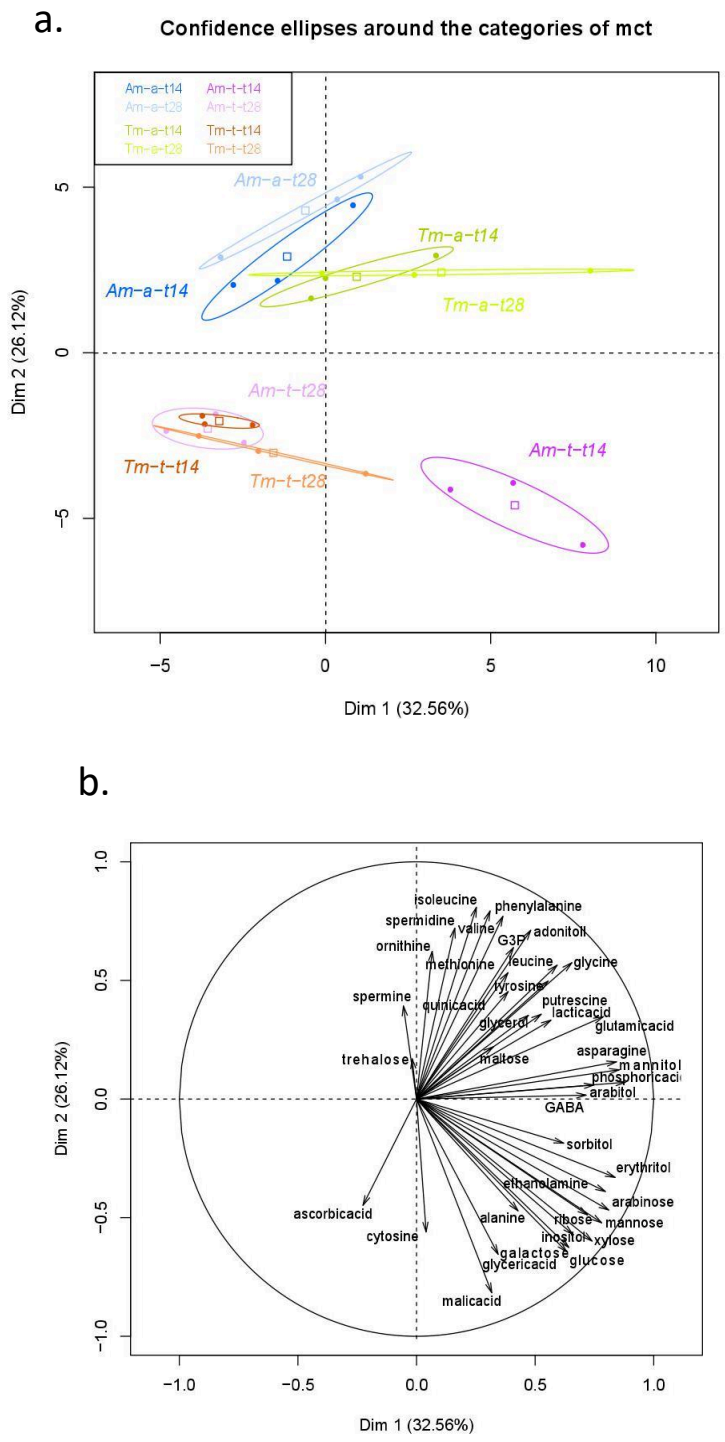


Fig. 2. Principal component analysis (PCAs) representation allowing the characterization of the metabolites variability at 14 (**a**) and 28 (**b**) days of experiment (-t14 and –t28) of aquatic and terrestrial morphotypes in aquatic (Am-a, Tm-a) and terrestrial (Am-t, Tm-t) conditions

other morphotypes in terrestrial condition (Fig 2a). The F2 axis, which represented 26.12% of variability, separated aquatic and terrestrial conditions. The analysis of the correlation circle revealed that Am-t ant Tm-a mobilized particularly sugars and polyols, and acids and organic acids, respectively (Fig 2b). Analyses of variance were carried out by comparison of morphotype (Am or Tm), condition (aquatic or terrestrial), biological replicates and morphotype x condition interaction for 59 quantified metabolites, in shoots. Significant morphotype and/or condition effects were detected for 35 metabolites, revealing metabolite variations at both days 14 and 28 of the experiment. Most of differences between morphotype and condition was found at 14 days. No significant biological replicate effect and morphotype x condition interaction at t28 were observed (Tables S3 and S4; Fig S2). In aquatic condition both morphotypes (Am-a and Tm-a) appeared to have similar metabolomic responses with significantly more amino acid (alanine, leucine, lysine isoleucine,, methionine, phenylalanine, ornithine, tyrosine, valine) and polyamines (putrescine, spermidine and spermine) at t14 or/and t28 than in terrestrial condition. In terrestrial condition, *Ludwigia grandiflora* mobilized a greater sugar quantity (arabinose, galactose glucose, mannose, ribose, xylose), polyols (erythritol and inositol) at t14 and organic acids (ascorbic acid, glyceric acid, malic acid and gluconolactone) at t28 than in aquatic condition. The greater shift was observed for both morphotypes in terrestrial condition, which showed a closer metabolomic pattern between Am-t and Tm-t at t28 than at t14 (Fig 2).

We used Metaboanalyst 3.0 to link significant metabolites to metabolic pathways at 14 and 28 days by comparison of metabolites amounts between aquatic and terrestrial conditions. All metabolic pathways identified by Metaboanalyst were involved in *L. grandiflora* metabolism in aquatic condition. At both times, we found four significant metabolic pathways related to condition (a vs t comparison) (holm $p<0.05$). All pathways involved amino acids. (Tables S3, S4 and S5, Fig S2). In addition, at 28 days, metaboanalyst identified three specific pathways involving all phenylalanine metabolite (holm $p<0.05$) (Table S5, Fig S2). These different metabolomic pathways characterized the metabolism of *L. grandiflora* in aquatic condition.

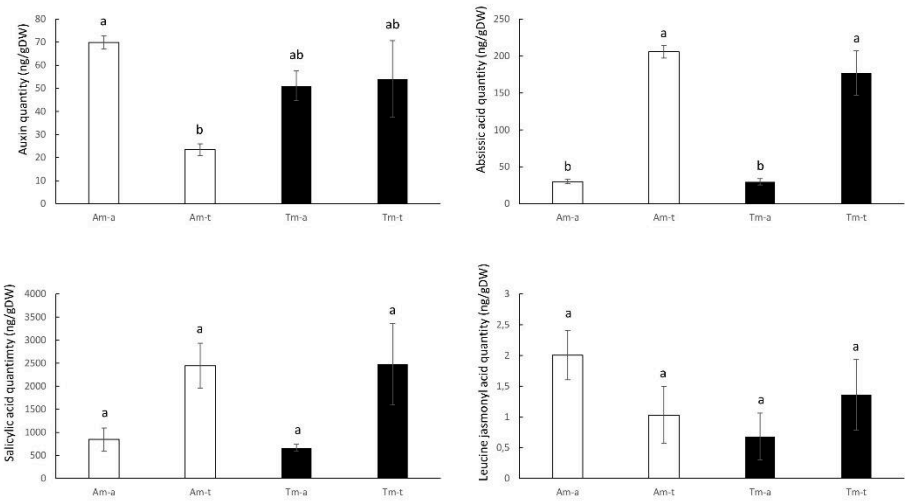


Fig. 3. Phytohormones quantities in shoots of aquatic and terrestrial morphotypes (white and black) of *Ludwigia grandiflora* grown in terrestrial or aquatic conditions after 28 days of experiment. Phytohormones quantitifed are abscissic acid, auxin, leucine jasmonyl acid and salicylic acid and are expressed in ng/mg of dry mass. Bars represent the mean value of three biological replicates with their standard errors. Letters correspond to means comparison by *Tukey-test* after ANOVA at one time between morphotype*condition. Same letters means no significant difference.

Tm-a and Am-t showed specific metabolomic responses (Fig 2; Fig S2). Thus, comparison *via* metaboanalyst of significant metabolites produced by Tm-a at those metabolized by Tm-t or Am-a (Tm-a vs Tm-t and Tm-a vs Am-a comparison) showed the involvement of the galactose metabolism pathway. This pathway was related to Tm-a (holm $p< 0.05$) at 14 days corresponding to amounts of glucose, glycerol, mannose, sorbitol and inositol significantly greater in Tm-a than in Tm-t and Am-a (Fig 3; Fig S2). No metabolomic pathways were identified via metaboanalyst at t28. Am-t mobilized a specific metabolic pathway at 14 days. The comparison of metabolites produced by Am-t and Tm-t by metaboanalyst revealed at 14 days the involvement of glycerophospholipid metabolism pathway with ethanolamine amounts in favor of Am-t (holm $p<0.05$).

Analyses of variances were carried out for abscissic acid, salicylic acid, leucine jasmonic acid concentrations (morphotype, condition, biological replicate and morphotype x condition interaction). Phytohormone quantification showed significant difference between condition ($p<0.05$) for abscissic and salicylic acids, in higher amounts in terrestrial condition (Fig 3; Table S4). We also observed an interaction between morphotype x condition for auxin quantity with significant difference between aquatic morphotype in both conditions, in favour of aquatic condition (Am-a vs Am-t) (Fig 3; Table S4). No significant differences were observed for leucine jasmonic acid and for biological replicate.

Aquatic morphotype display higher phenotypic plasticity than terrestrial morphotype

The phenotypic plasticity for all morphological variable and metabolite studied have been calculated by using “Relative distance plasticity index” RDPI and statistically analyses by *t*-test. A visualization of RDPI is possible in Fig S2 and S3 by comparing the difference of trait value between two points for one morphotype and same temporality.

We observed significant differences of RDPI for 9 of the 11 morphological variables at 14 and 28 days, respectively ($p<0.05$; Table 1). RDPI values varied between 0 and 1, with morphological variables highly plastic (RDPI> 0,9) for number of buds, moderately plastic (0.4>RDPI>0.8) for all biomass variables and number of nodes with roots and lower plastic (RDPI<0.4) for two morphological variables (LP, NbL) and water content variables (Sr and WC) (Table 1). No significant RDPI difference

Table 1. RDPI results and comparison of traits variables of both morphotypes (Am and Tm) at 14-28 days and also the dynamic of rdpi during time. Significance codes: .001 “***”; .01 “**”; .05 “*”; nonsignificant (NS)“=” t-test.

		RDPI analyses (t-test)											
		rdpi t14				rdpi t28				rdpi dynamics Am		rdpi dynamics tm	
Type of variable	Morphologival trait (code)	Am	Tm	inequality	p	Am	Tm	inequality	p	inequality	p	inequality	p
morphological variables	LP	0,16	0,17	=	NS	0,20	0,15	Am>Tm	***	t28>t14	***	t14>t28	***
	nbL	0,25	0,12	Am>Tm	***	0,37	0,42	Tm>Am	***	t28>t14	***	t28>t14	***
	nbNR	0,41	0,62	Tm>Am	***	0,38	0,40	=	NS	t14>t28	**	t14>t28	***
	nbNB	0,99	0,96	Am>Tm	***	0,91	0,80	Am>Tm	***	t14>t28	***	t14>t28	***
biomass	FWS	0,52	0,39	Am>Tm	***	0,66	0,56	Am>Tm	***	t28>t14	***	t28>t14	***
	FWR	0,80	0,72	Am>Tm	***	0,83	0,75	Am>Tm	***	t28>t14	***	t28>t14	***
	DWS	0,61	0,42	Am>Tm	***	0,77	0,74	Am>Tm	***	t28>t14	***	t28>t14	***
	DWR	0,72	0,61	Am>Tm	***	0,75	0,61	Am>Tm	***	=	NS	=	NS
water content	Sr	0,14	0,09	Am>Tm	***	0,23	0,33	Tm>Am	***	t28>t14	***	t28>t14	***
	Rr	0,20	0,21	=	NS	0,28	0,26	=	NS	t28>t14	***	t28>t14	***
	WC	0,12	0,09	Am>Tm	***	0,16	0,17	Tm>Am	***	t28>t14	***	t28>t14	***

was noted between both morphotypes for root ratio at both times. Thus, all biomass variables and number of buds showed a greater phenotypic plasticity for aquatic morphotype at both times (Table 1, Fig 2).

Comparison of RDPI at 14 and 28 days was carried out to analyse the phenotypic plasticity evolution over time (*t*-test). We noted for both morphotypes a significant increase of RDPI between 14 and 28 days for morphological variables (LP, nbL), all biomass variables, excepted for DWR and for all water content variables ($p<0.05$; Table 1).

Similar approach was used for phytohormone and metabolite RDPI. We found only a significant difference of RDPI for auxin in favor of aquatic morphotype with a RDPI value of 0.5 versus 0.20 for terrestrial morphotype ($p<0.01$). We observed significant differences of RDPI for 25 and 10 of the 59 metabolites analyzed at 14 and 28 days, respectively ($p<0.05$; Table 2). RDPI values varied between 0 and 1, with highly plastic for sugars particularly for Am-t at 14 days (RDPI> 0,9), moderately plastic for a majority of metabolites at 14 days (0.4>RDPI>0.8) and lower plastic for some metabolites such as spermidine or fumaric acid but particularly for Tm-t at 14 days (RDPI<0.4).

The number of metabolites with significant greater phenotypic plasticity was higher for aquatic morphotype than for terrestrial morphotype at both times. Thus, at 14 days, majority of sugars and organic acids showed a stronger RDPI for aquatic morphotype than terrestrial one ($p<0.05$; Table 2; Fig 3). While, a greater plasticity for terrestrial morphotype was observed for only 8 metabolites (3 amino acids; 2 organic acids; and others such as adonitol, G3P and putrescine) ($p<0.05$; Table 2; Fig S3).

Comparing of RDPI between 14 and 28 days revealed for a majority of sugars, significant decreasing and increasing RDPI in aquatic morphotype and in terrestrial morphotype, respectively (t14>t28) ($p<0.05$; Table 2; Fig S3). We also found a RDPI increase for half amino acids (t28>t14) in both morphotypes in particular for glycine, lysine and phenylalanine ($p<0.05$; Table 2; Fig S3).

All these data showed that Am presented a higher phenotypic plasticity for both traits and metabolites than Tm. However, phenotypic plasticity of both morphotypes increased similarly during time for both traits and metabolites, excepted for some sugars and organic acids in favor of Tm.

Table 2. RDPI results and comparison of metabolites amounts of both morphotypes (Am and Tm) at 14-28 days and also the dynamic of rdpi during time. Significance codes: .001 "***"; .01 "**"; .05 "*"; nonsignificant (NS) "=" t-test. Phytohormones quantities didn't quantified at 14 days (shaded area)

		RDPI analyses (t-test)											
	Temps	rdpi t14				rdpi t28				rdpi dynamics Am		rdpi dynamics tm	
	Metabolites	Am	Tm	inequality	p	Am	Tm	inequality	p	inequality	p	inequality	p
Amino Acids	glycine	0,24	0,83	Tm>Am	***	0,84	0,91	=	NS	t28>t14	***	t28>t14	**
	isolcucine	0,74	0,61	=	NS	0,88	0,77	Am>Tm	**	=	NS	=	NS
	leucine	0,34	0,72	Tm>Am	***	0,73	0,54	Am>Tm	*	t28>t14	***	t14>t28	*
	lysine	0,34	0,54	=	NS	0,53	0,83	Tm>Am	***	=	NS	t28>t14	*
	methionine	0,14	0,16	=	NS	0,33	0,36	=	NS	t28>t14	*	t28>t14	**
	ornithine	0,40	0,08	Am>Tm	**	0,42	0,25	=	NS	=	NS	t28>t14	*
	phenylalanine	0,62	0,50	=	NS	0,84	0,74	Am>Tm	*	t28>t14	**	t28>t14	*
	tyramine	0,39	0,20	=	NS	0,09	0,22	Tm>Am	*	t14>t28	***	=	NS
	valine	0,17	0,72	Tm>Am	***	0,76	0,68	=	NS	t28>t14	***	=	NS
Polyols	adonitol	0,29	0,62	Tm>Am	***	0,48	0,36	=	NS	t28>t14	*	t14>t28	**
	erythritol	0,60	0,32	Am>Tm	***	0,28	0,22	=	NS	t14>t28	***	=	NS
	galactitol	0,45	0,16	Am>Tm	**	0,30	0,29	=	NS	=	NS	=	NS
	G3P	0,25	0,38	Tm>Am	***	0,52	0,63	=	NS	t28>t14	**	t28>t14	***
	inositol	0,54	0,14	Am>Tm	***	0,34	0,32	=	NS	=	NS	t28>t14	*
	sorbitol	0,20	0,29	=	NS	0,11	0,19	=	NS	=	NS	t14>t28	*
	xylitol	0,29	0,20	=	NS	0,13	0,18	=	NS	t14>t28	*	=	NS
Sugar	arabinose	0,97	0,34	Am>Tm	***	0,53	0,62	=	NS	t14>t28	***	=	NS
	galactose	0,99	0,10	Am>Tm	***	0,67	0,05	Am>Tm	***	t14>t28	***	=	NS
	glucose	0,72	0,06	Am>Tm	***	0,61	0,20	Am>Tm	***	=	NS	t28>t14	*
	mannose	0,95	0,08	Am>Tm	***	0,45	0,26	=	NS	t14>t28	***	t28>t14	*
	ribose	0,96	0,26	Am>Tm	***	0,29	0,55	=	NS	t14>t28	***	=	NS
	trehalose	0,57	0,44	=	NS	0,37	0,32	=	NS	=	NS	t28>t14	*
	xylose	0,90	0,40	Am>Tm	***	0,65	0,47	=	NS	t14>t28	**	=	NS
Organic acid	ascorbic acid	0,56	0,26	Am>Tm	**	0,73	0,67	=	NS	t28>t14	*	t28>t14	***
	aspartic acid	0,57	0,27	Am>Tm	**	0,22	0,28	=	NS	t14>t28	***	=	NS
	citric acid	0,30	0,13	=	NS	0,32	0,40	=	NS	=	NS	t28>t14	***
	gluconolactone	0,46	0,31	=	NS	0,53	0,67	=	NS	=	NS	t28>t14	***
	lactic acid	0,23	0,59	Tm>Am	**	0,28	0,63	Tm>Am	**	=	NS	=	NS
	malic acid	0,51	0,28	Am>Tm	***	0,42	0,35	=	NS	=	NS	=	NS
	quinic acid	0,17	0,76	Tm>Am	***	0,28	0,32	=	NS	=	NS	t14>t28	***
	succinic acid	0,46	0,18	Am>Tm	**	0,40	0,46	=	NS	=	NS	t28>t14	**
Polyamine	putrescine	0,42	0,65	Tm>Am	*	0,64	0,81	=	NS	=	NS	=	NS
	spermidine	0,05	0,04	Am>Tm	**	0,05	0,03	=	NS	=	NS	t14>t28	*
Others	cadaverine					0,98	0,45	Am>Tm	***	=	NS	=	NS
	dopamine	0,53	0,18	Am>Tm	**	0,30	0,26	=	NS	t14>t28	*	=	NS
	ethanolamine	0,72	0,19	Am>Tm	***	0,31	0,55	=	NS	t14>t28	***	t28>t14	**
	octopamine	0,06	0,03	=	NS	0,41	0,06	Am>Tm	**	t28>t14	**	=	NS
Phytohormones	Absissic acid					0.75	0.70	=	NS				
	Auxin					0.50	0.20	Am>Tm	***				
	Salicylic acid					0.47	0.50	=	NS				
	Leucine jasmonyl acid					0.40	0.44	=	NS				

Discussion

Ludwigia grandiflora adapts its morphology and metabolism according to habitat

Ludwigia grandiflora is native to South America but invasive in Europe (Hussner *et al.*, 2016). It has been reported that *L. grandiflora* could growing in various habitats as rivers, channels and ditches, natural lakes and ponds, oxbows, wetlands, artificial lakes, ponds or gravel pits and flooded meadows (Lambert *et al.*, 2010). In the present study, we focused on a sympatric population growing in aquatic habitat and in wet meadows (Haury *et al.*, 2014). Here, we have completed the characterization of both morphotypes on an experience time of 14 and 28 days unlike Billet *et al.* (2018), which worked on 7 days. Morphological and metabolomic differences of *L. grandiflora* were found between aquatic and terrestrial conditions at both times. According to Billet *et al.* (2018) terrestrial morphotype showed greater values for all morphological traits at both times and whatever conditions, excepted for water content variables. Independently of morphotypes, *L. grandiflora* in terrestrial condition presented higher trait values than in aquatic condition.

There are also numerous studies on wetlands, i.e. environment which undergoes heterogeneity in water levels (Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2015). This dichotomy between aquatic and terrestrial habitats is related in the literature through the interest in hypoxia generated by submersion or drought by emersion (De Wilde, Sebei, Puijalon, & Bornette, 2014; Robe & Griffiths, 2000; Wu *et al.*, 2015).

According to Sasidharan *et al.* (2018), flooding refers to root inundation (waterlogging) or shoot submergence and can be reduce carbon and oxygen income, but also light availability for plant. In response to flooding, plants showed some morphological and metabolite changes (Jackson & Colmer, 2005; Loreti *et al.*, 2016). Indeed, for terrestrial plant or plant tolerant to flooding, common responses to submergence are shoot elongation, development of aquatic leaves and reduction in biomass (Mommer & Visser, 2005; Mommer, Pons, & Visser, 2006;). In our experiment, we also observed a lower biomass in aquatic condition than in terrestrial condition. . Most of flooding studies have been carried out on *Arabidopsis thaliana* and crops such as Soybean and only few on wetland plants (Wang *et al.*, 2017). *L. grandiflora,* as an amphibious plant having abilities to produce pneumatophores and make different

types of leaves with heterophylly, was tolerant to submergence (Kuwabara, Ikegami, Koshiba, & Nagata, 2003).

The ability of *Ludwigia grandiflora* to adapt to wide range of habitats could be depending to its metabolomic adjustment possibilities. In aquatic condition, *L grandiflora* mobilized metabolomic pathway involving amino acids as valine, leucine, isoleucine, biosynthesis and degradation pathways and aminoacyl t-RNA pathways according to Billet *et al.* (2018). Those amino acids characterized aquatic condition and are involved in low concentration of $C0_2$ and tolerance to hypoxia (Das & Uchimiya, 2002; Andreas Hussner, Mettler-Altmann, Weber, & Sand-Jensen, 2016; Less & Galili, 2008; Limami, 2014; Pedersen & Colmer, 2014). Reduction of gas availability lead inhibition of respiration and photosynthesis causing metabolite changes to ensure growth and survival by fermentation and glycolic pathways (Fukao & Bailey-Serres, 2004). At 28 days, in aquatic condition, we found that *L. grandiflora* metabolized higher phenylalanine than in terrestrial condition as noted in Billet *et al.* (2018) and three metabolomic pathways involving phenylalanine were identified. Phenylalanine, tryptophane and tyrosine are involved in protein synthesis and precursors for various plant hormones such as auxin (Tzin & Galili, 2010). But we found a greater amount of auxin in shoot of aquatic morphotype in aquatic condition than in terrestrial one. Furthermore, it is reported that phytohormones such as auxin or ethylene play an important role in flooding (Sasidharan *et al.*, 2018; Fukao *et al.*, 2019). Otherwise, *L. grandiflora* showed polyamine accumulation in aquatic condition. Polyamines (spermine, spermidine and putrescine) production, which are stress witnesses, were important in many processes such as stress responses, morphogenesis and growth (Kusano, Berberich, Tateda, & Takahashi, 2008; Vera-Sirera *et al.*, 2010).

In terrestrial condition, our results confirmed that *L. grandiflora* metabolized a wide range of sugars and organic acids according to Billet *et al.*, (2018). Sugars are involved in many processes of plant biology such as photosynthesis, flowering, tolerance to abiotic stresses (Sami, Yusuf, Faizan, Faraz, & Hayat, 2016). In terrestrial condition, plants must produce holding structures as aerial plant support and also, must endure drought stress through physiological modifications such as production of phytohormones like abscissic acid (ABA). In our study, phytohormone quantification confirmed the distinction between conditions with higher levels of abscissic acid and salicylic acid in terrestrial

condition. These phytohormones are both involved in drought stress and developmental processes, such as stomatal closure or heterophylly (Mommer & Visser, 2005; Prodhan, Munemasa, Nahar, Nakamura, & Murata, 2018). Thus, in *Ludwigia arcuate*, the formation of terrestrial leaves on submerged shoots was induced by ABA (Kuwabara *et al.*, 2003). Furthermore, Sami *et al.* (2016) showed the crosstalk between phytohormones as ABA and sugar metabolites in drought stress.

Phenotypic plasticity is higher for aquatic morphotype than terrestrial morphotype and change during experimental time

The ability of *Ludwigia grandiflora* to colonize a wide variety of habitats and to express heterophylly in response to submerged condition suggested the expression of phenotypic plasticity. Water primroses are amphibious plants capable of heterophylly i.e. to produce organs (especially leaves) of different types depending on whether the plant is in or out of the water to make flowering and reproduce that reflect adaptive phenotypic plasticity (Wells & Pigliucci, 2000; Kuwabara & Nagata, 2006; Nakayama, Sinha, & Kimura, 2017). Phenotypic plasticity is recognized as a characteristic of invasion success (Fleming & Dibble, 2015) and well-studied in macrophytes (De Wilde *et al.*, 2014). Numerous studies tried to show that phenotypic plasticity is related to invasion success. Recently, in both macrophyte invasive species *Elodea nuttallii* and *Elodea canadensis*, Szabó *et al.* (2019) showed that phenotypic plasticity is greater for *Elodea nuttallii* than *Elodea canadensis* that link to invasion success.

Actually, no study of phenotypic plasticity was carried out on *L grandiflora* and here we evaluated the expression of phenotypic plasticity between aquatic and terrestrial conditions using the RDPI of Valladares *et al.* (2006). This index normalizes traits with a value between 0 and 1. Zero being no plasticity and one a maximum phenotypic plasticity (Valladares *et al.*, 2006). Here, as we studied only two environmental conditions that limited the use of slope norm reaction, we calculated only RDPI.

Thus, several recent studies used RDPI to assess plant phenotypic plasticity in different ecological contexts, for example in morphophysiological traits of seven epiphytic Tillandsia species related to precipitation gradient and in metabolomic responses to different light levels in *Silene littorea* (Caryophyllaceae) (Del Valle, Buide, Whittall, & Narbona, 2018) or to compare phenotypic plasticity

of functional traits between six allopolyploid and five diploid wild strawberry (Fragaria) in three climatically different common gardens (Wei, Cronn, Liston, & Ashman, 2019).

Physiological responses of *L. grandiflora* to changing environment demonstrated the existence two distinct morphotypes which expressed different phenotypic plasticity. This reinforces our first hypothesis. However, we have shown that the aquatic morphotype of *L. grandiflora* showed a greater phenotypic plasticity for a majority of morphological variables, metabolites amounts and auxin quantity than terrestrial morphotype. This result invalidated our second hypothesis (2), which that plasticity for an organism developing under heterogeneous conditions is greater than those an organism homogenous environment, what is the case for the terrestrial morphotype, which undergoes a seasonality of the water level (Murren *et al.*, 2015). But according to Matzek (2012) it is trait values and not trait plasticity which explained the performance of invasive species in changing environment.

In this study, we postulated that phenotypic plasticity is a way to colonize rapidly terrestrial environment. However, according to Lande's hypothesis (2015), which suggested that phenotypic plasticity is temporally dynamic, we can imagine that phenotypic plasticity of *L grandiflora* has evolved. Thus at the beginning of terrestrial colonization between 1995-2000, terrestrial morphotype of *L. grandiflora* could present a strong plasticity then this phenotypic plasticity could be evolved and integrated which can explained the lower RDPI observed for terrestrial morpohotype (Lande, 2015). On the other hand, for aquatic morphotype, the higher phenotypic plasticity observed could reflect stress responses but also its ability to invade new habitat. In addition, the morphological traits of the aquatic morphotype are lower than terrestrial morphotype, which may reflect the cost of plasticity (Murren *et al.*, 2015). The idea of starting from aquatic morphotype to mimic the transition from one to other morphotype is important to demonstrate this hypothesis.

Terrestrial morphotype performs growth and metabolism in aquatic habitat.

Surprisingly, terrestrial morphotype exhibits greater morphological traits than aquatic morphotype in aquatic condition. So, terrestrial morphotype seems able to adjust the water content similarly as aquatic

morphotype while preserving the growth capacities (biomass traits) that in terrestrial condition. Furthermore, terrestrial morphotype showed a sugar metabolism closer to those observed in terrestrial condition and a same metabolism of amino acids that those observed for aquatic morphotype in aquatic condition. As mentioned upper, sugars are involved in stress tolerance, including drought but also hypoxic stress in flooding plant (Lee *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2017).Thus, Tm-a showed mixed physiological responses between Tm-t and Am-a. These results suggest that the transition of *L. grandiflora* from aquatic habitat to terrestrial habitat had permit to enhance its growth ability through metabolic adjustment adapted to both aquatic and terrestrial habitats. We can propose two possibilities to explain the terrestrial adaptation of *L. grandiflora*. Firstly, this may be the environmental conditions, which, as a constraint, lead the population to acclimatize to its environment through the expression of phenotypic plasticity then natural selection could act and lead to local adaptation (Kawecki & Ebert, 2004; Oduor *et al.*, 2016). If numerous studied of flooding responses were carried out, less is known about the process of recovery during the post flood period (Yeung *et al.*, 2018; Yeung, Bailey-Serres, & Sasidharan, 2019;). Hilker & Schmülling (2019); Maury *et al.* (2019); Mozgova, Mikulski, Pecinka, and Farrona (2019) suggested the possibility for the plant to keep in memory the constraint, named memory stress or priming. During its life cycle, terrestrial morphotype undergoes two predictable flooding phases: the submergence phase and the post-submergence recovery phase, that which can induce a memory stress and involve its abilities in both conditions. The second possibility is the pre-adaptation of *L. grandiflora* to terrestrial condition. Thus, Schlaepfer, Glättli, Fischer, and Kleunen (2010) and Elst *et al.* (2016) reffered to pre-adaptation of invasive species in their native range. The phylogenetic construction of *Ludwigia grandiflora*, according to morpho-anatomical character, suggests different back and forth between the terrestrial and aquatic environments that could be explain the pre-adaptation of water primrose to colonize terrestrial environment (Bedoya & Madriñán, 2015).

Conclusion

In this work, we demonstrated the existence of distinct physiology and phenotypic plasticity between aquatic and terrestrial morphotypes of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora* in response to changing environment. Terrestrial morphotype showed higher traits values but lower phenotypic plasticity than aquatic morphotype. The ability of the terrestrial morphotype to adapt quickly to a new environment but also to a possible aquatic return with increased capacities is worrisome for the management of the invasion

To perform phenotypic plasticity approach, as suggested by Lande, (2015), comparison of phenotypic plasticity on several *L. grandiflora* populations showing various introductory times would make it possible to assess the importance of invasion time. Phenotypic plasticity is notably under genetic and epigenetic controls within this framework both mechanisms are interesting to evaluate (Duncan, Gluckman, & Dearden, 2014). The water primrose characteristics, as polyploid and essentially clonally propagated species, beg the genetic diversity and the possibility of significant epigenetic effect in its ability to fast-adaptation. These leads may be interesting to explore in the context of biological invasions and in particular regarding *Ludwigia grandiflora* (Richards *et al.*, 2017; Marin *et al.*, 2019).

.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

J.G, S.M and D.B designed and conducted the research. D.R carried out metabolomic quantification. All authors performed the research. J.G, S.M and D.B analyzed the data, conceived the idea and initial structure of the manuscript; All authors have read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the the “INRA Département EFPA” (grant PI EFPA-2016 to D.B and S.M.), the RTP3E-CNRS (http://rtp-3e.wixsite.com/rt3e), the “Région Bretagne and INRA Département EFPA” (PhD grant to J.G.) and LabEx Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-10-LABX-0040-SPS).

REFERENCES

Acasuso-Rivero Cristina, Murren Courtney J., Schlichting Carl D., & Steiner Ulrich K. (2019). Adaptive phenotypic plasticity for life-history and less fitness-related traits. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *286*(1904), 20190653. doi: 10.1098/rspb.2019.0653

Ayi, Q., Zeng, B., Liu, J., Li, S., van Bodegom, P. M., & Cornelissen, J. H. C. (2016). Oxygen absorption by adventitious roots promotes the survival of completely submerged terrestrial plants. *Annals of Botany*, *118*(4), 675–683. doi: 10.1093/aob/mcw051

Bedoya, A. M., & Madriñán, S. (2015). Evolution of the aquatic habit in Ludwigia (Onagraceae): Morpho-anatomical adaptive strategies in the Neotropics. *Aquatic Botany*, *120*, 352–362. doi: 10.1016/j.aquabot.2014.10.005

Billet, K., Genitoni, J., Bozec, M., Renault, D., & Barloy, D. (2018). Aquatic and terrestrial morphotypes of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora* , show distinct morphological and metabolomic responses. *Ecology and Evolution*, *8*(5), 2568–2579. doi: 10.1002/ece3.3848

Bonamour Suzanne, Chevin Luis-Miguel, Charmantier Anne, & Teplitsky Céline. (2019). Phenotypic plasticity in response to climate change: the importance of cue variation. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *374*(1768), 20180178. doi: 10.1098/rstb.2018.0178

Chevin, L.-M., Lande, R., & Mace, G. M. (2010). Adaptation, Plasticity, and Extinction in a Changing Environment: Towards a Predictive Theory. *PLOS Biology*, *8*(4), e1000357. doi: 10.1371/journal.pbio.1000357

Chown, S. L., Slabber, S., McGeoch, M. A., Janion, C., & Leinaas, H. P. (2007). Phenotypic plasticity mediates climate change responses among invasive and indigenous arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *274*(1625), 2531–2537. doi: 10.1098/rspb.2007.0772

Daehler, C. C. (2003). Performance Comparisons of Co-Occurring Native and Alien Invasive Plants: Implications for Conservation and Restoration. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *34*(1), 183–211. doi: 10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132403

Dandelot, S., Verlaque, R., Dutartre, A., & Cazaubon, A. (2005). Ecological, Dynamic and Taxonomic Problems Due to Ludwigia (Onagraceae) in France. *Hydrobiologia*, *551*(1), 131–136. doi: 10.1007/s10750-005-4455-0

Davidson, A. M., Jennions, M., & Nicotra, A. B. (2011). Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis: Invasive species have higher phenotypic plasticity. *Ecology Letters*, *14*(4), 419–431. doi: 10.1111/j.1461-0248.2011.01596.x

De Wilde, M., Sebei, N., Puijalon, S., & Bornette, G. (2014). Responses of macrophytes to dewatering: effects of phylogeny and phenotypic plasticity on species performance. *Evolutionary Ecology*, *28*(6), 1155–1167. doi: 10.1007/s10682-014-9725-8

Del Valle, J., Buide, M. L., Whittall, J., & Narbona, E. (2018). Phenotypic plasticity in light-induced flavonoids varies among tissues in Silene littorea (Caryophyllaceae). *Environmental and Experimental Botany*, *153*. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.05.014

Duncan, E. J., Gluckman, P. D., & Dearden, P. K. (2014). Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype?: EPIGENETICS, PLASTICITY, AND EVOLUTION. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *322*(4), 208–220. doi: 10.1002/jez.b.22571

Elst, E. M., Acharya, K. P., Dar, P. A., Reshi, Z. A., Tufto, J., Nijs, I., & Graae, B. J. (2016). Pre-adaptation or genetic shift after introduction in the invasive species Impatiens glandulifera? *Acta Oecologica*, *70*, 60–66. doi: 10.1016/j.actao.2015.12.002

Fleming, J. P., & Dibble, E. D. (2015). Ecological mechanisms of invasion success in aquatic macrophytes. *Hydrobiologia*, *746*(1), 23–37. doi: 10.1007/s10750-014-2026-y

Fox, J. (2005). The R Commander: A Basic-Statistics Graphical User Interface to R. *Journal of Statistical Software*, *14*(1), 1–42. doi: 10.18637/jss.v014.i09

Fukao, T., & Bailey-Serres, J. (2004). Plant responses to hypoxia – is survival a balancing act? *Trends in Plant Science*, *9*(9), 449–456. doi: 10.1016/j.tplants.2004.07.005

Fukao, T., Barrera-Figueroa, B. E., Juntawong, P., & Peña-Castro, J. M. (2019). Submergence and Waterlogging Stress in Plants: A Review Highlighting Research Opportunities and Understudied Aspects. *Frontiers in Plant Science*, *10*. doi: 10.3389/fpls.2019.00340

Ghalambor, C. K., McKAY, J. K., Carroll, S. P., & Reznick, D. N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, *21*(3), 394–407. doi: 10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x

Gibert, P., Debat, V., & Ghalambor, C. (2019). Phenotypic plasticity, global change, and the speed of adaptive evolution. *Current Opinion in Insect Science*. doi: 10.1016/j.cois.2019.06.007

Godoy, O., Valladares, F., & Castro-Díez, P. (2011). Multispecies comparison reveals that invasive and native plants differ in their traits but not in their plasticity: Phenotypic plasticity and invasiveness. *Functional Ecology*, *25*(6), 1248–1259. doi: 10.1111/j.1365-2435.2011.01886.x

Grenier, S., Barre, P., & Litrico, I. (2016). Phenotypic Plasticity and Selection: Nonexclusive Mechanisms of Adaptation. *Scientifica*, *2016*, 1–9. doi: 10.1155/2016/7021701

Haury, J., Druel, A., Cabral, T., Paulet, Y., Bozec, M., & Coudreuse, J. (2014). Which adaptations of some invasive Ludwigia spp. (Rosidae, Onagraceae) populations occur in contrasting hydrological conditions in Western France? *Hydrobiologia*, *737*(1), 45–56. doi: 10.1007/s10750-014-1815-7

Hilker, M., & Schmülling, T. (2019). Stress priming, memory, and signalling in plants. *Plant, Cell & Environment*, *42*(3), 753–761. doi: 10.1111/pce.13526

Hu, Z., Qi, X., Zhang, M., Chen, X., & Nakazono, M. (2016). Roles of Phytohormones in Morphological and Anatomical Responses of Plants to Flooding Stress. In G. J. Ahammed & J.-Q. Yu (Eds.), *Plant Hormones under Challenging Environmental Factors* (pp. 117–132). doi: 10.1007/978-94-017-7758-2_5

Hussner, A. (2009). Growth and photosynthesis of four invasive aquatic plant species in Europe. *Weed Research*, *49*(5), 506–515. doi: 10.1111/j.1365-3180.2009.00721.x

Hussner, A., Windhaus, M., & Starfinger, U. (2016). From weed biology to successful control: an example of successful management of *Ludwigia grandiflora* in Germany. *Weed Research*, *56*(6), 434–441. doi: 10.1111/wre.12224

Jackson, M. B., & Colmer, T. D. (2005). Response and Adaptation by Plants to Flooding Stress. *Annals of Botany*, *96*(4), 501–505. doi: 10.1093/aob/mci205

Kawecki, T. J., & Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, *7*(12), 1225–1241. doi: 10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x

Kleunen, M. Van, Lenssen, J. P. M., Fischer, M., & Kroon, H. D. (2007). Selection on phenotypic plasticity of morphological traits in response to flooding and competition in the clonal shore plant Ranunculus reptans. *Journal of Evolutionary Biology*, *20*(6), 2126–2137. doi: 10.1111/j.1420-9101.2007.01431.x

Kleunen, Mark Van, & Fischer, M. (2005). Constraints on the evolution of adaptive phenotypic plasticity in plants. *New Phytologist*, *166*(1), 49–60. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01296.x

Kusano, T., Berberich, T., Tateda, C., & Takahashi, Y. (2008). Polyamines: essential factors for growth and survival. *Planta*, *228*(3), 367–381. doi: 10.1007/s00425-008-0772-7

Kuwabara, A., Ikegami, K., Koshiba, T., & Nagata, T. (2003). Effects of ethylene and abscisic acid upon heterophylly in Ludwigia arcuata (Onagraceae). *Planta*, *217*(6), 880–887. doi: 10.1007/s00425-003-1062-z

Kuwabara, A., & Nagata, T. (2006). Cellular basis of developmental plasticity observed in heterophyllous leaf formation of Ludwigia arcuata (Onagraceae). *Planta*, *224*(4), 761–770. doi: 10.1007/s00425-006-0258-4

Lamarque, L. J., Porté, A. J., Eymeric, C., Lasnier, J.-B., Lortie, C. J., & Delzon, S. (2013). A Test for Pre-Adapted Phenotypic Plasticity in the Invasive Tree Acer negundo L. *PLoS ONE*, *8*(9), e74239. doi: 10.1371/journal.pone.0074239

Lambert, E., Dutartre, A., Coudreuse, J., & Haury, J. (2010). Relationships between the biomass production of invasive Ludwigia species and physical properties of habitats in France. *Hydrobiologia*, *656*(1), 173–186. doi: 10.1007/s10750-010-0440-3

Lande, R. (2009). Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. *Journal of Evolutionary Biology*, *22*(7), 1435–1446. doi: 10.1111/j.1420-9101.2009.01754.x

Lande, Russell. (2015). Evolution of phenotypic plasticity in colonizing species. *Molecular Ecology*, *24*(9), 2038–2045. doi: 10.1111/mec.13037

Lê, S., Josse, J., & Husson, F. (2008). **FactoMineR** : An *R* Package for Multivariate Analysis. *Journal of Statistical Software*, *25*(1). doi: 10.18637/jss.v025.i01

Lee, K.-W., Chen, P.-W., Lu, C.-A., Chen, S., Ho, T.-H. D., & Yu, S.-M. (2009). Coordinated Responses to Oxygen and Sugar Deficiency Allow Rice Seedlings to Tolerate Flooding. *Science Signaling*, *2*(91), ra61–ra61. doi: 10.1126/scisignal.2000333

Li, J., Du, L., Guan, W., Yu, F.-H., & van Kleunen, M. (2016). Latitudinal and longitudinal clines of phenotypic plasticity in the invasive herb Solidago canadensis in China. *Oecologia*, *182*(3), 755–764. doi: 10.1007/s00442-016-3699-x

Li, L., Han, W., Thevs, N., Jia, X., Ji, C., Jin, D., … Zerbe, S. (2014). A Comparison of the Functional Traits of Common Reed (Phragmites australis) in Northern China: Aquatic vs. Terrestrial Ecotypes. *PLoS ONE*, *9*(2), e89063. doi: 10.1371/journal.pone.0089063

Loreti, E., Valeri, M. C., Novi, G., & Perata, P. (2018). Gene Regulation and Survival under Hypoxia Requires Starch Availability and Metabolism. *Plant Physiology*, *176*(2), 1286–1298. doi: 10.1104/pp.17.01002

Loreti, E., van Veen, H., & Perata, P. (2016). Plant responses to flooding stress. *Current Opinion in Plant Biology*, *33*, 64–71. doi: 10.1016/j.pbi.2016.06.005

Marin, P., Genitoni, J., Barloy, D., Maury, S., Gibert, P., Ghalambor, C. K., & Vieira, C. (2019). Biological invasion: The influence of the hidden side of the (epi)genome. *Functional Ecology*. doi: 10.1111/1365-2435.13317

Matesanz, S., Gianoli, E., & Valladares, F. (2010). Global change and the evolution of phenotypic plasticity in plants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1206*(1), 35–55. doi: 10.1111/j.1749-6632.2010.05704.x

Matzek, V. (2012). Trait Values, Not Trait Plasticity, Best Explain Invasive Species' Performance in a Changing Environment. *PLoS ONE*, *7*(10), e48821. doi: 10.1371/journal.pone.0048821

Maury, S., Sow, M. D., Le Gac, A.-L., Genitoni, J., Lafon-Placette, C., & Mozgova, I. (2019). Phytohormone and chromatin Crosstalk: The Missing Link For Developmental Plasticity? *Frontiers in Plant Science*, *10*. doi: 10.3389/fpls.2019.00395

Mendonça, A. M. das C., Lira, J. M. S., Melo, N. C. de, Rodrigues, M., Barbosa, J. P. R. A. D., Mendonça, A. M. das C., … Barbosa, J. P. R. A. D. (2019). Phenotypic Plasticity of Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) Landrum Under Different Light Conditions. *Floresta e Ambiente*, *26*(3). doi: 10.1590/2179-8087.037618

Mommer, L., Pons, T. L., & Visser, E. J. W. (2006). Photosynthetic consequences of phenotypic plasticity in response to submergence: Rumex palustris as a case study. *Journal of Experimental Botany*, *57*(2), 283–290. doi: 10.1093/jxb/erj015

Mommer, L., & Visser, E. J. W. (2005). Underwater Photosynthesis in Flooded Terrestrial Plants: A Matter of Leaf Plasticity. *Annals of Botany*, *96*(4), 581–589. doi: 10.1093/aob/mci212

Morris, M. R. J. (2014). Plasticity-Mediated Persistence in New and Changing Environments. *International Journal of Evolutionary Biology*, *2014*, 1–18. doi: 10.1155/2014/416497

Mozgova, I., Mikulski, P., Pecinka, A., & Farrona, S. (2019). Epigenetic Mechanisms of Abiotic Stress Response and Memory in Plants. In R. Alvarez-Venegas, C. De-la-Peña, & J. A. Casas-Mollano (Eds.), *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications: Transcriptional Regulation and Chromatin Remodelling in Plants* (pp. 1–64). doi: 10.1007/978-3-030-14760-0_1

Murren, C. J., Auld, J. R., Callahan, H., Ghalambor, C. K., Handelsman, C. A., Heskel, M. A., … Schlichting, C. D. (2015). Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: limits and costs of phenotype and plasticity. *Heredity*, *115*(4), 293–301. doi: 10.1038/hdy.2015.8

Nakamura, T., Yamamoto, R., Hiraga, S., Nakayama, N., Okazaki, K., Takahashi, H., … Komatsu, S. (2012). Evaluation of Metabolite Alteration under Flooding Stress in Soybeans. *Japan Agricultural Research Quarterly: JARQ*, *46*(3), 237–248. doi: 10.6090/jarq.46.237

Nakayama, H., Sinha, N. R., & Kimura, S. (2017). How Do Plants and Phytohormones Accomplish Heterophylly, Leaf Phenotypic Plasticity, in Response to Environmental Cues. *Frontiers in Plant Science*, *8*. doi: 10.3389/fpls.2017.01717

Oduor, A. M. O., Leimu, R., & van Kleunen, M. (2016). Invasive plant species are locally adapted just as frequently and at least as strongly as native plant species. *Journal of Ecology*, *104*(4), 957–968. doi: 10.1111/1365-2745.12578

Pigliucci, M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution*, *20*(9), 481–486. doi: 10.1016/j.tree.2005.06.001

Prodhan, M. Y., Munemasa, S., Nahar, M. N.-E.-N., Nakamura, Y., & Murata, Y. (2018). Guard Cell Salicylic Acid Signaling Is Integrated into Abscisic Acid Signaling via the Ca2+/CPK-Dependent Pathway. *Plant Physiology*, *178*(1), 441–450. doi: 10.1104/pp.18.00321

Richards, C. L., Alonso, C., Becker, C., Bossdorf, O., Bucher, E., Colomé-Tatché, M., … Verhoeven, K. J. F. (2017). Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. *Ecology Letters*, *20*(12), 1576–1590. doi: 10.1111/ele.12858

Robe, W. E., & Griffiths, H. (2000). Physiological and photosynthetic plasticity in the amphibious, freshwater plant, Littorella uniflora, during the transition from aquatic to dry terrestrial environments. *Plant, Cell & Environment*, *23*(10), 1041–1054. doi: 10.1046/j.1365-3040.2000.00615.x

Roux, C. L., Prete, S. D., Boutet-Mercey, S., Perreau, F., Balagué, C., Roby, D., … Gaudin, V. (2014). The hnRNP-Q Protein LIF2 Participates in the Plant Immune Response. *PLOS ONE*, *9*(6), e99343. doi: 10.1371/journal.pone.0099343

Sami, F., Yusuf, M., Faizan, M., Faraz, A., & Hayat, S. (2016). Role of sugars under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry*, *109*. doi: 10.1016/j.plaphy.2016.09.005

Sasidharan, R., Hartman, S., Liu, Z., Martopawiro, S., Sajeev, N., Veen, H. van, … Voesenek, L. A. C. J. (2018). Signal Dynamics and Interactions during Flooding Stress. *Plant Physiology*, *176*(2), 1106–1117. doi: 10.1104/pp.17.01232

Schlaepfer, D. R., Glättli, M., Fischer, M., & Kleunen, M. van. (2010). A multi-species experiment in their native range indicates pre-adaptation of invasive alien plant species. *New Phytologist*, *185*(4), 1087–1099. doi: 10.1111/j.1469-8137.2009.03114.x

Serra, A.-A., Nuttens, A., Larvor, V., Renault, D., Couée, I., Sulmon, C., & Gouesbet, G. (2013). Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in Arabidopsis thaliana. *Journal of Experimental Botany*, *64*(10), 2753–2766. doi: 10.1093/jxb/ert119

SEXTON, J. P., MCKAY, J. K., & SALA, A. (2002). PLASTICITY AND GENETIC DIVERSITY MAY ALLOW SALTCEDAR TO INVADE COLD CLIMATES IN NORTH AMERICA. *Ecological Applications*, *12*(6), 9.

Shaar-Moshe, L., Hayouka, R., Roessner, U., & Peleg, Z. (2019). Phenotypic and metabolic plasticity shapes life-history strategies under combinations of abiotic stresses. *Plant Direct*, *3*(1), e00113. doi: 10.1002/pld3.113

Siebenkäs, A., Schumacher, J., & Roscher, C. (2015). Phenotypic plasticity to light and nutrient availability alters functional trait ranking across eight perennial grassland species. *AoB PLANTS*, *7*. doi: 10.1093/aobpla/plv029

SULTAN, S. E. (2001). *PHENOTYPIC PLASTICITY FOR FITNESS COMPONENTS IN POLYGONUM SPECIES OF CONTRASTING ECOLOGICAL BREADTH*. *82*(2), 16.

Szabó, S., Peeters, E. T. H. M., Várbíró, G., Borics, G., & Lukács, B. A. (2019). Phenotypic plasticity as a clue for invasion success of the submerged aquatic plant Elodea nuttallii. *Plant Biology*, *21*(1), 54–63. doi: 10.1111/plb.12918

Tamang, B., & Fukao, T. (2015). Plant Adaptation to Multiple Stresses during Submergence and Following Desubmergence. *International Journal of Molecular Sciences*, *16*(12), 30164–30180. doi: 10.3390/ijms161226226

Trussell, G. C., & Smith, L. D. (2000). Induced defenses in response to an invading crab predator: An explanation of historical and geographic phenotypic change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *97*(5), 2123–2127. doi: 10.1073/pnas.040423397

Tzin, V., & Galili, G. (2010). The Biosynthetic Pathways for Shikimate and Aromatic Amino Acids in Arabidopsis thaliana. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, *8*. doi: 10.1199/tab.0132

Valladares, F., Sanchez-Gomez, D., & Zavala, M. A. (2006). Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. *Journal of Ecology*, *94*(6), 1103–1116. doi: 10.1111/j.1365-2745.2006.01176.x

Vera-Sirera, F., Minguet, E. G., Singh, S. K., Ljung, K., Tuominen, H., Blázquez, M. A., & Carbonell, J. (2010). Role of polyamines in plant vascular development. *Plant Physiology and Biochemistry*, *48*(7), 534–539. doi: 10.1016/j.plaphy.2010.01.011

Voesenek, L. A. C. J., & Bailey-Serres, J. (2015). Flood adaptive traits and processes: an overview. *New Phytologist*, *206*(1), 57–73. doi: 10.1111/nph.13209

Wang, X., Zhu, W., Hashiguchi, A., Nishimura, M., Tian, J., & Komatsu, S. (2017). Metabolic profiles of flooding-tolerant mechanism in early-stage soybean responding to initial stress. *Plant Molecular Biology*, *94*(6), 669–685. doi: 10.1007/s11103-017-0635-3

Wei, N., Cronn, R., Liston, A., & Ashman, T.-L. (2019). Functional trait divergence and trait plasticity confer polyploid advantage in heterogeneous environments. *New Phytologist*, *221*(4), 2286–2297. doi: 10.1111/nph.15508

Wells, C. L., & Pigliucci, M. (2000). Adaptive phenotypic plasticity: the case of heterophylly in aquatic plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, *3*(1), 1–18. doi: 10.1078/1433-8319-00001

Wu, J., Dai, Y., Rui, S., Cui, N., Zhong, F., & Cheng, S. (2015). Acclimation of Hydrilla verticillata to sediment anoxia in vegetation restoration in eutrophic waters. *Ecotoxicology*, *24*(10), 2181–2189. doi: 10.1007/s10646-015-1549-y

Xia, J., Sinelnikov, I. V., Han, B., & Wishart, D. S. (2015). MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. *Nucleic Acids Research*, *43*(W1), W251-257. doi: 10.1093/nar/gkv380

Yeung, E., Bailey-Serres, J., & Sasidharan, R. (2019). After The Deluge: Plant Revival Post-Flooding. *Trends in Plant Science*, *24*(5), 443–454. doi: 10.1016/j.tplants.2019.02.007

Yeung, E., Veen, H. van, Vashisht, D., Paiva, A. L. S., Hummel, M., Rankenberg, T., … Sasidharan, R. (2018). A stress recovery signaling network for enhanced flooding tolerance in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *115*(26), E6085–E6094. doi: 10.1073/pnas.1803841115

Yona, A. H., Frumkin, I., & Pilpel, Y. (2015). A Relay Race on the Evolutionary Adaptation Spectrum. *Cell*, *163*(3), 549–559. doi: 10.1016/j.cell.2015.10.005

Zhang, H., Wang, R., Wang, X., Du, N., Ge, X., Du, Y., & Liu, J. (2015). Recurrent water level fluctuation alleviates the effects of submergence stress on the invasive riparian plant Alternanthera philoxeroides. *PloS One*, *10*(6), e0129549.

Supplementary Figures and Tables

Table S1. ANOVA results for morphological, biomass and water content variables of aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t) at 14 days. Significance codes: .001 "***"; .01 "**"; .05 "*"; nonsignificant "=" Anova.

		Analyses of traits at t14 (anova)							
	Factors	Morphotype			Condition			morphotype x condition	
Type of variables	Morphologival trait (code)	Inequality	F Value	P	Inequalité	F Value	P	F Value	P
morphological variables	LP	Am < Tm	24.782	***	a < t	29.295	***	NS	NS
	nbL	Am < Tm	69.068	***	a < t	7.980	**	19.387	***
	nbNR	Am > Tm	4.568	*	a = t	NS	NS	38.227	***
	nbNB	Am < Tm	12.253	***	a < t	409.620	***	13.589	***
biomass	FWS	Am < Tm	24.504	***	a < t	145.543	***	4.352	*
	FWR	Am < Tm	12.200	***	a < t	313.110	***	5.759	*
	DWS	Am < Tm	30.646	***	a < t	182.694	***	9.500	**
	DWR	Am < Tm	6.513	*	a < t	147.311	***	4.416	*
water content	Sr	Am=Tm	NS	NS	a < t	42.624	***	6.095	*
	Rr	Am=Tm	NS	NS	a < t	18.744	***	NS	NS
	WC	Am=Tm	NS	NS	a > t	16.731	***	8.583	**

Table S2. ANOVA results for morphological, biomass and water content variables of aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t) at 28 days. Significance codes: .001 "***"; .01 "**"; .05 "*"; nonsignificant "=" Anova.

		Analyses of traits at t28 (anova)							
	Factors	Morphotype			Condition			morphotype x condition	
Type of variables	Morphologival trait (code)	Inequality	F value	P	Inequalité	F value	P	F Value	P
morphological variables	LP	Am < Tm	64.174	***	a < t	41.007	***	NS	NS
	nbL	Am < Tm	5.927	*	a < t	275.647	***	3.987	*
	nbNR	Am < Tm	14.687	***	a > t	90.859	***	NS	NS
	nbNB	Am < Tm	42.461	***	a < t	406.054	***	NS	NS
biomass	FWS	Am < Tm	56.104	***	a < t	434.759	***	6.234	*
	FWR	Am < Tm	55.374	***	a < t	422.901	***	NS	NS
	DWS	Am < Tm	50.491	***	a < t	667.172	***	6.110	*
	DWR	Am < Tm	38.851	***	a < t	137.077	***	6.988	**
water content	Sr	Am=Tm	NS	NS	a > t	412.794	***	10.903	**
	Rr	Am=Tm	NS	NS	a < t	54.758	***	NS	NS
	WC	Am > Tm	4.081	*	a > t	63.712	***	NS	NS

Table S3. Anova results for metabolites amount of aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t) at 14 days of experiment. Significance codes: .001 "***"; .01 "**"; .05 "*"; nonsignificant (NS)"="

		Analyses of metabolites quantities t14 (anova)							
	Factors	morphotype			condition			morphotype x conditon	
Type of metabolites	Metabolites	inequality	F Value	p	inequality	F Value	p	F Value	p
Amino acids	alanine	=	NS	NS	t>a	82.819	***	NS	NS
	glycine	=	NS	NS	a>t	7.232	*	NS	NS
	isoleucine	=	NS	NS	a>t	22.724	**	NS	NS
	leucine	=	NS	NS	=	NS	NS	7.130	*
	lysine	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	methionine	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	ornithine	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	phenylalanine	=	NS	NS	a>t	9.051	*	NS	NS
	tyrosine	Am>Tm	6.978	*	=	NS	NS	NS	NS
	valine	=	NS	NS	a>t	30.739	**	13.315	*
Polyols	adonitol	=	NS	NS	a>t	56.755	***	6.791	*
	arabitol	=	NS	NS	=	NS	NS	15.551	**
	erythritol	Am>Tm	14.99	**	t>a	17.70	**	70.31	***
	glycerol	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	G3P	=	NS	NS	a>t	11.881	*	NS	NS
	inositol	=	NS	NS	t>a	6.050	*	NS	NS
	mannitol	Am>Tm	24.547	**	=	NS	NS	57.987	***
Sugars	arabinose	Am>Tm	162.163	***	t>a	194.203	***	162.489	***
	galactose	Am>Tm	963.328	***	t>a	959.586	***	957.276	***
	glucose	Am>Tm	63.253	***	t>a	59.306	***	54.598	***
	mannose	Am>Tm	463.338	***	t>a	550.840	***	579.017	***
	ribose	Am>Tm	170.155	***	t>a	191.077	***	169.010	***
	trehalose	Am>Tm	58.292	***	=	NS	NS	NS	NS
	xylose	Am>Tm	88.210	***	t>a	133.169	***	89.567	***
Organic acids	ascorbic acid	=	NS	NS	=	NS	NS	7.152	*
	gluconolactone	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	glutamic acid	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	glyceric acid	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	malic acid	=	NS	NS	t>a	22.496	**	NS	NS
	quinic acid	Tm>Am	86.073	***	a>t	190.063	***	156.315	***
Polyamines	putrescine	Am>Tm	6.347	*	a>t	24.487	**	NS	NS
	spermidine	Am>Tm	28.618	**	a>t	163.598	***	NS	NS
	spermine	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
Others compounds	cytosine	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	ethanolamine	Am>Tm	25.86	**	t>a	35.15	**	60.07	***
Phytohormones	Absissic acid	=	NS	NS	t>a	107.393	***	NS	NS
	Auxin	=	NS	NS	=	NS	NS	6.784	*
	Salicylic acid	=	NS	NS	t>a	9.006	*	NS	NS
	Leucine jasmonyl acid	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS

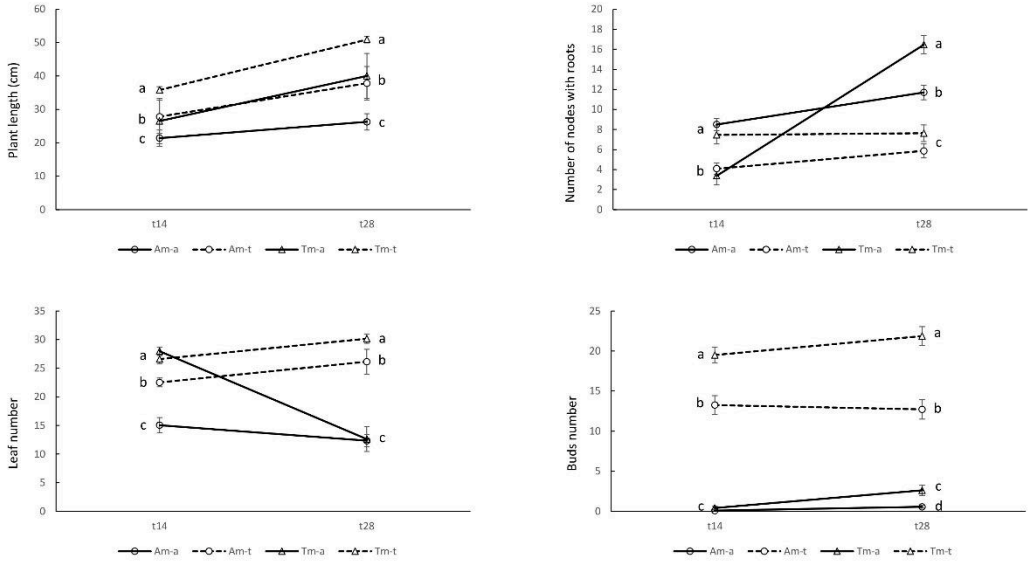
Table S4. Anova results for metabolites and phytohormones amounts of aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t) at 28 days of experiment. Significance codes: .001 "***"; .01 "**"; .05 "*"; nonsignificant (NS)"=" . No significant effect was found for interaction between morphotype and condition.

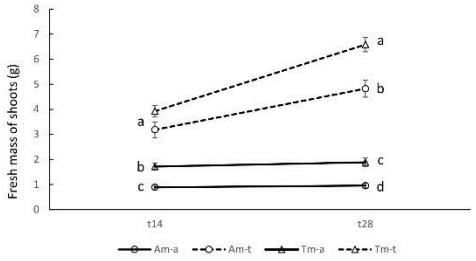
		Analyses of metabolites quantities t28 (anova)							
	Factors	morphotype			condition			morphotype x conditon	
Type of metabolites	Metabolites	inequality	F Value	p	inequality	F Value	p	F Value	p
Amino acids	alanine	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	glycine	=	NS	NS	a>t	46.327	***	NS	NS
	isoleucine	=	NS	NS	a>t	29.159	**	NS	NS
	leucine	=	NS	NS	a>t	15.745	**	NS	NS
	lysine	=	NS	NS	a>t	6.950	*	NS	NS
	methionine	=	NS	NS	a>t	12.091	*	NS	NS
	ornithine	=	NS	NS	a>t	12.355	*	NS	NS
	phenylalanine	=	NS	NS	a>t	32.754	**	NS	NS
	tyrosine	=	NS	NS	a>t	12.567	*	NS	NS
	valine	=	NS	NS	a>t	89.201	***	NS	NS
Polyols	adonitol	=	NS	NS	a>t	14.746	**	NS	NS
	arabitol	=	NS	NS	a>t	7.394	*	NS	NS
	erythritol	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	glycerol	=	NS	NS	a>t	9.408	*	NS	NS
	G3P	=	NS	NS	a>t	20.483	**	NS	NS
	inositol	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	mannitol	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	arabinose	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
Sugars	galactose	Tm>Am	6.386	***	=	NS	NS	NS	NS
	glucose	Tm>Am	13.997	**	=	NS	NS	NS	NS
	mannose	Tm>Am	6.054	*	=	NS	NS	NS	NS
	ribose	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	trehalose	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	xylose	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
Organic acids	ascorbic acid	=	NS	NS	t>a	17.171	**	NS	NS
	gluconolactone	=	NS	NS	t>a	70.079	***	NS	NS
	glutamic acid	=	NS	NS	a>t	12.336	*	NS	NS
	glyceric acid	=	NS	NS	t>a	6.847	*	NS	NS
	malic acid	=	NS	NS	t>a	8.112	*	NS	NS
	quinic acid	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
Polyamines	Putrescine	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
	spermidine	=	NS	NS	a>t	8.341	*	NS	NS
	spermine	=	NS	NS	a>t	9.360	*	NS	NS
Others compounds	cytosine	=	NS	NS	t>a	9.728	*	NS	NS
	ethanolamine	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS
Phytohormones	Absissic acid	=	NS	NS	t>a	107.393	***	NS	NS
	Auxin	=	NS	NS	=	NS	NS	6.784	*
	Salicylic acid	=	NS	NS	t>a	9.006	*	NS	NS
	Leucine jasmonyl acid	=	NS	NS	=	NS	NS	NS	NS

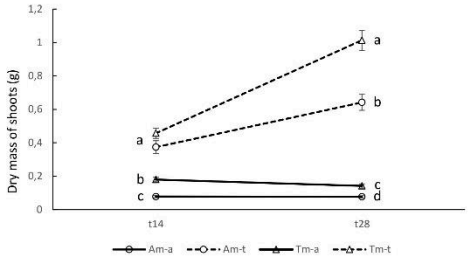
Table S5. Metabolic pathways identified by metaboanalyst analysis. Results are based on comparison between conditions (a *vs* t) p-holm< 0.05.

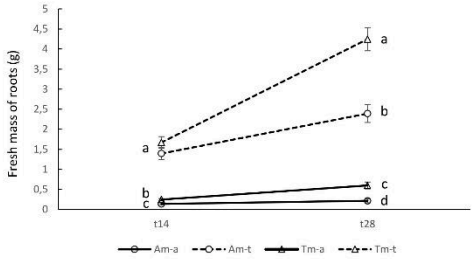
Time	Condition	Metabolomic pathways	List of Metabolites
t14 and t28	a>t	- Valine, leucine, isoleucine degradation pathway	valine, leucine, isoleucine
		- Valine, leucine, isoleucine biosynthesis pathway	valine, leucine, isoleucine
		- Glucosinolate biosynthesis pathway	isoleucine, leucine, methionine, phenylalanine and valine
		- Aminoacyl-tRNA biosynthesis pathway	alanine asparagine, aspartic acid, glutamic acid, glycine, isoleucine lysine, methionine, phenylalanine, serine, threonine, tyrosine, and valine
t28	a>t	- Phenylalanine metabolism, phenylpropanoide biosynthesis pathway	Phenylalanine
		- phenylalanine pathway	Phenylalanine
		- Tyrosine and tryptophan biosynthesis pathway	phenylalanine, tyrosine

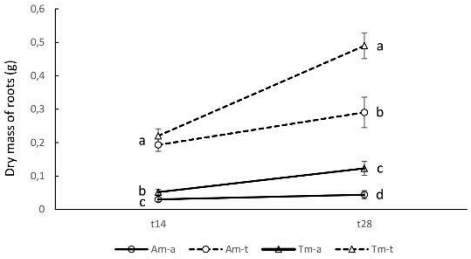
Fig S1 Morphological variables measured for aquatic and terrestrial morphotypes (Am: circle and Tm: triangle) in both aquatic and terrestrial conditions (-a: full line and –t: dotted line) at 14 (t14) and 28 (t28) days. Point represents the mean value of ten biological replicates with their standard errors. Letters correspond to means comparison by Tukey-test after ANOVA at t14 or t28 between morphotype*condition. Same letters means no significant difference.

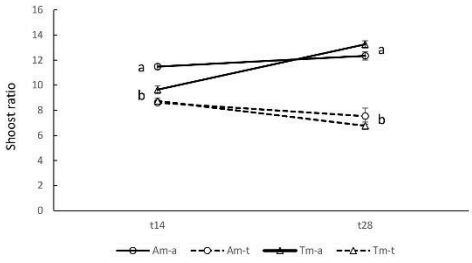


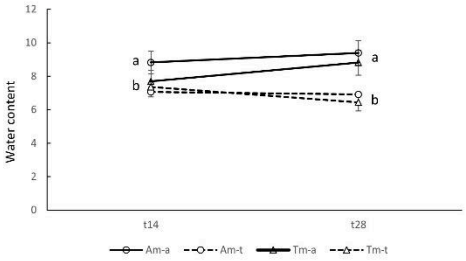

Fresh mass of shoots (g)
t14
t28
Am-a
Am-t
Tm-a
Tm-t


Dry mass of shoots (g)
t14
t28
Am-a
Am-t
Tm-a
Tm-t


Fresh mass of roots (g)
t14
t28
Am-a
Am-t
Tm-a
Tm-t


Dry mass of roots (g)
t14
t28
Am-a
Am-t
Tm-a
Tm-t


Shoost ratio
t14
t28
Am-a
Am-t
Tm-a
Tm-t


Water content
t14
t28
Am-a
Am-t
Tm-a
Tm-t

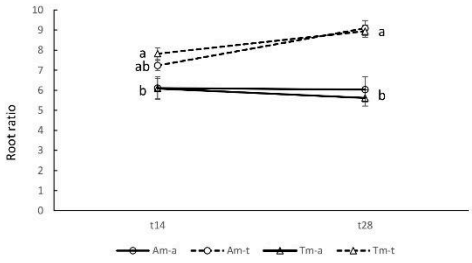
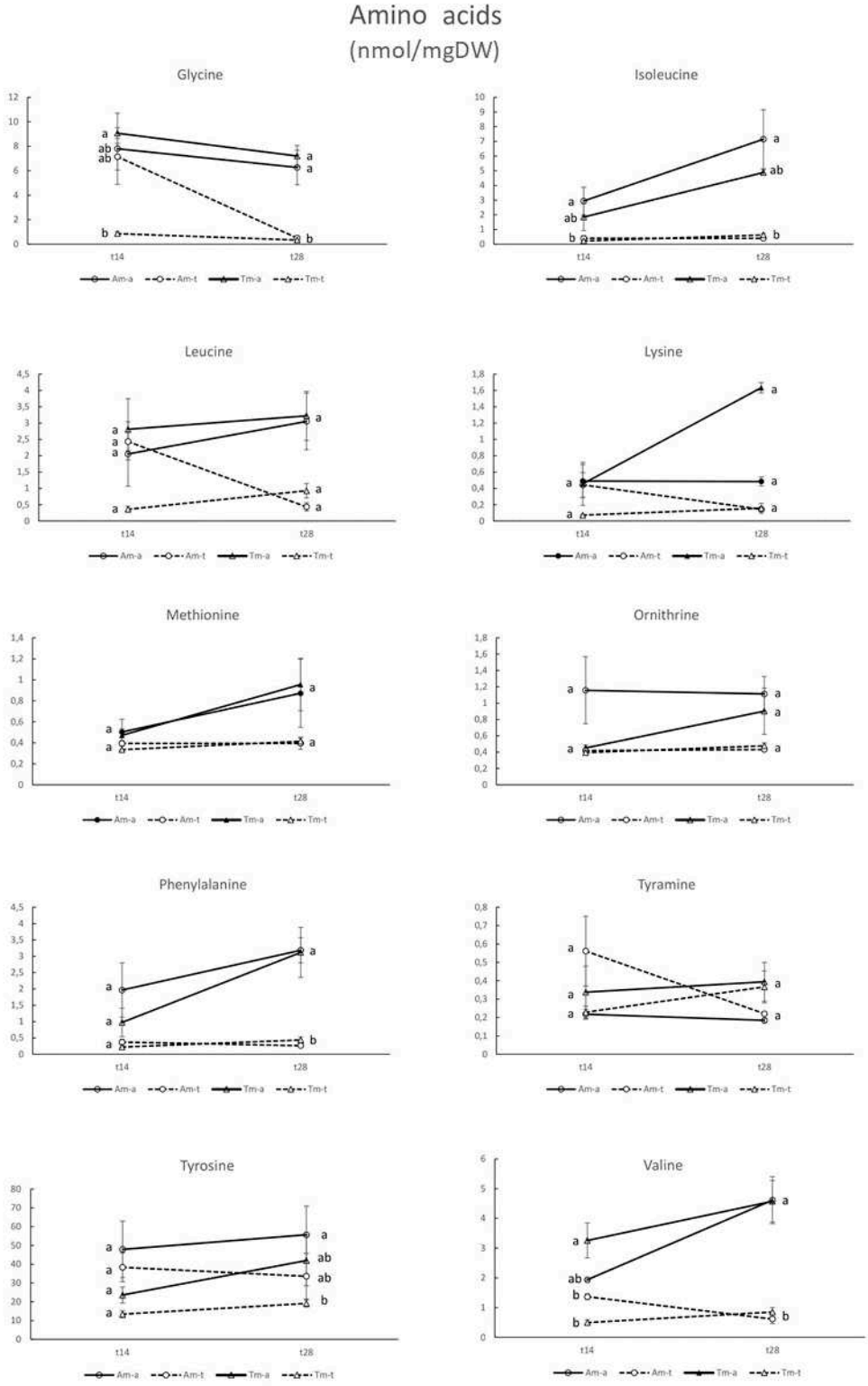
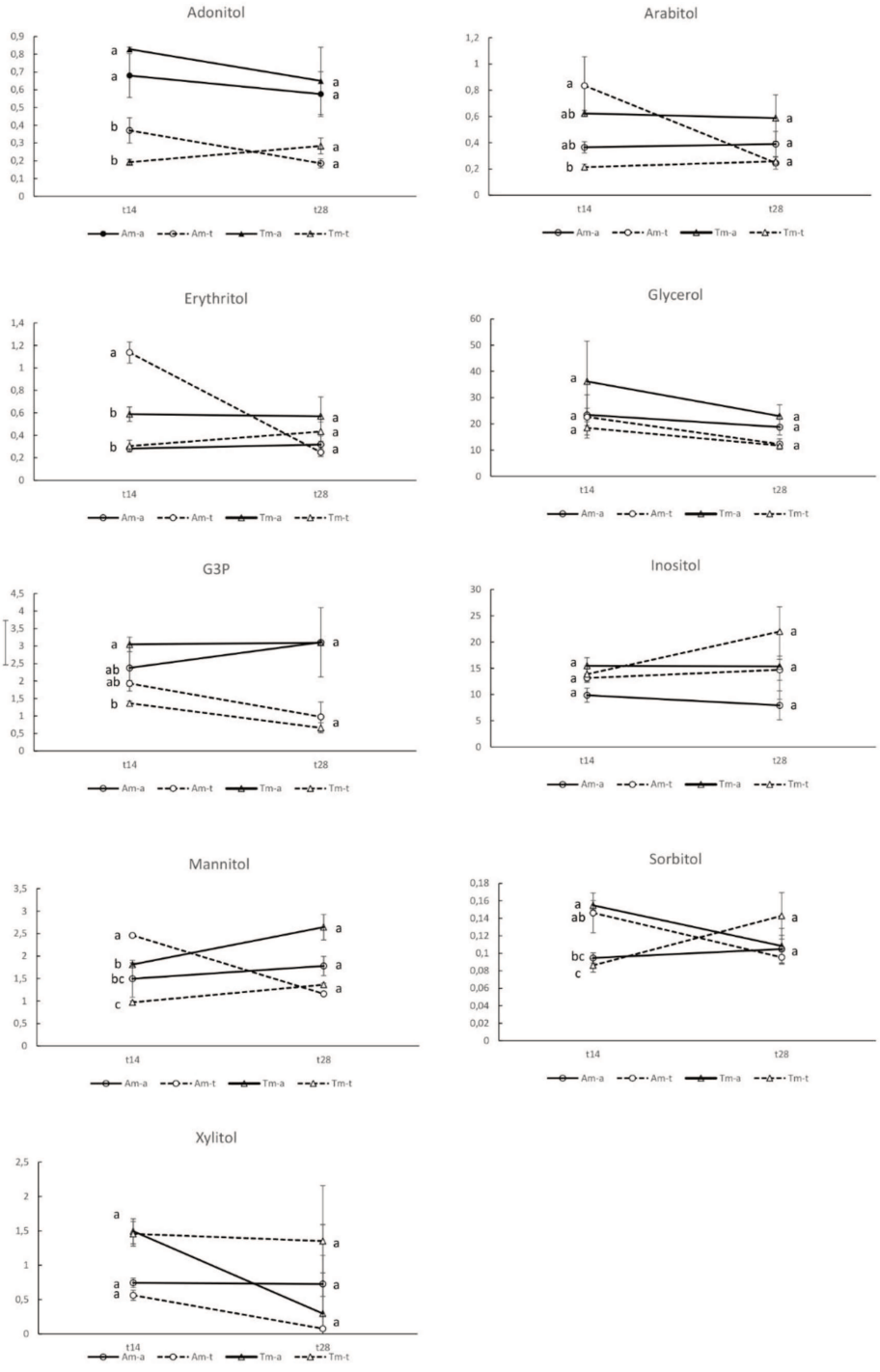

Root ratio
t14
t28
Am-a
Am-t
Tm-a
Tm-t

Fig S2 Metabolites measured in shoot of aquatic and terrestrial morphotypes (Am: circle and Tm: triangle) in both aquatic and terrestrial conditions (-a: full line and –t: dotted line) at 14 and 28 days of experiment. Metabolites quantities were expressed in nmol/mg of dry mass. Point represent the mean value of three biological replicates with their standard errors. Letters correspond to means comparison by *Tukey-test after ANOVA* at one time between morphotype*condition. Same letters means no significant difference.

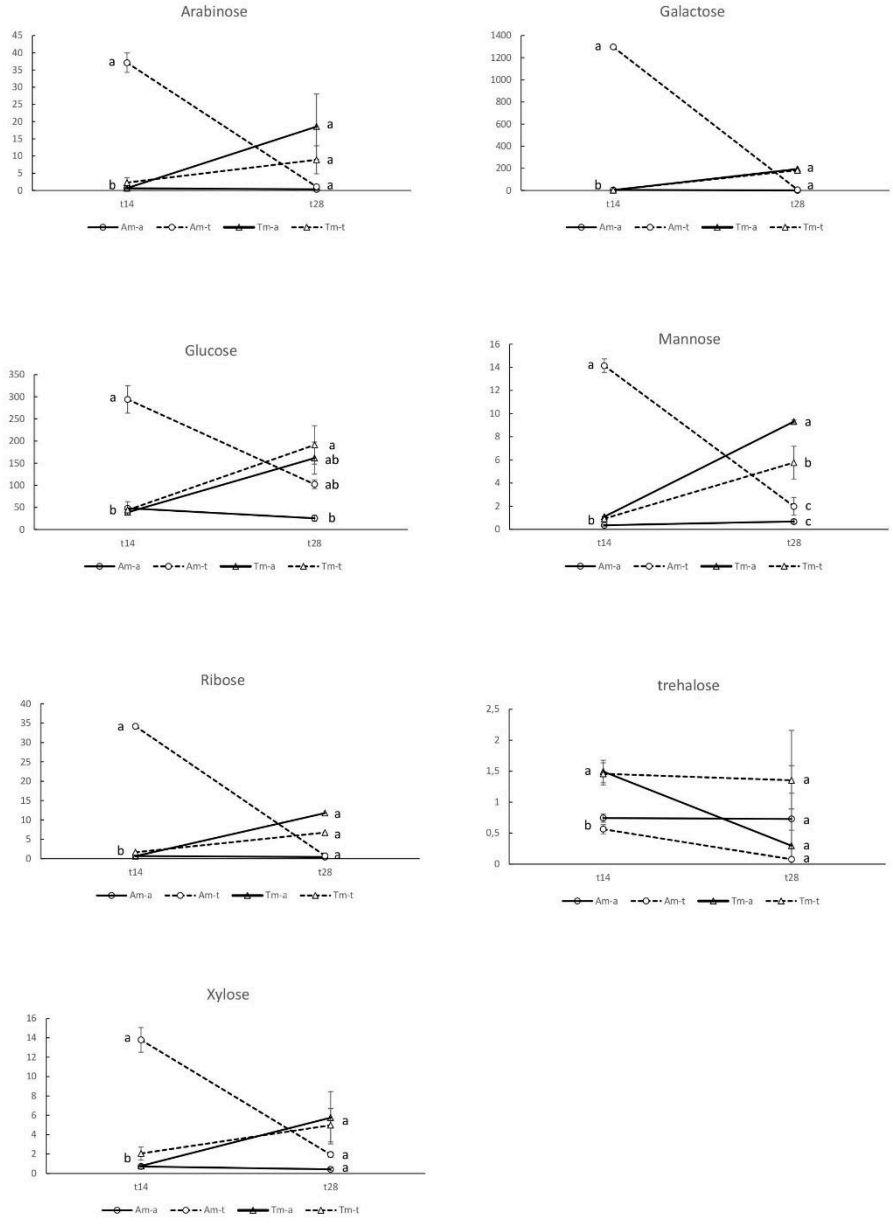

Amino acids
(nmol/mgDW)
Glycine
Isoleucine
Leucine
Lysine
Methionine
Ornithrine
Phenylalanine
Tyramine
Tyrosine
Valine
t14
t28
Am-a
Am-t
Tm-a
Tm-t

Polyols
(nmol/mgDW)

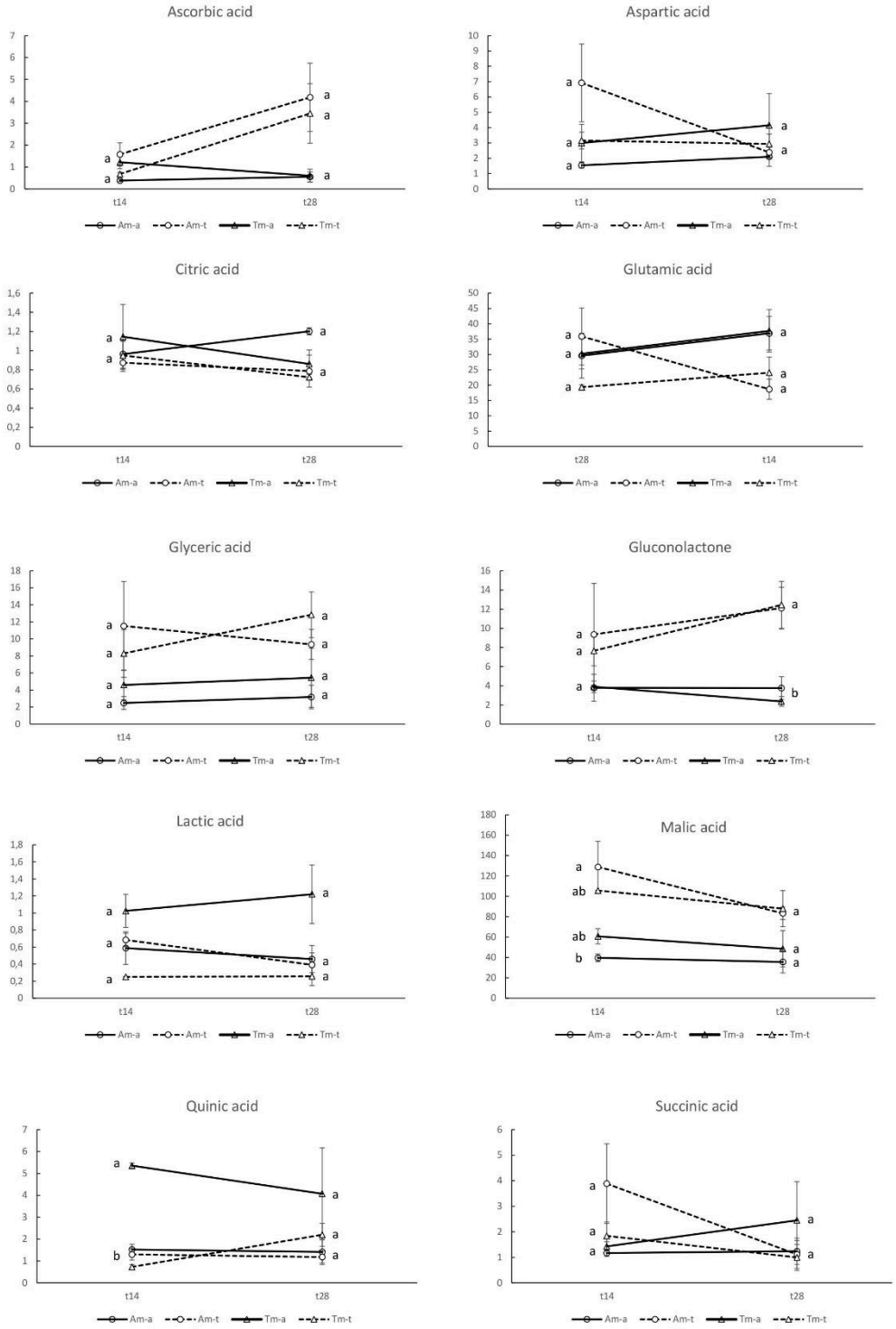


Sugars

(nmol/mgDW)

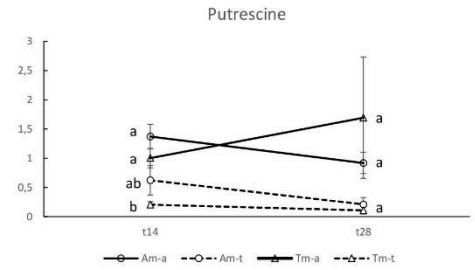


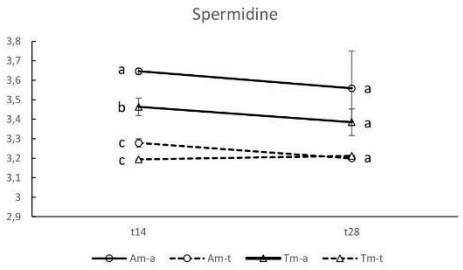
Organic acids
(nmol/mgDW)

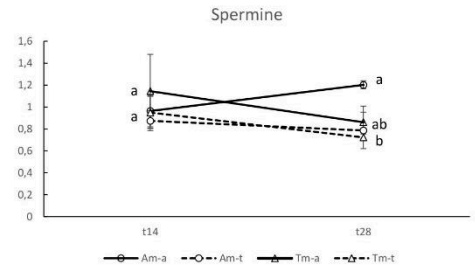


Polyamines

(nmol/mgDW)

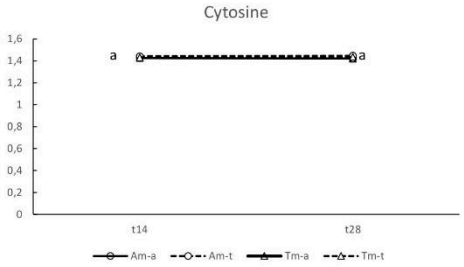


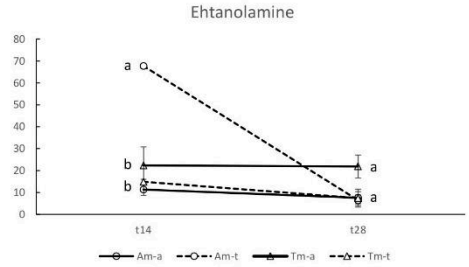




Others compounds

(nmol/mgDW)





IV. Discussion, limites et perspectives

Ce chapitre avait pour objectifs de :

(1) Faire le bilan des études portant sur les écosystèmes aquatique vs terrestre, afin de mettre en évidence les contraintes et les réponses des plantes relatives à ces deux milieux. Par ailleurs, la présentation du site d'étude, le marais de Mazerolles a été réalisée. Ce travail a fait l'objet de la partie bibliographique de ce chapitre

(2) Caractériser les deux morphotypes aquatique et terrestre en réponse au changement de milieu au niveau des traits physiologiques (morphologie et développement, dosages métabolomique et phytohormones). Cet objectif a été atteint avec la réalisation de deux publications : la première publiée en 2018. La seconde en préparation, mise en format publication.

(3) Détailler l'approche expérimentale visant à tester l'impact de fluctuation d'eau sur la physiologie et la plasticité des morphotypes terrestre et aquatique de la jussie. Ce troisième objectif est présenté dans la discussion ci-après et a fait l'objet de deux types expérimentations en conditions contrôlées.

1. Que nous apprend la caractérisation de la jussie sur ses capacités d'adaptation ?

La caractérisation des deux morphotypes aquatique et terrestre de la jussie au niveau de leur physiologie a permis de mieux comprendre leur réponse au changement de milieu. Ces différences, morphologiques, métaboliques et dans leur quantité de phytohormones, sont en majorité dues aux conditions aquatique et

terrestre. Ainsi, comme nous l'avons montré dans la partie introductive de ce chapitre, la jussie met en jeu des réponses attendues à la submersion et à la sécheresse. Parmi elles, on peut citer la production d'une biomasse racinaire importante, la biosynthèse de phytohormones comme l'acide abscissique et de métabolites comme des sucres, en condition terrestre. En condition aquatique, on trouve chez la jussie un contenu en eau plus important dans les racines et les parties aériennes et un métabolisme des acides aminés favorisé. Son développement et sa croissance ne semblent pas être perturbés par ces deux conditions. En particulier, nos résultats montrent que *L. grandiflora* présente un certain nombre de caractéristiques en milieu terrestre communes aux plantes tolérantes au stress hydrique (Figure I.8). Son caractère amphibie peut notamment expliquer ses capacités à se développer dans ces deux milieux (Kuwabara *et al.*, 2003; Hussner, 2010).

Les phytohormones sont des marqueurs clés pour la réponse aux stress hydriques (submersion et sécheresse). Nous avons réalisé des dosages de l'acide abscissique, l'acide salicylique, l'acide jasmonique et de l'auxine, offrant un premier aperçu de la variation de ces phytohormones en fonction des conditions aquatique ou terrestre chez la jussie (voir également chapitre II, article Genitoni *et al.*, en révision, Physiologia plantarum). Néanmoins, les dosages de l'éthylène et d'autres phytohormones comme les cytokinines apporteraient des éléments complémentaires. En effet, ces derniers interviennent dans la réponse aux stress hydriques (submersion et sécheresse), dans l'hétérophyllie et durant le développement (Kuwabara *et al.*, 2003 ; Loreti *et al.*, 2016). Par ailleurs, caractériser les balances hormonales entre auxine et cytokinine (Bielach *et al.*, 2017 ; Kieber and Schaller, 2018) serait primordial pour mieux comprendre les réponses de la jussie à ces deux milieux aquatique et terrestre. Par ailleurs, la réalisation de coupes anatomiques au niveau des racines, tiges et feuilles chez les morphotypes aquatique et terrestre permettrait de révéler des adaptations aux milieux aquatique et terrestre comme la présence d'aérenchymes comme observé chez de nombreuses espèces du genre Ludwigia (Bedoya and Madriñán, 2015).

Compte tenu des réponses de la jussie aux milieux aquatique et terrestre, on peut discuter du fait que ces conditions soient perçues comme un stress pour la plante. Or nous avons observé que le morphotype terrestre présente des valeurs de traits plus élevés que ceux du morphotype aquatique, et ce quelle que soit la condition. Le morphotype terrestre subit des conditions de vie hétérogènes, passant la

moitié de son cycle biologique entièrement en condition terrestre (prairie humide). Ainsi, on peut imaginer que ce morphotype a pu s'acclimater et de fait, soit plus tolérant à ces deux conditions. Par ailleurs, la jussie est une plante amphibie qui, selon des études phylogénétiques, aurait connu différents évènements de passage d'un milieu terrestre vers le milieu aquatique et inversement. Son histoire évolutive peut en partie expliquer sa capacité à coloniser des milieux variés (Bedoya & Madriñán, 2015). Une composante importante de la perception et des réponses des plantes à des stress de submersion et hydrique tourne autour du métabolisme des espèces réactives d'oxygène (Laxa *et al.*, 2019). Des dosages de ROS ou des mesures d'enzymes antioxydantes comme la catalase, la glutathion peroxydase ou la superoxyde dismutases effectuées sur les deux morphotypes en fonction des conditions aquatique et terrestre permettraient de compléter ces données.

2. La plasticité phénotypique aide-t-elle à mieux comprendre l'invasion du milieu terrestre par la jussie?

La plasticité phénotypique, comme vue dans l'introduction générale de ce manuscrit, est reconnue comme jouant un rôle dans l'acclimatation et l'adaptation des populations à de nouvelles conditions environnementales (Nicotra *et al.*, 2010 ; Hendry, 2016 ; Mendonça *et al.*, 2019). De multiples études se sont intéressées à son rôle dans le contexte des invasions biologiques chez les plantes (Li *et al.*, 2016 ; Oduor *et al.*, 2016 ; Szabó *et al.*, 2019). Certaines études n'ont pas montré de différences significatives pour la plasticité phénotypique entre espèce invasive et espèce native (Chown *et al.*, 2007 ; Godoy *et al.*, 2011 ; Matzek, 2012 ; Lamarque *et al.*, 2013). D'autres études ont, au contraire, révélé un rôle de la plasticité phénotypique dans le succès de l'invasion et la considèrent comme une caractéristique des espèces invasives (Sexton *et al.*, 2002 ; Daehler, 2003 ; Davidson *et al.*, 2011).

L'utilisation de l'indice de plasticité phénotypique proposé par Valladares *et al.* (2006) a permis d'évaluer cette dernière chez *Ludwigia grandiflora* en réponse au changement de milieu. Cet indice (RDPI) a été utilisé et validé dans de récentes études (Del Valle *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2019). Dans notre étude, l'utilisation de cet indice a rendu la comparaison de la plasticité possible entre les deux

morphotypes aquatique et terrestre. Dans notre cas, l'étude de normes de réaction n'a pas été possible, compte tenu du nombre d'environnements étudiés (aquatique et terrestre, soit 2 environnements). Elle pourrait être cependant envisagée en augmentant le nombre de conditions testées avec par exemple la mise en place d'un gradient de stress hydrique ou en réalisant un suivi temporel comprenant plusieurs temps d'observation (Gao *et al.*, 2015).

Nous avons montré des différences de plasticité phénotypique pour des traits physiologiques (morphologie et métabolisme) entre les deux morphotypes. Pour la majorité d'entre eux, nous avons constaté une plus grande plasticité phénotypique chez le morphotype aquatique que chez le morphotype terrestre bien que cela ne confère pas au morphotype aquatique un avantage sur les valeurs de ses traits. Dans la littérature, la plasticité phénotypique est déclinée comme pouvant être adaptative ou mal-adaptative. Nos données ne permettent pas de conclure sur la 'nature' de la plasticité exprimée par la jussie. Cependant, pour aller plus loin et déterminer la nature 'adaptative' ou non de cette plasticité phénotypique, il faudrait pouvoir relier les traits morphologiques à la valeur sélective (fitness) de la plante (Lefèvre *et al.*, 2015). Chez une espèce à multiplication végétative comme la jussie, la capacité à produire des propagules et des graines est à prendre en compte dans la valeur sélective. La jussie est capable de régénérer une plante et de se propager via une propagule comme une feuille ou un fragment de tige (Hussner, 2009). Ainsi, dans l'article Billet *et al.* (2018), nous avons fait l'hypothèse d'un lien entre le nombre de bourgeons et le nombre de feuilles produites avec la valeur sélective. Un de nos résultats appuyant cette hypothèse est la capacité du morphotype terrestre à produire des nombres significativement plus importants de bourgeons et de feuilles que ceux observés chez le morphotype aquatique et ce, quelle que soit la condition. Ainsi, si la plasticité phénotypique observée pour les traits morphologiques de la jussie est adaptative, cette dernière pourrait jouer un rôle dans l'adaptation au milieu terrestre.

Par ailleurs, nous avons montré que la plasticité phénotypique des traits étudiés variait dans le temps. Lande, (2015) fait l'hypothèse d'une évolution de la plasticité phénotypique entre le moment où une espèce est introduite dans un environnement nouveau et celui où elle a pu s'être acclimatée. Compte tenu de nos observations, le morphotype aquatique présentant une plasticité plus importante que le morphotype terrestre, nous posons l'hypothèse que la plasticité phénotypique de *L. grandiflora* a pu

évoluer durant le processus d'invasion. Afin de tester cette hypothèse, nous avons mené une expérimentation alternant des cycles d'immersion et d'émersion sur un temps plus long de 8 mois. Les objectifs de cette étude étaient d'une part, de tester l'impact de niveau d'eau fluctuant sur le morphotype aquatique et d'autre part, de mesurer l'évolution de la plasticité phénotypique des morphotypes aquatique et terrestre en réponse à un stress hydrique. Cette approche expérimentale est détaillée ci-dessous (point final de cette discussion).

Pour conclure, si l'étude de la plasticité phénotypique et de ses composantes est complexe, son caractère récurrent chez les espèces invasives et son rôle dans l'adaptation et l'acclimatation est important à prendre en compte dans l'invasion des prairies humides par *L. grandiflora.*

3. La fluctuation des niveaux d'eau participe-t-elle à l'acclimatation/adaptation de la jussie au milieu terrestre ?

Le cycle de vie de la jussie diffère selon le morphotype. Ainsi le morphotype aquatique passe l'entièreté de son cycle avec une partie de son appareil végétative toujours dans l'eau. Le morphotype terrestre quant à lui, voit le niveau d'eau fluctuer durant son cycle de développement. Durant six mois, de novembre à avril, le morphotype terrestre est en condition de submersion et de mai à octobre en condition d'émersion complète. L'hétérogénéité des conditions de vie du morphotype terrestre questionne sa capacité d'acclimatation. En effet, comme nous l'avons montré en introduction bibliographique de ce chapitre, si la submersion peut être un stress, celui de post-submersion bien que mal connu existe également (Yeung *et al.*, 2019).

Nous nous sommes posés la question de savoir si les conditions de vie hétérogènes subies par le morphotype terrestre participent ou non à son acclimatation. Ainsi, nous avons voulu tester l'impact de l'alternance des niveaux d'eau sur les morphotypes terrestre et aquatique de *L. grandiflora*.

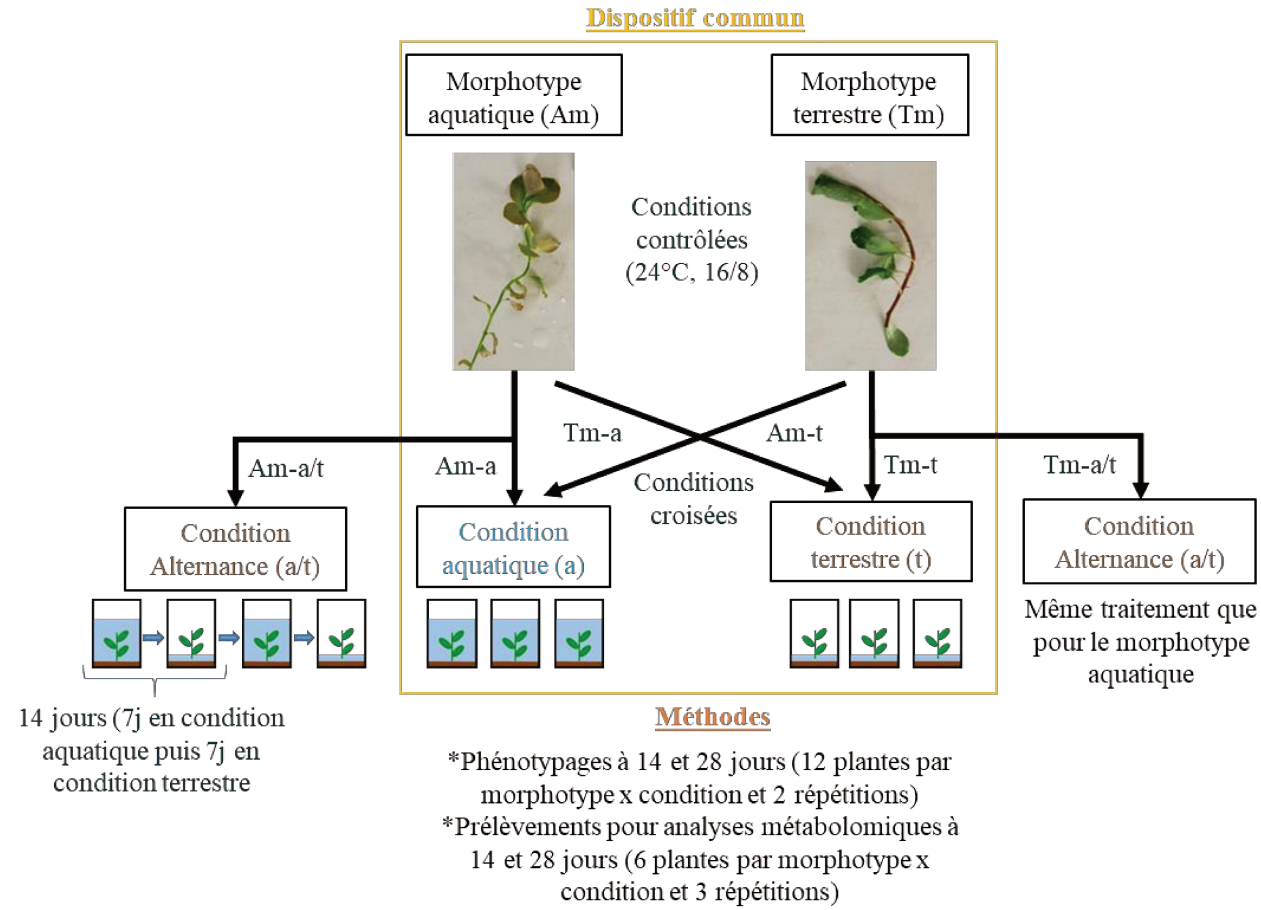


Figure I.14 : Dispositif expérimental visant à tester l'impact de la fluctuation des niveaux d'eau sur le morphotype aquatique puis sur le morphotype terrestre dans 2 expérimentations indépendantes.

L'encadré jaune désigne le dispositif commun à l'ensemble des expérimentations effectuées durant ma thèse. L'alternance consiste à faire varier le niveau d'eau durant l'expérimentation. Ainsi, les morphotypes aquatique et terrestre de jussie passent 7 jours en condition aquatique puis 7 jours en condition terrestre (soit 1 cycle d'alternance) et cela deux fois pour une durée totale de 28 jours (soit 2 cycles d'alternance).

3.1.Effet de cycles d'alternance du niveau d'eau sur le morphotype aquatique et sur le morphotype terrestre.

Pour mener à bien cet objectif, nous avons réalisé deux expérimentations indépendantes en conditions contrôlées traitant simultanément le morphotype aquatique (Am) puis le morphotype terrestre (Tm). Le protocole appliqué visait à comparer la morphologie et le métabolisme d'un morphotype (Am) ou (Tm) dans leur condition originelle (Am-a ou Tm-t), dans les conditions croisées (Am-t ou Tm-a) et en condition d'alternance (niveau d'eau fluctuant) (Am-a/t ou Tm-a/t). Dans chaque expérience, les morphyptes Am et Tm sont utilisés comme témoins et élevés dans leur condition d'origine (Am-A ; Tm-T) (Figure I.14).

Les cycles d'alternance des niveaux d'eau ont consisté à conduire le morphotype aquatique (Am-a/t) ou le morphotype terrestre (Tm-a/t) durant 7 jours en condition aquatique (immersion complète de la plante), puis 7 jours en condition terrestre (émersion complète de la plante), ce qui correspond à un cycle d'alternance. Deux cycles ont ainsi été réalisés en chambre de culture sur une durée d'un mois. Des mesures physiologiques (morphologie et métabolisme) ont été réalisées à 14 (t14) et 28 (t28) jours. (Figure I.14). L'expérimentation sur les cycles d'alternance du morphotype terrestre a notamment été réalisée par Kevin Billet durant son stage en 2015. Les travaux sur les cycles d'alternance du morphotype aquatique l'ont été durant ma thèse.

Les premiers résultats concernant l'approche des fluctuations d'eau sur un temps court sont visibles sur les figures I.15 et I.16. Ce sont des analyses en composantes principales sur les données morphologiques testant dans le premier cas, l'alternance concernant le morphotype aquatique et dans le second, l'alternance pour le morphotype terrestre. Pour chacune de ces analyses, on constate qu'au temps T0, peu de différences existent entre les morphotypes témoignant de la normalisation avant le conditionnement en chambre, via le préconditionnement (Figure I.14).

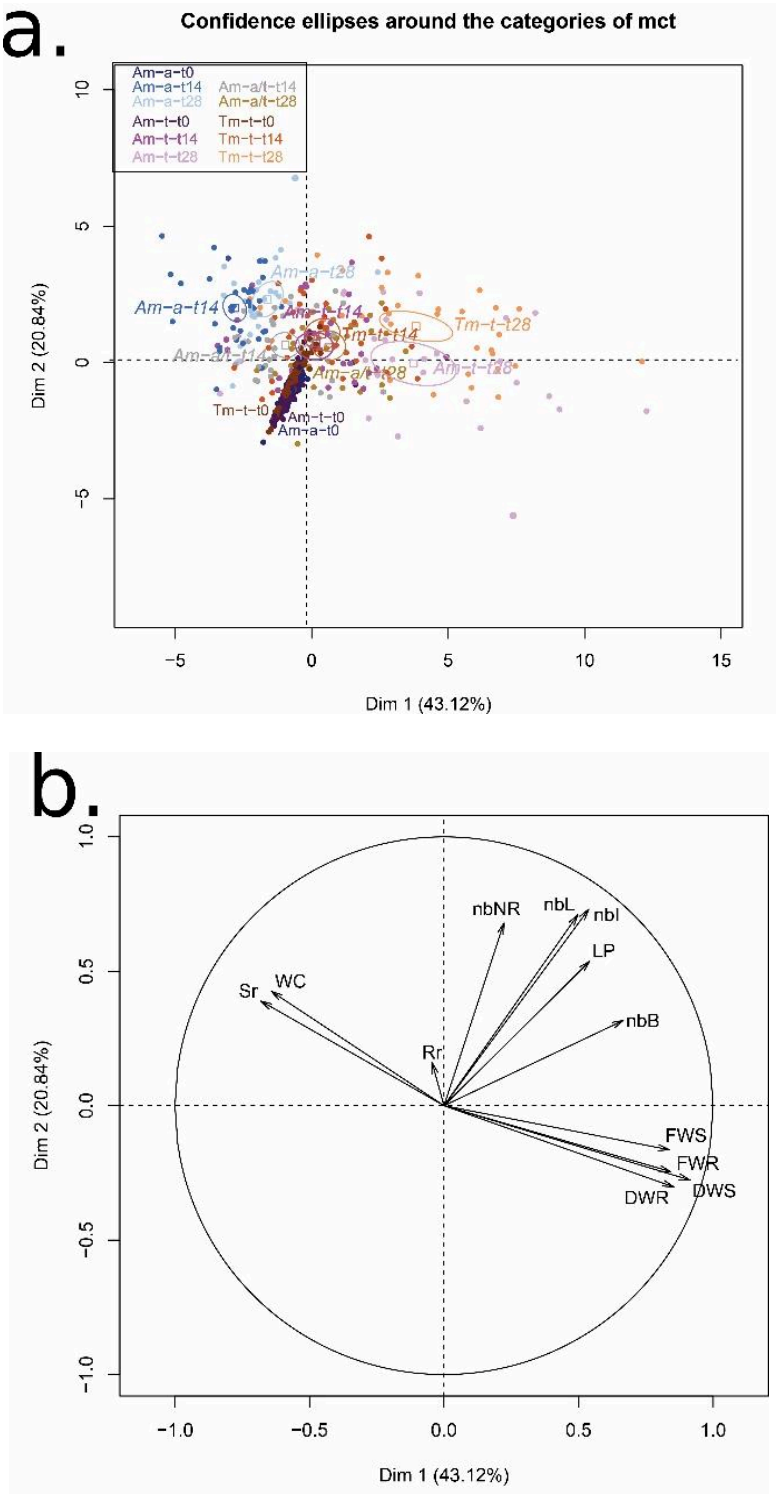


Figure I.15 : Analyses en composante principale caractérisant la variabilité morphologique à 14 (t14) et 28 (t28) jours pour les morphotypes aquatique et terrestre dans des conditions aquatiques (Am-a), terrestre (Am-t et Tm-t) et d'alternance des niveaux d'eau (Am-a/t).

a. Carte des facteurs individuels. Chaque point représente un individu.(b) Carte des variables. Les variables morphologiques représentées sont la taille de la plante (LP), le nombre de feuilles (nbL), le nombre de nœuds avec des racines (nbNR), le nombre de bourgeons (nbB), la biomasse fraiche et sèches des racines et des tiges (FMR, FMS, DMR, DMS), le ratio des tiges et des racines (FMS/DMS = Sr; FMR/DMR = Rr) et le contenu en eau (WC=((FMR+FMR)-(DMR+DMS))/(DMR+DMS)).

Dans le cas du morphotype aquatique, l'analyse en composante principale explique 63.96% de la variabilité dont 43.12% pour l'axe 1 et 20.84% pour l'axe 2 (Figure I.15). Le premier axe discrimine les conditions aquatique et terrestre dans lesquelles se développent les plantes. Nous observons qu'à t14, les morphotypes terrestre et aquatique en condition terrestre et en condition d'alternance (Am-t, Tm-t et Am-a/t) présentent des morphologies proches. Par ailleurs, il y a peu de différence entre le temps t14 et le temps t28 pour le morphotype aquatique qui a subi l'alternance des niveaux d'eau (Am-a/t). Le contenu en eau caractérise la condition aquatique (Sr et WC) alors que les plantes se développant en condition terrestre présentent des biomasses racinaires et aériennes plus importantes (FWS, FWR, DWS, DWR) (Figure I.15b). La dynamique temporelle est corrélée à l'axe 1 avec la majorité des variables étudiées.

Dans le cas du morphotype terrestre (Figure I.16), on observe une structuration selon deux axes. Le premier explique 53.61% de la variabilité et discrimine les conditions, avec à gauche la condition aquatique et à droite les conditions terrestre et d'alternance. Comme le montre le cercle des corrélations (Figure I.16), les morphotypes se développant en condition aquatique sont caractérisés par des variables de contenu en eau plus importantes (WC et Sr) alors que les variables de biomasse (FWS, FWR, DWS, DWR) et de développement caractérisent la condition terrestre. La dynamique temporelle s'inscrit sur l'axe 1 pour le morphotype terrestre et sur l'axe 2 pour le morphotype aquatique, ce dernier expliquant 17.83% de la variabilité. Nous observons que le morphotype terrestre ayant subi l'alternance (tm-a-t14 vs tm-a-t28) présente aux 2 temps de la cinétique des valeurs de traits morphologiques et de développement proches de celles observées pour le morphotype terrestre en condition terrestre, en particulier au temps t14. Ainsi, le morphotype terrestre ne semble que peu affecté par l'alternance des niveaux d'eau. Enfin, nous observons une plus grande divergence chez le morphotype terrestre se développant en condition aquatique (Tm-a) entre t14 et t28 que celle observée pour le morphotype aquatique. Ceci est une observation récurrente dans toutes les expérimentations réalisées durant ma thèse.

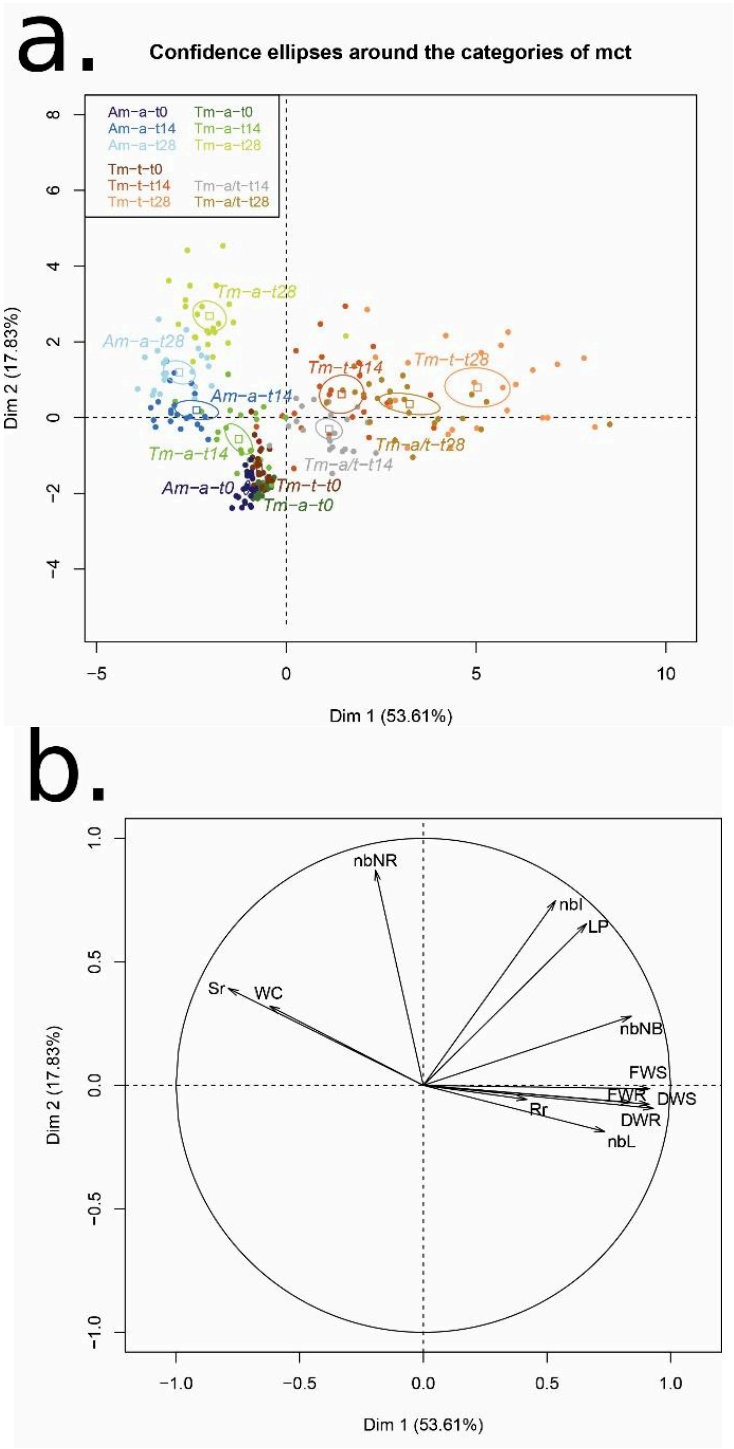


Figure I.16 : Analyses en composante principale caractérisant la variabilité morphologique à 14 (t14) et 28 (t28) jours pour les morphotypes aquatique et terrestre dans des conditions aquatiques (Am-a et Tm-a), terrestre (Tm-t) et d'alternance des niveaux d'eau (Tm-a/t).

a. Carte des facteurs individuels. Chaque point représente un individu.(b) Carte des variables. Les variables morphologiques représentées sont le nombre de feuilles (nbL), le nombre de nœuds avec des racines (nbNR), le nombre de bourgeons (nbB), la biomasse fraiche et sèches des racines et des tiges (FMR, FMS, DMR, DMS), le ratio des tiges et des racines (FMS/DMS = Sr; FMR/DMR = Rr) et le contenu en eau (WC=((FMR+FWR)-(DMR+DMS))/(DMR+DMS)).

Ces résultats révèlent un impact plus fort de l'alternance sur le morphotype aquatique que sur le morphotype terrestre, avec pour effet principal de ralentir la croissance et le développement (Figure I.15 et 16). L'application de 2 cycles d'alternance sur le morphotype terrestre a peu impacté son développement, suggérant que les conditions de vie de la jussie en milieu terrestre participent à son acclimatation. Ceci valide notre hypothèse de départ. L'analyse des données métabolomiques ainsi que le calcul d'indice de plasticité phénotypique compléteront cette étude.

3.2.Effet de 8 cycles d'alternance sur le morphotype aquatique.

Dans cette expérimentation l'objectif est de mimer la transition du morphotype aquatique du milieu aquatique vers le milieu terrestre et de valider l'hypothèse du rôle du cycle de développement en milieu terrestre de la jussie dans son acclimatation au milieu terrestre.

Pour ce faire, nous avons élevé les deux morphotypes Am et Tm dans leur condition originelle (Am-a et Tm-t), dans les conditions croisées (Am-t et Tm-a) et en condition d'alternance pour le morphotype aquatique (Am-a/t) en serre durant une période de 8 mois (Unité expérimentale U3E, Antoine Gallard.et Didier Azam). La fluctuation des niveaux d'eau correspondait à 14 jours en condition aquatique puis 14 jours en condition terrestre, équivalent à un cycle d'un mois. Ainsi le morphotype aquatique subissant l'alternance des niveaux d'eau a subi 8 cycles d'alternance. Des prélèvements en serre ont été effectués à 3 mois, 6 mois et 8 mois d'expérimentation (cycle 3, cycle 6 et cycle 8).

Des expériences réalisées en chambre de culture visaient à révéler la capacité d'acclimatation à un stress hydrique des différents morphotypes selon leur conditionnement en serre (Figure I.17). Ainsi, des boutures normalisées à 10cm des morphotypes conduits en serre (Am-a, Am-t, Tm-t, Tm-a et Am-a/t) ont subi une étape de prétraitement en chambre de culture afin de favoriser l'enracinement des boutures (Figure 1. 17). Durant ce prétraitement, toutes les boutures ont été immergées durant 7 jours (condition aquatique) puis repiquées dans un sol saturé en eau durant 7 jours (condition terrestre). Puis, les boutures enracinées ont été soumises en chambre de culture à deux conditions différentes. La première condition correspondait à la condition terrestre pour laquelle l'eau était maintenue durant l'expérience (traitement « non stressant »). La seconde condition consistait en l'application d'un stress hydrique ou après l'ajout d'une quantité d'eau au départ, plus aucun apport d'eau n'a été réalisé

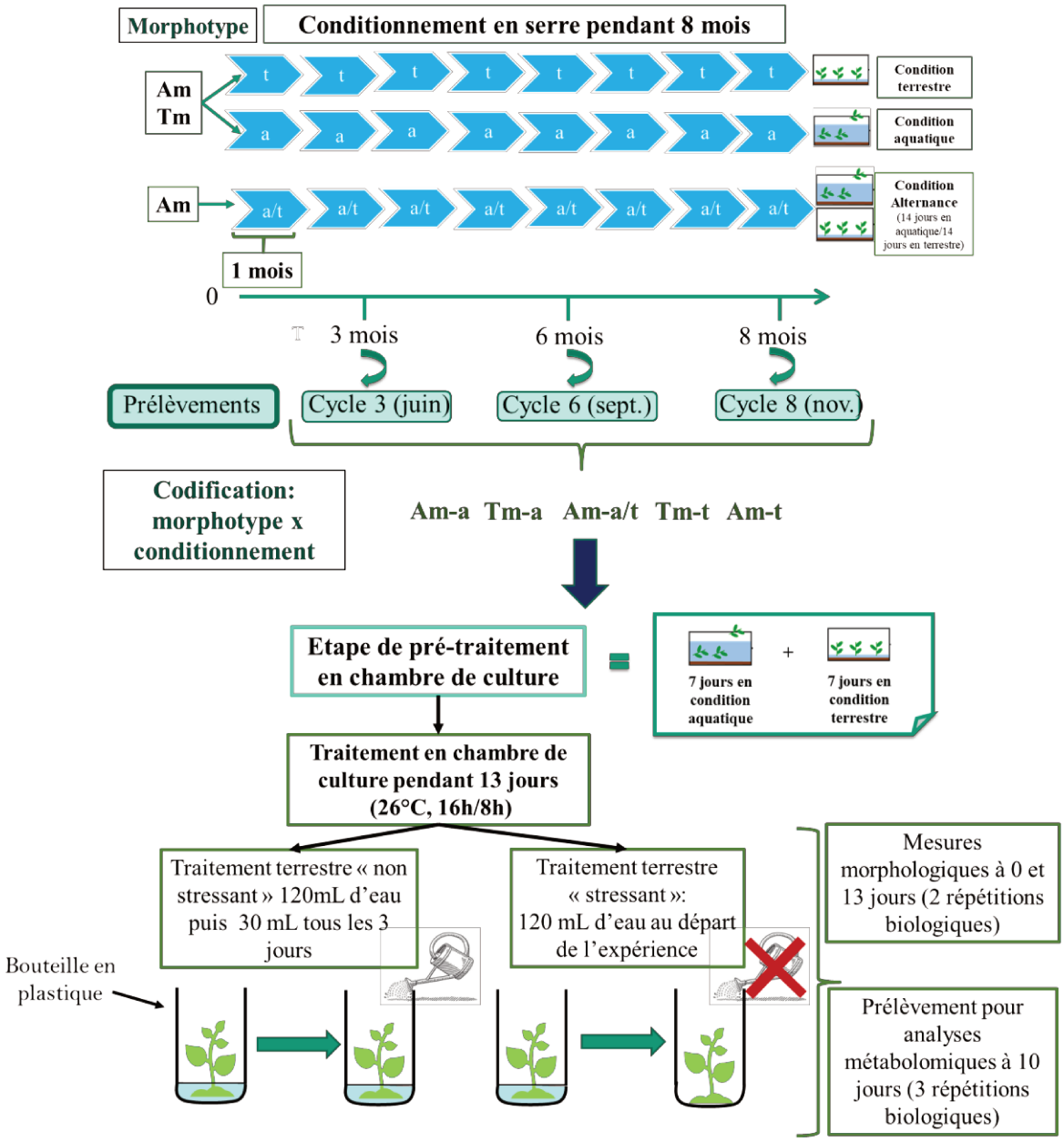


Figure I.17 : Dispositif expérimental visant à tester l'impact de la fluctuation des niveaux d'eau sur le morphotype aquatique suite à l'application de 8 cycles d'alternances.

Le morphotype aquatique a été élevé en serre soit en condition aquatique (Am-a), soit en condition terrestre (Am-t), soit en condition d'alternance des niveaux d'eau (Am-a/t). Un cycle d'alternance correspond à 15 jours en condition aquatique (immersion) et 15 jours en condition terrestre (émersion). Le morphotype terrestre a été conduit en condition aquatique (Tm-a) et en condition terrestre (Tm-t) Trois prélèvements ont été réalisés au bout de 3, 6 et 8 cycles d'alternances afin de mener des expériences de stress hydrique en chambre de culture. Deux traitements différents ont été appliqués. Le premier consiste en une condition terrestre classique pour laquelle l'eau est maintenue affleurant le substrat tout au long de l'expérience. Le second traitement consiste en une condition terrestre pour laquelle aucun arrosage n'est réalisé après un apport initial de 120 ml d'eau.

durant la durée de l'expérience (14 jours) (traitement terrestre « stressante »). Des mesures morphologiques (traits développementaux et biomasses) ont été réalisées à 0 et 13 jours, à raison de 12 plantes pour chaque morphotype x condition et par répétition biologique (2 répétitions biologiques) et des prélèvements pour une analyse métabolique ont été faits à 10 jours (6 plantes par morphotype x condition et par répétition biologique, 3 répétitions biologiques). Seules les données correspondant aux cycles 6 et 8 ont pu être collectées et seront traitées. En effet, l'application des traitements « non stressant » et « stressant » a conduit à une perte trop importante des plantes au cycle 3 pour que les données puissent être analysées.

L'analyse des données collectées n'a cependant pas pu être finalisée dans le cadre de ma thèse et devra être poursuivie.

CHAPITRE II :

Étude du rôle de l'épigénome dans la réponse aux changements de milieux chez *L. grandiflora*

I. Introduction

1. Contexte de l'étude

Les changements globaux offrent de nouvelles opportunités de dispersion pour les espèces invasives. De par leurs impacts économiques et écologiques, les études sur les invasions biologiques sont devenues primordiales. De plus, les espèces invasives peuvent également représenter de nouveaux modèles pour mieux comprendre les capacités des organismes à s'acclimater rapidement à de nouvelles conditions environnementales. Dans ce contexte, *L. grandiflora,* plante aquatique invasive, est un modèle pertinent et est étudiée depuis plusieurs années d'un point de vue écologique (Dandelot, 2004 ; Thouvenot, 2012 ; Gillard *et al.*, 2017). L'apparition récente d'un morphotype terrestre en France, et ceci moins de 5 ans après la colonisation par le morphotype aquatique pose la question des sources de flexibilité génétique et/ou épigénétique. L'épigénétique est impliquée dans de nombreux processus développementaux ou de réponse à des contraintes biotiques et abiotiques (Meyer, 2015 ; Ronce *et al.*, 2015 ; Crisp *et al.*, 2016 ; Alonso *et al.*, 2019). Des études sur des modèles invasifs (plantes et animaux) ont montré la pertinence d'étudier l'épigénome, suggérant même, dans certains cas, que la diversité épigénétique pourrait être plus importante que la diversité génétique et participerait à la réussite de l'invasion (Marin/Genitoni *et al.*, 2019).

2. Objectif de l'étude

L'objectif de notre étude est d'investiguer l'épigénome comme source de flexibilité chez les plantes invasives en étudiant le modèle jussie et sa réactivité aux changements de milieux (aquatique *versus* terrestre). La question est donc de déterminer si la méthylation participe à la réponse au changement de milieu de *Ludwigia grandiflora* ?

La jussie se multiplie essentiellement par voie végétative, ce qui laisserait supposer une faible diversité génétique au sein d'une même population. Dans le cadre de la thèse de Luis Portillo, 2017-

2020), une étude de génétique des populations a été réalisée pour comparer la diversité génétique des morphotypes terrestre et aquatique de la population de Mazerolles. Les résultats obtenus révèlent la présence d'une diversité génétique importante, mais également l'absence de structuration significative entre les deux morphotypes. Ainsi, les sources de flexibilité génétique et épigénétique peuvent jouer sur l'acclimatation et l'adaptation de la jussie au milieu terrestre. Dans ce cadre, nous faisons l'hypothèse que les mécanismes épigénétiques peuvent être une source de flexibilité et sont une piste à explorer pour comprendre l'acclimatation de la jussie au milieu terrestre. De plus, ces dernières années, le développement de technologies et stratégies pour l'étude de l'épigénome sur plantes modèles permet aujourd'hui d'envisager leur utilisation sur des espèces non modèles. Ces apports nous ont permis de réfléchir à une stratégie pour explorer cette piste épigénétique, chez *Ludwigia grandiflora* espèce pour laquelle, il n'existe actuellement aucune ressource génomique.

Trois étapes ont été définies dans le cadre de ma thèse pour réaliser cet objectif :

1 – Réaliser un état de l'art des études en épigénétique et sur les éléments transposables ('TEs') chez les espèces invasives (animales et végétales) et leurs rôles possibles comme source de flexibilité. Ce travail a été valorisé sous la forme d'une publication Marin/Genitoni *et al.*, 2019 (Functional Ecology, numéro spécial en épigénétique dans le cadre du RTP3E http://rtp-3e.wixsite.com/rt3e, DOI : 10.1111/1365-2435.13317) et dont je suis 1er coauteur. Ma contribution à la rédaction a notamment porté sur les espèces invasives végétales et l'élaboration de la Figure 2 qui dresse un bilan synthétique des étapes de l'invasion au regard des possibles rôles de l'épigénétique et des TEs.

2 – Mener la première étude expérimentale pour tester le possible rôle de la méthylation de l'ADN chez les morphotypes terrestre et aquatique de *Ludwigia grandiflora* lors d'un changement de milieu. L'originalité de ce travail réside dans l'utilisation d'une molécule pharmacologique hypométhylante, la zébularine, associée à un phénotypage morphologique et physiologique avec des dosages de phytohormones et de métabolites. Ce travail est présenté sous la forme d'une publication (Genitoni *et al.*, Physiologia plantarum, autorisation de resoumission). Ce travail portant sur l'épigénétique et les phytohormones a été accompagné d'un travail bibliographique et de réflexion qui a été valorisé sous la

Tableau II-1. Fonctions des déméthylases d'ADN dans le développement des plantes (Li *et al.*, 2018)

Demethylase	Plant	Target gene	Function	References
ROS1	*Arabidopsis*	*EPF2*	Stomatal development	Yamamuro et al. (2014)
ROS1, DML2, DML3	*Arabidopsis*	*APOLO*	Auxin-controlled development	Ariel et al. (2014)
DME	*Arabidopsis*	*MEA, FIS2, FWA*	Gene imprinting and embryo development	Choi et al. (2002) Gehring et al. (2006)
DME	*Arabidopsis*	unknown	Pollen germination	Schoft et al. (2011)
TaDME	Wheat	Gliadins, *LMWgs*	Gluten abundance	Wen et al. (2012)
ROS1a	Rice	unknown	Endosperm and embryo development	Ono et al. (2012)
MtDME	Medicago	*NCRs*	Nodule differentiation	Satge et al. (2016)
SlDML2	Tomato	*RIN, NOR, PSY1*	Fruit ripening	Liu et al. (2015) Lang et al. (2017)

forme d'un 'opinion paper' (Maury *et al.*, 2019 ; Frontiers in Plant Science ;https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00395). Cet article supporte l'idée d'une interaction réciproque entre la chromatine et les phytohormones dans le cadre de la plasticité développementale au niveau des méristèmes.

3 - Mettre en place une stratégie originale en épigénomique inspirée des travaux de (Lafon-Placette *et al.*, 2013) et adaptée à la jussie. Ce travail initié à la fin de ma thèse est présenté dans les perspectives de ce chapitre avec les premiers résultats obtenus.

II. État de l'art sur l'épigénétique chez les plantes

L'épigénétique a été définie dans l'introduction générale de la thèse. Dans cette partie, sont présentés brièvement les éléments principaux qui montrent l'importance de ces mécanismes, en particulier la méthylation de l'ADN, dans le développement des plantes et leurs réponses aux changements environnementaux. Cette présentation permettra d'introduire l'article de revue (Marin *et al.*, 2019) qui présente l'état des connaissances et perspectives chez les organismes invasifs.

1. Épigénétique et développement des plantes

Bien que des similarités des mécanismes épigénétiques entre les modèles animaux et végétaux existent, les plantes possèdent des caractéristiques uniques et intéressantes pour l'étude des processus épigénétiques (Heard and Martienssen, 2014). Parmi ces caractéristiques, on peut citer le fait que la lignée germinale des plantes apparaît au cours du développement à partir de cellules somatiques et est soumise à l'environnement. Ainsi, les mécanismes épigénétiques et notamment la méthylation interviennent à chaque étape du développement des plantes : lors de la fécondation et de l'embryogenèse à la germination, en passant par l'activité des méristèmes végétatifs, jusqu'à la floraison (Lebedeva *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2018) (Table II.1).

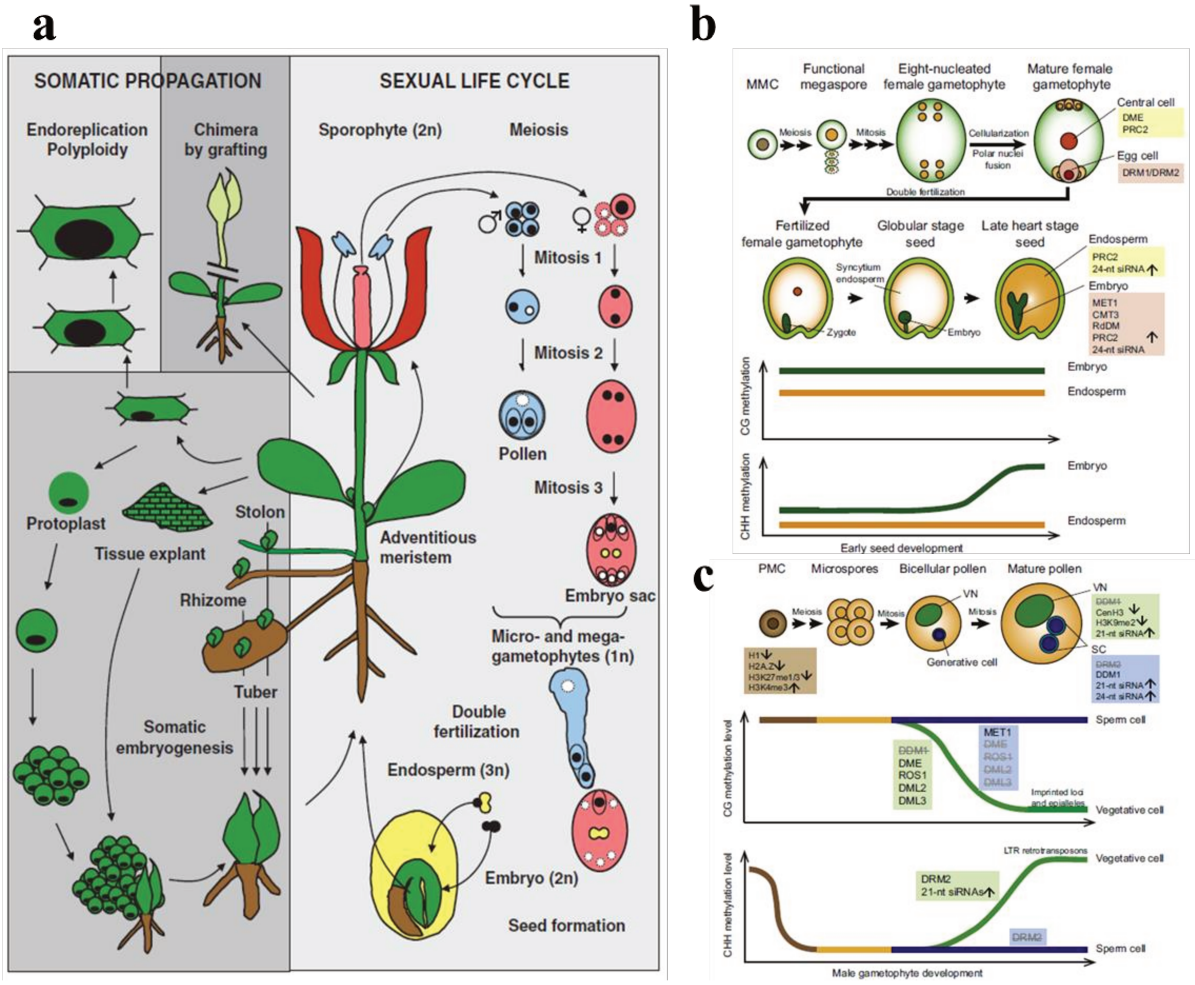


Figure II-1 : Aspect unique du cycle de vie des plantes et variation dans la méthylation au cours du développement des gamétophytes mâle et femelle (Pikaard & Mittelsten Scheid, 2014 ; Hung *et al.*, 2018)

a. Les plantes peuvent se multiplier par la voie sexuée (gamétogenèse, fécondation et formation des graines ; à droite) aussi bien que végétativement (les explants végétatifs, la dédifférenciation cellulaire et la redifférenciation, ou l'embryogenèse somatique ; à gauche).
b et **c** Les plantes forment des gamétophytes mâles ou femelles haploïdes par deux ou trois divisions mitotiques pour former le pollen ou le sac embryonnaire, respectivement. Le grain de pollen contient finalement un noyau végétatif et deux noyaux génératifs. Les deux noyaux génératifs fécondent l'ovule et la cellule centrale, cette dernière ayant un noyau diploïde dérivé de la fusion des deux noyaux polaires. Cette double fécondation donne naissance à un embryon diploïde et à un endosperme triploïde (albumen), ce dernier fournissant une source nutritive pour le développement de l'embryon. Après la germination des graines, l'embryon deviendra un nouveau sporophyte.

1.1.Rôle lors de la reproduction

La floraison, qui précède la fécondation, est sous le contrôle de l'environnement, mais également des mécanismes impliquant la méthylation de l'ADN et des éléments transposables (Lebedeva *et al.*, 2017). Ainsi, contrairement aux animaux, les gamétophytes mâles et femelles sont produits par méiose et continuent à se diviser par mitose deux ou trois fois. En outre, la lignée germinale des plantes est issue d'un développement tardif à partir des cellules méristématiques. Les deux gamétophytes mâles ou femelles haploïdes sont formés par deux ou trois divisions mitotiques pour former le pollen et le sac embryonnaire respectivement (Figure II.1a). Ils sont alors sensibles à l'environnement et peuvent subir des modifications épigénétiques (Pikaard & Mittelsten Scheid, 2014). On constate des différences de niveau de méthylation au cours du développement des gamétophytes. Ainsi, pour le gamétophyte mâle, il y a une perte de méthylation pour le motif CG dû à l'activité des déméthylases dans le noyau végétatif ce qui n'est pas le cas pour le noyau génératif qui maintient son niveau de méthylation CG par la présence de MET1 et l'absence de DME (Figures II.1b et II.1c). La situation est inversée pour les niveaux de méthylation du motif CHH avec une diminution dans le noyau génératif et une augmentation de la méthylation dans le noyau végétatif. Ce processus met aussi en jeu la production de siRNAs. Ainsi, les processus de formation des gamètes et de développement de la graine sont régis par des mécanismes épigénétiques et de changement d'état de la chromatine (Figures II.1b et II.1c) (Hung *et al.*, 2018).

Ainsi Garcia-Aguilar *et al.* (2010) ont montré chez le maïs que l'apomixie est en partie reliée à une sous-expression des gènes de méthyltransferase *DMT102* et *DMT103* qui sont homologues de ceux trouvés chez *Arabidopsis thaliana* , CHROMOMETHYLTRANSFERASE (*CMTs*) et DOMAINS REARRANGED METHYL TRANSFERASE (*DRMs*). Les plantes ont la capacité de se multiplier par voie clonale (apomixie ou multiplication végétative) (Figure II.1). Douhovnikoff & Dodd (2015) questionnent l'épigénétique comme moteur de variabilité chez les plantes clonales. L'apparition de modifications épigénétiques et leur transmission aux générations suivantes semblent plus fréquentes chez les plantes que chez les animaux (Heard and Martienssen, 2014 ; Wibowo *et al.*, 2016 ; Weinhold, 2018). Ainsi, le caractère sessile des plantes tout comme la diversité de leur système de reproduction et de ploïdie, couplé à l'importance des éléments transposables dans leur génome en font des modèles intéressants à étudier au niveau épigénétique (Quadrana & Colot, 2016).

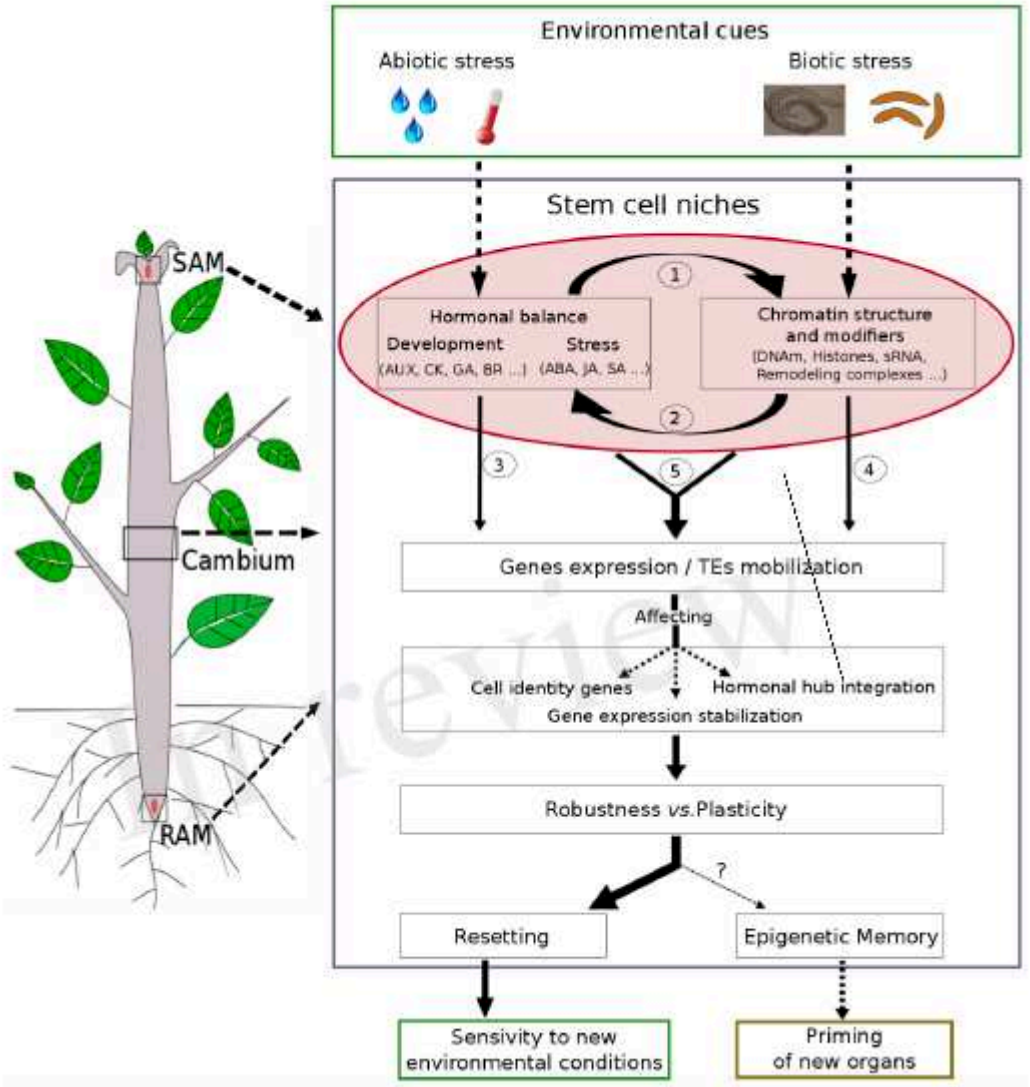


Figure II-2 : Modèle schématique du lien entre phytohormone et chromatine durant la plasticité développementale et la robustesse chez les plantes (Maury *et al.*, 2019).

Les niches de cellules souches des SAM, RAM ou cambium sont le centre de la morphogenèse donnant naissance à des systèmes aériens et racinaires ou à la formation de bois chez les pérennes et de la plasticité en réponse à diverses contraintes environnementales. Les signaux environnementaux sont perçus directement ou indirectement par le méristème et peuvent affecter la balance hormonale et/ou la structure de la chromatine dans une interaction complexe : (1) Les hormones peuvent altérer la structure de la chromatine et ses modificateurs ou (2) la chromatine peut réguler la signalisation et la biosynthèse des hormones. Ces deux mécanismes peuvent alors interagir séparément (3 et 4), conjointement or succéssivement (5) affectant l'expression des gènes et/ou la mobilisation des éléments transposables (TEs). Ainsi, le lien entre hormone et chromatine peut participer dans le choix développemental (Robustesse vs Plasticité) en contrôlant l'identité cellulaire dans le méristème, l'intégration de la balance hormonale ou la stabilité de l'expression de gènes par la chromatine. Alors que la plupart de ces changements sont transitoires (réinitialisation des modifications hormonales et chromatines) permettant à la plante de répondre à de nouvelles conditions environnementales, les états de la chromatine pourraient être maintenus par division cellulaire permettant une mémoire épigénétique et un amorçage potentiel de nouveaux organes dérivés du méristème.

L'empreinte génomique parentale est un phénomène que l'on retrouve chez les animaux et les végétaux et qui conduit, chez un diploïde, à l'expression d'un seul des deux allèles parentaux. Cette "empreinte" dépend des marques épigénétiques que sont la méthylation de l'ADN et celles des histones sur l'un des deux allèles. Ainsi chez les angiospermes, le gène *DME* est exprimé dans le noyau central qui deviendra l'albumen, ce qui engendre une déméthylation du génome maternel tandis que l'allèle paternel reste méthylé et inactif (Kinoshita *et al.*, 2004 ; Jullien *et al.*, 2006 ; Feng *et al.*, 2010 ; Ikeda & Nishimura, 2015 ; Rodrigues & Zilberman, 2015).

1.2.Rôle dans le développement végétatif et l'activité des méristèmes

Lors de la croissance des plantes, les méristèmes apicaux caulinaire et racinaire (SAM et RAM) assurent le développement principal des parties aériennes et racinaires. En réponse à l'environnement, le méristème apical caulinaire alors végétatif devient un méristème dit reproducteur (Xiao *et al.*, 2017). Des interactions complexes entre phytohormones interviennent dans le développement des méristèmes (Gaillochet & Lohmann, 2015 ; Xiao *et al.*, 2017). Derrière ces processus, on retrouve également des mécanismes épigénétiques. L'utilisation de mutants d'*A. thaliana*, ainsi que l'application de phytohormones et d'inhibiteurs de modificateurs de la chromatine ont permis de montrer des liens entre phytohormones et mécanismes épigénétiques (Yamamuro *et al.*, 2016 ; Campos-Rivero *et al.*, 2017 ; Wong *et al.*, 2017 ; Guo *et al.*, 2018 ; Ojolo *et al.*, 2018 ; Wakeel *et al.*, 2018 ; Zheng *et al.*, 2018). Ainsi, les synthèses de Wakeel *et al.* (2018) et Ojolo *et al.* (2018) détaillent dans les premiers la régulation de l'auxine associée à des changements phénotypiques impliquant des acétylations et déacétylations des histones. Dans la seconde revue, les auteurs s'attardent sur le rôle des modeleurs de la chromatine, en particulier ceux de la famille SWI/SNF (switching/sucrose non fermenting) sur les voies de signalisation des phytohormones. D'autres études ont adopté une démarche corrélative pour montrer que des changements de l'épigénome étaient liés à des expressions de gènes particuliers, notamment ceux impliqués dans les voies des phytohormones (Hébrard *et al.*, 2016a ; Lafon-Placette *et al.*, 2018 ; Le Gac *et al.*, 2018 ; Sow *et al.*, 2018). Maury *et al.* (2019) proposent un modèle schématique du lien entre phytohormones et chromatine durant le développement (Figure II.2). Ainsi, les contraintes abiotiques et biotiques sont perçues par le méristème. La balance hormonale et la structure de la chromatine peuvent

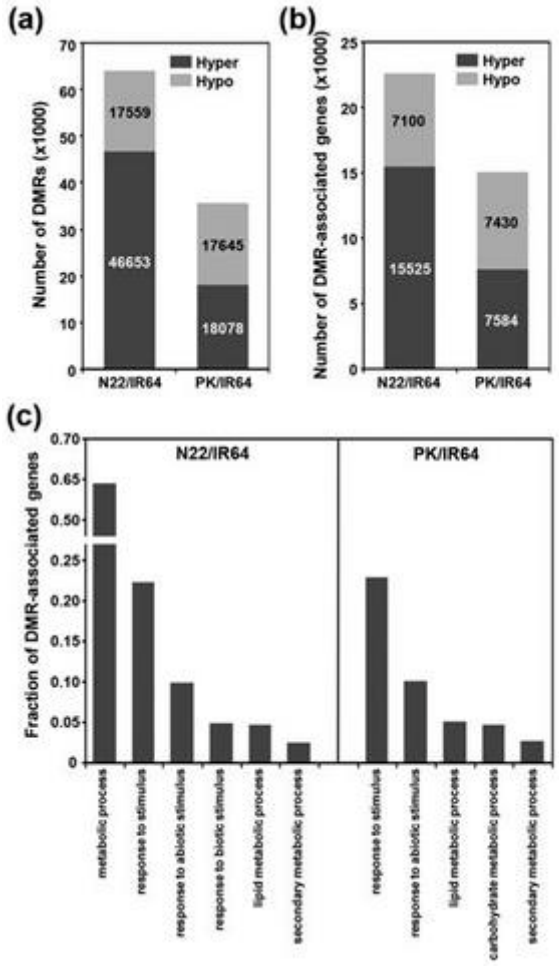


Figure II-3 : Différence de méthylation chez des cultivars de riz (Garg *et al.*, 2015).

(a)Nombre de régions différentiellement méthylées (hyper et hypo) (DMRs) entre IN22 et IR64 (N22/IR64) et Pokkali et IR64 (PK/IR64). (b) Nombre de gènes codant des protéines associées avec des DMRs. Les DMRs présents dans le corps du gène ou les séquences adjacentes de 2kb ont été considérés comme des gènes associés aux DMRs. (c) Catégories de gènes ontologiques (GO) (processus biologique) de façon significative (valeur $p < 0,05$) enrichies dans les gènes associés aux DMRs chez les cultivars de riz. N22 : Nagina 22; PK : Pokkali.

alors être modifiées et interagir de manière complexe pour diriger le développement de la plante. Ces résultats sur le lien entre phytohormone et épigénétique ont fait l'objet d'une synthèse intitulée "Epigenetics and Phytohormone Crosstalk : The Missing Link For Developmental Plasticity?" dont je suis coauteur et présentée ci-après. En conclusion, ces différentes études ont montré que les changements épigénétiques et notamment la méthylation de l'ADN contribuent à modifier l'expression de gènes et à réguler les éléments transposables (Lebedeva *et al.*, 2017). Les changements épigénétiques interviennent pour déterminer l'activité d'un tissu et d'un organe spécifique, régulant ainsi le développement de la plante. Ainsi, il a été noté l'existence de régions différentiellement méthylées entre les tiges et les racines chez *Arabidopsis thaliana* (Widman *et al.*, 2014) chez le peuplier (Vining *et al.*, 2012); entre différents types de feuilles chez le maïs (Lu *et al.*, 2008) et chez *Ilex aquifolium* (Herrera & Bazaga, 2013) ; au cours de la maturation du fruit chez la tomate (Zhong *et al.*, 2013).

2. Épigénétique et environnement

2.1. Réponses des plantes aux contraintes biotiques et abiotiques

Les variations de l'environnement exposent particulièrement les végétaux qui, étant sessiles ne peuvent échapper aux conditions stressantes. Les plantes possèdent divers mécanismes pour répondre et s'acclimater aux stress, parmi ces derniers la méthylation joue un rôle.

Un certain nombre d'études montrent un lien entre la méthylation de l'ADN et des gènes impliqués dans la réponse aux stress biotiques (Dowen *et al.*, 2012 ; Gómez-Díaz *et al.*, 2012) ou abiotiques (Choi & Sano, 2007 ; Bräutigam *et al.*, 2013 ; Meyer, 2015 ; Tricker, 2015 ; Crisp *et al.*, 2016). Ainsi, Choi & Sano (2007) ont utilisé des plants de tabac transgéniques hypométhylés, par l'expression d'un anti-DNA-methyltransférase. Ils ont montré une corrélation entre la méthylation et l'expression d'une protéine glycerophosphodiesterase (NtGPDL), en réponse à une multitude de stress comme les stress aux métaux lourds (aluminium), stress salin, stress thermiques (faible température) ou encore stress biotiques (infection des plantes par un pathogène). Concernant les stress biotiques, Dowen *et al.* (2012) s'intéressent à la réponse des plantes à une infection bactérienne et utilisent des mutants *d'Arabidopsis thaliana* pour la méthylation met1-3 et ddc (drm1-2, drm2-2 et cmt3-11). Ces mutants montrent une plus forte résistance à la colonisation bactérienne. Par ailleurs, la méthylation est impliquée

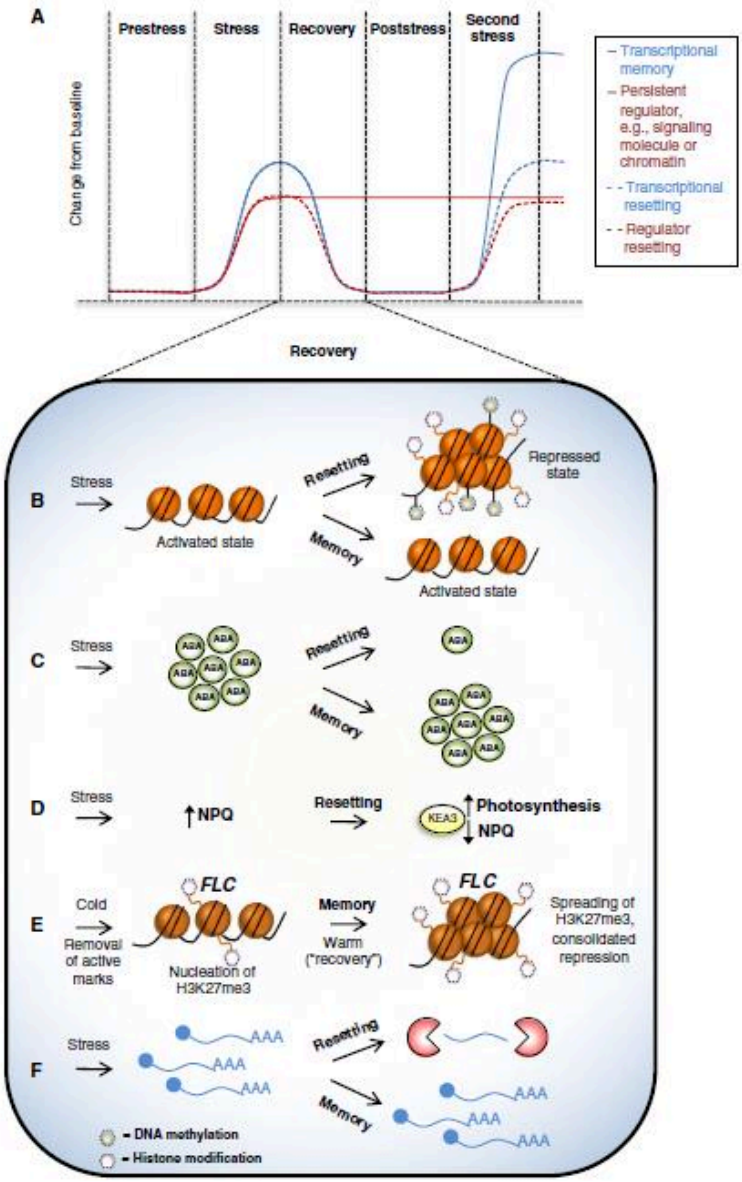


Figure II-4 : La mémoire du stress et les voies moléculaires de récupération. (Crisp *et al.*, 2016).

A) Un exemple théorique de la formation de la mémoire, les transcrits induits par le stress (ligne bleue) répondent au stress initial, simultanément avec les molécules du signal et la chromatine (ligne rouge). Lors de l'exposition à un second stress, les molécules du signal présentes et la conformation de la chromatine conservée (ligne pleine) permettent de répondre au stress. La période de récupération est un moment critique (ligne pointillée) car la mémoire peut être soit supprimée soit conservée lors de cette période. (B)Les changements de la chromatine induits par le stress peuvent être temporaires ou persister pour agir comme une mémoire du stress. (C) Les molécules du signal peuvent faciliter la mémoire car elles peuvent agir pendant le processus de récupération (ABA retarde la reprise de la croissance pour empêcher la réparation de l'embolie). (D)L'activité de KEA5 (antiporteur de potassium) accélère la récupération en relâchant l'activité de NPQ (non photochemical quenching). (E) Répression épigénétique de FLC: elle permet la dispersion de H3K27me3 pendant le retour de la chaleur. (F) La décomposition de l'ARN réduit le taux de transcrits induit par le stress.

dans la réponse au stress salin et à la température chez *A. thaliana* (Boyko *et al.*, 2010 ; Lang-Mladek *et al.*, 2010 ; Bilichak *et al.*, 2012) et aux métaux lourds chez le riz (Ou *et al.*, 2012). L'utilisation de mutants, particulièrement chez *Arabidopsis thaliana,* pour des enzymes clés de la méthylation de l'ADN comme MET1 et DDM1, a permis de mieux comprendre le rôle de la méthylation. La majorité des études ont été menées sur *Arabidopsis thaliana* et ces recherches ont bénéficié de l'évolution des techniques d'analyse de plus en plus puissantes. Ainsi, Song *et al.*, (2012) ont montré sur le soja, par analyse microarray, que 49 facteurs de transcription étaient sensibles au stress salin et que dix d'entre eux étaient surexprimés après un traitement avec un agent hypométhylant. Garg *et al.* (2015) ont quant à eux étudié trois cultivars de riz présentant des sensibilités différentes aux stress salin et hydrique. A travers une approche de séquençage bisulfite et d'un RNA-seq, ils ont cherché à relier le profil de méthylation de l'ADN avec l'expression des gènes. Ils montrent qu'un certain nombre de régions différentiellement méthylées entre les cultivars de riz N22, Nagina et PK Pokkali sont associées à des gènes impliqués dans la réponse aux stress (Figure II.3).

2.2.Mémoire des stress

L'épigénétique peut être un moyen pour les organismes d'ajuster leur phénotype en réponse à des contraintes environnementales à travers une réponse rapide et transitoire avec notamment ce qu'on appelle le « priming ». Le priming est défini comme étant une stratégie adaptative consistant à améliorer la capacité des plantes à se défendre contre un stress récurrent (Tricker, 2015; Crisp *et al.*, 2016) (Figure II.4). Autrement dit, c'est le phénomène qui inclut la mémoire des stress en lien avec l'acquisition d'une meilleure tolérance à ce stress récurrent. Dans ce processus, Crips *et al.* (2016) décrivent les différents processus impliqués dans la mémoire du stress comme l'état de la chromatine, la présence et l'accumulation de molécules signales (phytohormones), l'activité enzymatique, la régulation des ARN et évidemment les facteurs épigénétiques. Il a été montré qu'une plante ayant déjà subie une contrainte biotique ou abiotique sera plus apte à répondre à un second stress, grâce notamment à des mécanismes de mémoire épigénétique (Lämke & Bäurle, 2017 ; Mauch-Mani *et al.*, 2017 ; Baier *et al.*, 2019 ; Gully *et al.*, 2019).

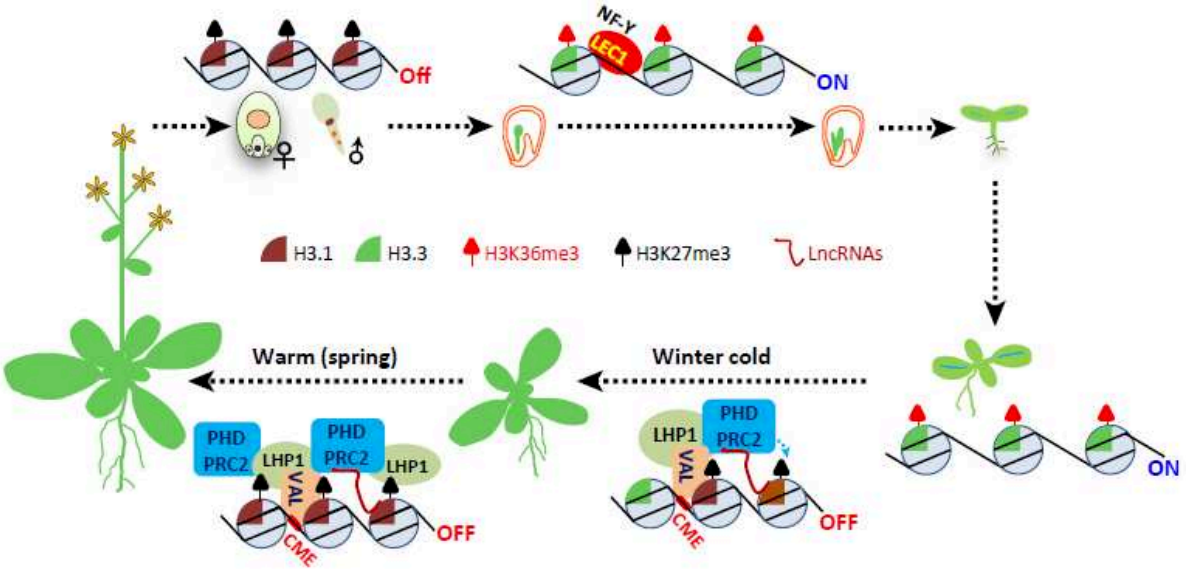


Figure II-5 : Contrôle du locus FLC médié par le froid et des mécanismes épigénétiques (He & Li, 2018)

Avant l'exposition au froid en hiver, la chromatine FLC porte des marques actives (p. ex., H3K36me3) et FLC est fortement exprimé dans les jeunes plantules pour permettre la croissance végétative. Le froid hivernal (vernalisation) déclenche le dépôt médié par le PHD-PRC2 du H3K27me3 répressif sur la variante histone H3.1 dans la région de nucléation portant le cold memory element (CME) pour réprimer l'expression FLC. VAL1 et VAL2 reconnaissent spécifiquement et se lient à CME et recrutent LHP1 et PHD-PRC2, en outre, lncRNAs incluant COLDAIR et COLDWRAP peuvent fonctionner de concert avec le module de régulation CME-VAL1/2 pour engager PHD-PRC2 pour la répression transcriptionnelle. Après un retour aux températures chaudes, le H3K27me3 est répandu à travers le locus FLC à travers les divisions cellulaires et la répression de FLC est maintenue de manière stable durant la croissance et le développement. Peu après la fécondation, le facteur de transcription des facteurs nucléaires Y (NF-Y), LEC1 NF-Y spécifique à la graine reprogramme ou réactive l'expression du FLC dans le préembryon. L'état de chromatine embryonnaire active est transmis à la vie post-embryonnaire et soutenu par les divisions cellulaires (en présence de modificateurs actifs de la chromatine) dans les plantules.

Selon Lamke & Baurle (2017), après qu'un organisme, ici une plante, a subit une première contrainte environnementale (priming), la plante pourra lors d'un second stress, réagir soit plus vite, soit plus fort ou encore être plus sensible. Cette réponse peut durer quelques jours, on parle alors de mémoire somatique du stress, ou plus longuement à travers plusieurs générations, on décrit alors des mémoires inter et transgénérationnels.

3. Implication dans la vernalisation

Une multitude d'études a montré l'implication des mécanismes épigénétiques dans la vernalisation, terme décrivant le processus qui promeut la floraison après une période de froid prolongée. La vernalisation et son gène central (*FLC*) sont ainsi devenus l'exemple clé de mécanisme épigénétique en lien avec le développement, la réponse à un changement environnemental et la mémoire épigénétique (Song *et al.*, 2012a ; Whittaker & Dean, 2017). Une première étude est celle de Burn *et al.* (1993) qui a traité une plante, *Thlaspi arvense*, avec une drogue hypométhylante, la 5-azacytidine. Ce composé est un analogue à la cytidine et agit comme un inhibiteur des méthyltransférases, engendrant une hypométhylation du génome. Les plants de *Thlaspi arvense* ainsi traités ont fleuri précocement sans vernalisation. De même, le froid induit une hypométhylation du génome et l'étude de mutants pour le gène codant l'ADN méthyltransférase *MET1* présente également une floraison précoce ce qui suggère que la déméthylation permet la floraison (Ronemus *et al.*, 1996). Cependant, le locus central de la vernalisation (*FLC*) n'est la cible d'aucune variation de méthylation lors de la vernalisation, ce qui a réorienté les travaux de recherche vers les modifications d'histones (Finnegan *et al.*, 2005).

Durant le processus de vernalisation, le froid induit l'expression du gène *VIN3* qui va engendrer la désacétylation des histones H3 du gène *FLC* (Figure II.5). Lorsque la période de froid persiste, l'expression du gène *VIN3* va engendrer le recrutement de la protéine VRN2. Cette dernière va méthyler les histones H3 et inhiber le gène *FLC* qui réprime de manière constitutive la floraison. La durée de la période de froid est mise en mémoire de manière quantitative, jusqu'à l'embryogenèse où la réactivation du gène *FLC* remet à zéro la vernalisation(Baulcombe and Dean, 2014; Whittaker and Dean, 2017; Itabashi *et al.*, 2018)

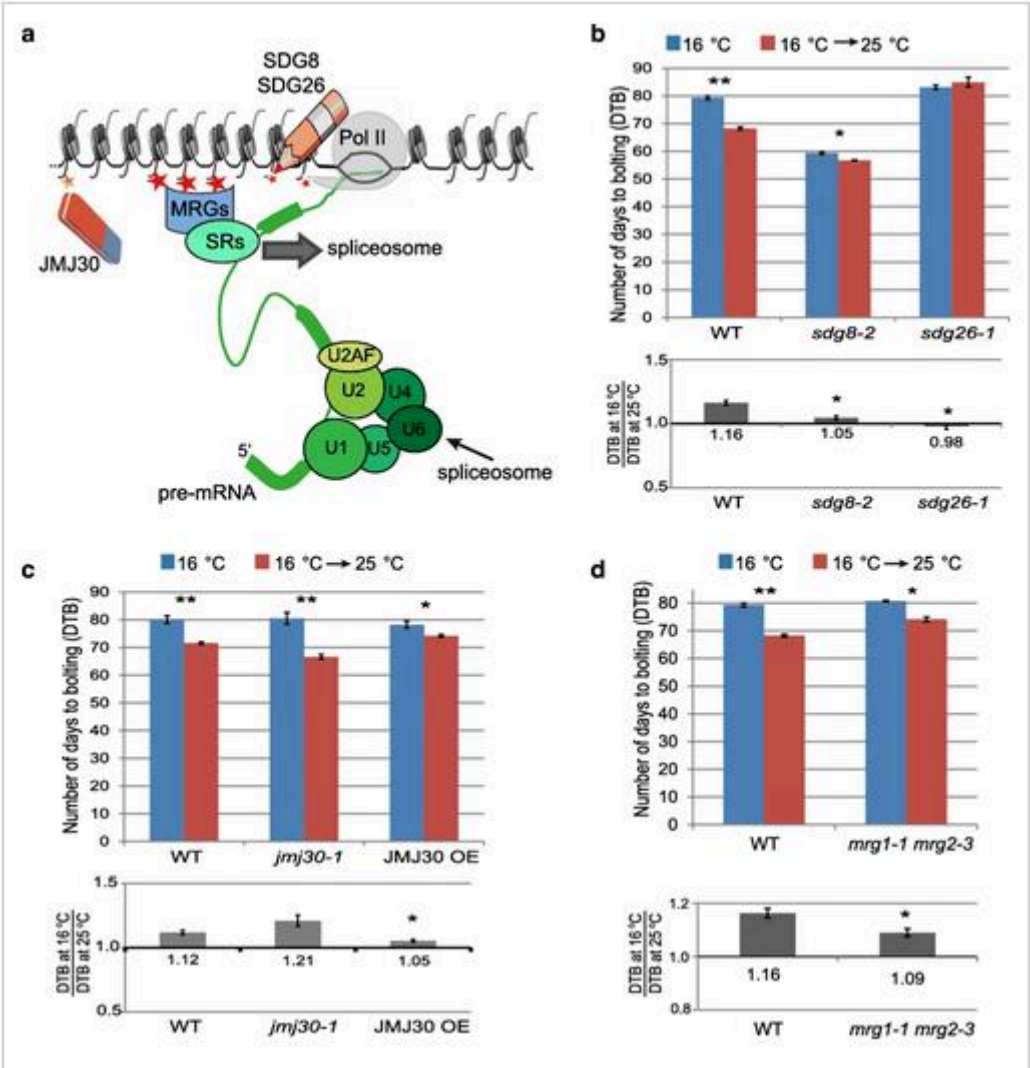


Figure II-6 : : La floraison induite par la température est compromise chez les mutants H3K36me3 (Pajoro *et al.*, 2017).

a La figure illustre la régulation du H3K36me3 et l'épissage selon le modèle complexe de l'adaptateur chez *Arabidopsis.* Les histones modifiés H3K36me3 sont liés par un adaptateur, tel que MRG1 et MRG2, qui interagit avec les régulateurs d'épissage (SR), comme les PTB. Les régulateurs d'épissage agissent dans la promotion ou la prévention d'AS. **b** Temps de floraison des plantes WT, sdg8-2 et sdg26-1 qui poussent à 16 °C ou qui passent à 25 °C après cinq semaines. Dans l'histogramme supérieur, le temps de floraison est exprimé en nombre de DTB. Dans l'histogramme inférieur, le rapport de DTB entre les deux conditions est montré. Chez les plantes à faible niveau de H3K36me3, la floraison n'est pas favorisée par une température plus élevée. ** indique des différences significatives avec des p value < 0.001 et * indique p value < 0.05 selon le t-test de Student. **c** Le temps de floraison des plantes WT, *jmj30-1*, et *JMJ30-OE* est montré comme dans (**b**). la perte de JMJ30 augmente la réponse à la floraison induite par la température, tandis qu'une augmentation de l'activité de JMJ30 provoque un effet opposé. **d** Temps de floraison des plantes WT, mrg1-1 mrg2-3 sont montrés comme en b). Les plantes mrg1-1 mrg2-3 sont moins sensibles à la température.

Bastow *et al.* (2004) et Pajoro *et al.* (2017) montrent chez de nombreuses plantes, le contrôle de la floraison par l'environnement, *via* des mécanismes épigénétiques concernant la méthylation des histones. Ainsi, Pajoro *et al.* (2017) s'intéressent à une modification d'un histone qui impacte le "splicing" alternatif d'un ARN messager et *in fine* le temps de floraison, le tout sous contrôle de la température (Figure II.6). Plus récemment, il a été montré que le gène *FLC* est régulé par une catégorie de long ARN non codant (IncRNAs) dont *COOLAIR*, *COLD ASSISTED INTRONIC NONCODING RNA* (*COLDAIR*) et *COLDWRAP*. *COOLAIR* est un transcrit anti-sense du gène *FLC* et est induit par le froid ce qui contribue à la répression du gène *FLC* (Tian *et al.*, 2019). Ces exemples montrent le lien étroit entre le développement et l'environnement chez les plantes.

Le processus de vernalisation a également été étudié chez d'autres espèces végétales d'intérêt agronomique comme les céréales et la betterave sucrière. Bien qu'il y ait un contrôle épigénétique chez toutes ces espèces, il semble avoir évolué indépendamment de celui d'*Arabidopsis* en lien avec des caractéristiques spécifiques de la floraison de ces différentes espèces. Par exemple, chez la betterave sucrière, il a été montré que plusieurs loci importants de la floraison étaient affectés directement par la méthylation de l'ADN et que la sensibilité génotypique était également contrôlée par des modifications épigénétiques (Trap-Gentil *et al.*, 2011 ; Hébrard *et al.*, 2013 ; Shrestha *et al.*, 2014 ; Hébrard *et al.*, 2016b)

4. Épigénétique, plasticité phénotypique et adaptation

4.1.Epigénome et plasticité

La plasticité phénotypique est la capacité pour un génotype d'exprimer différents phénotypes en fonction de l'environnement. Cette dernière peut être adaptative lorsque l'environnement change la distribution des phénotypes vers l'optimum local (Ghalambor *et al.*, 2007). Compte tenu de la relation existant entre épigénétique et plasticité phénotypique, certaines études se sont intéressées au lien entre ces deux concepts (Baulcombe and Dean, 2014; Kooke *et al.*, 2015). D'autres études ont révélé que des environnements stressants induisent chez les plantes des changements épigénétiques pouvant conduire à des changements phénotypiques et des réponses adaptatives (Cubas *et al.*, 1999; Kooke *et al.*, 2015; Meyer, 2015 ; Conde *et al.*, 2017 ; Seymour and Becker, 2017 ; He and Li, 2018 ; Lafon-Placette *et al.*, 2018).

Les modifications épigénétiques, engendrées par l'environnement, permettent à un organisme une meilleure survie et d'exprimer une plus grande plasticité. Ainsi, Zhang *et al.* (2013) travaillent sur des lignées epiRILS chez *Arabidopsis thaliana*, lignées qui ne diffèrent que par les zones méthylées de l'ADN, et étudient leurs réponses face à la sécheresse et à l'augmentation des nutriments. Leurs résultats montrent des variations parmi les epiRILs sur des traits phénotypiques importants tels que le ratio de la biomasse sèche entre racine et tige, ce qui suggère un lien étroit entre plasticité phénotypique et mécanismes épigénétiques. Kooke *et al.* (2015) ont étudié 99 epiRIL d'*A. thaliana* et leurs parents Col-0 et ddm1-2 sous stress salin. Ils ont montré que l'hypométhylation de l'ADN engendre des plantes plus sensibles au stress appliqué. En outre, ils ont identifié des QTLs (locus de caractères quantitatifs) associés aux traits morphologiques (ramification et surface foliaire) et des QTLs associés à la plasticité phénotypique. Ces deux types de QTL colocalisent ce qui suggère l'existence d'un effet pléiotropique entre eux. Les processus dans lesquels sont impliqués les marques épigénétiques, et leur caractère réversible, rapide et parfois transgénérationnel, ont conduit les chercheurs à se poser la question de l'implication de l'épigénome comme source d'adaptation rapide (Henderson & Jacobsen, 2007 ; Kawakatsu *et al.*, 2016 ; Weinhold, 2018 ; Thiebaut *et al.*, 2019).

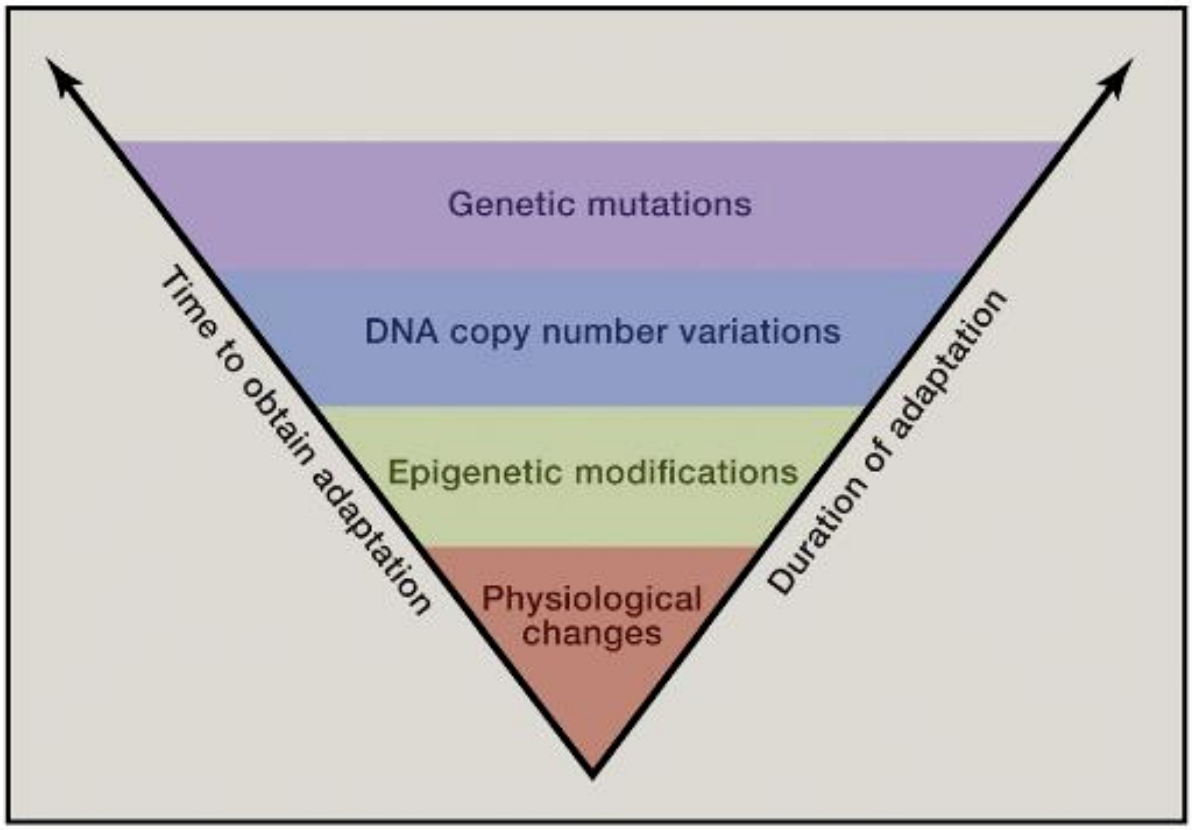


Figure II-7 : Les différents niveaux de l'adaptation selon Yona *et al.* (2015).

Deux temporalités caractérisent les différents niveaux d'adaptation : le temps nécessaire à l'acquisition de l'adaptation (axe de gauche) et le temps pour que cette adaptation soit maintenue en l'absence des conditions requises pour l'adaptation. Les adaptations physiologiques consistent en des changements de l'homéostasie biochimique, et donc leur durée dépend de la durée de vie des biomolécules qui sous-tendent l'adaptation, comme les ARNm, les protéines, etc. Les modifications épigénétiques se produisent généralement dans la même génération que l'expérience du déclencheur, mais leur durée dépend du type de mécanisme épigénétique, p. ex., méthylation de l'ADN, modification de la chromatine, prions, etc. (revu par Rando et Verstrepen, 2007). Les dédoublements génomiques comprennent les dédoublements segmentaires et l'aneuploïdie résultant d'erreur dans la ségrégation chromosomique au cours du cycle cellulaire, ce qui entraîne des changements bruts dans l'expression génétique de la région dupliquée. Les mutations génétiques sont des modifications fonctionnelles de la séquence codante ou des régions régulatrices de gènes qui modifient leur fonction ou leur expression.

4.2.Epigénome et adaptation

L'épigénétique intervient donc dans des processus de réponse à l'environnement et de mémoire des stress notamment à travers la plasticité phénotypique. La question du rôle de l'épigénétique dans l'adaptation se pose. En effet, l'adaptation reflète les changements morphologiques, physiologiques d'un individu qui permettent à une population ou espèce de persister dans le temps à travers des mécanismes génétiques et non génétiques (Yona *et al.*, 2015). Ces auteurs distinguent ainsi deux temporalités dans l'adaptation. La première correspond au temps nécessaire à l'acquisition qui est rapide pour des changements physiologiques impliquant des protéines et des ARNm et plus long concernant les mutations génétiques. La seconde temporalité est le temps pour que l'adaptation soit maintenue. Ainsi les changements physiologiques ne perdurent que lorsque la contrainte est là, alors que les mutations génétiques sont aisément transmises à la descendance pour peu que les cellules germinales soient touchées et perdurent dans le temps (Figure II.7). Les mécanismes épigénétiques sont difficiles à placer sur ces deux temporalités. En effet, l'héritabilité des marques épigénétiques par mitose et/ou par méiose est centrale pour déterminer l'importance que peut avoir l'épigénétique dans l'adaptation. Il reste maintenant à savoir si des modifications épigénétiques induites par l'environnement peuvent se transmettre sur plusieurs générations.

Lämke & Bäurle, (2017) font la distinction entre les modifications inter et transgénérationnelles. Dans le premier cas, l'environnement du parent peut affecter directement les cellules germinales de la progéniture. Dans le second cas, un effet transgénérationnel est défini si, à partir d'une lignée germinale de la génération F2 qui n'a pas été exposée à la contrainte environnementale étudiée, on retrouve des effets à la troisième génération (F3) et éventuellement aux générations futures. Ainsi, Wibowo *et al.* (2016) ont étudié, chez *A. thaliana*, l'effet du stress osmotique sur plusieurs générations. Ils montrent qu'il y a transmission d'une mémoire du stress par la lignée germinale femelle sur une génération. En effet, via l'utilisation de mutant pour le gène DEMETER (DME) ils montrent que l'activité d'une ADN glycosylase dans la lignée germinale mâle engendre une reprogrammation épigénétique. Cette transmission est perdue dès lors que le stress n'est pas maintenu. C'est donc un cas de mémoire intergénérationnelle, celle-ci étant ici liée à la méthylation de l'ADN. Les études réalisées par Reinders

Tableau II-2. Les effets du stress héritable sur la stabilité du génome et de l'épigénome des plantes. (Hauser *et al.*, 2011)

Plant species	Growth conditions	Read-out	Effect	Number of generation	Reference
Maize	Biotic and abiotic stress	Transposon activation	Corn pigmentation, variegation		[47]
Tobacco	Infection with tobacco mosaic virus, oilseed rape mosaic virus	Homologous recombination	Increased frequency of homologous recombination	One generation after infection	[145]
Arabidopsis	UV-C flagellin	Transgenic lines for histochemical visualization of homologous recombination	Homologous recombination increases	Four generations after stress exposure	[48]
Tobacco	Tobacco mosaic virus infection		Increased homologous recombination, global hypermethylation, local hypomethylation, increased resistance to viral, bacterial and fungal pathogenes	One generation after infection	[149,188]
Arabidopsis	10 different physical and chemical stress treatments on in vitro cultivated seedlings	Two independent homologous recombination reporter lines	Homologous recombination increased mostly in the stressed generation, highest response by compounds that modify or damage DNA	One generation after stress with mannitol, heat, paraquat, zebularin, UV-C, bleomycin, two generations after stress with mannitol, zebularin, UV-C, NaCl	[51]
Arabidopsis	Heat, cold, UV-B on soil cultivated 2–3 week old plants	Reactivation of transcriptionally silenced (TS-GUS) reporter line, activation of retrotransposons	Increased frequency of TS-GUS reactivation, increased transcription of retrotransposons	Frequency of TS-GUS reactivation increased in two generations after stress exposure, inherited through both alleles and in trans, counterbalanced by seed aging	[50]
Arabidopsis	NaCl, $MgCl_2$ KCl with in vitro cultivated seedlings	Homologous recombination reporter lines	Increased frequency of homologous recombination	One generation after stress exposure, higher tolerance to NaCl and genotoxic (methyl methane sulfate) treatments	[186]
Arabidopsis, *dcl2*, *dcl3*, *dcl4*	NaCl, UV-C, cold, heat flooding	Homologous recombination	Higher homologous recombination frequency, increased global genome	One generation, increased homologous recombination of the progeny of UV-C	[202]
Arabidopsis	Heat, cold	Fitness (seed production per individual)	Increased fitness upon heat exposure	Two generations after heat exposure	[189]
Arabidopsis	UV-C, heat, cold, drought, flood	Marker lines for homologous recombination, point mutation, small deletions	Increased frequency of homologous recombination after heat, cold, flood and UV-C stress – but not drought	First generation after UV-C frequency of homologous recombination increased	[236]
Dandelions (apomictic) *Taraxacum officinale*	Low nutrients, NaCl, jasmonic acid, salisylic acid	DNA methylation, MS-AFLP	Highly significant methylation changes (gain and loss) at AFLP markers upon SA treatment, lower significance for the other treatments	One generation after stress exposure	[187]

et al (2009) et Johannes et al (2009), avec des lignées epiRILS d'un croisement impliquant un mutant ddm1 ou met1 avec le type sauvage chez *A. thaliana*, montrent une stabilité des marques de méthylation de l'ADN durant près de 8 générations. En outre, ces différences de profil de méthylation entre lignées étaient corrélées à des traits comme la floraison ou la résistance à des pathogènes. Le gène FWA (FLOWERING WAGENINGEN) est méthylé chez le type sauvage, mais déméthylé chez *met1-3* provoquant un retard dans la floraison chez le mutant. Hauser *et al.* (2011) listent ainsi dans un tableau les différentes études montrant des effets transgénérationnels liés au stress (Table II.2). Parmi celles-ci, on constate que les descendants, dont le parent a subi un stress, sont plus tolérants à ce stress et présentent des modifications de profil de méthylation. On peut également citer Alsdurf *et al.* (2016) qui ont étudié la plante pérenne *Boechera strictaune.* Ils ont montré une meilleure tolérance à la sécheresse chez des descendants issus de plantes ayant subi le stress et cela en lien avec la méthylation. Néanmoins, tout comme chez Wibowo *et al.* (2016), les modifications épigénétiques s'estompent après quelques générations. Parfois ces modifications perdurent durant près de 9 générations comme c'est le cas dans l'étude de Akimoto *et al.* (2007). Dans cette étude, des graines de riz ont été traitées avec un agent chimique hypométhylant, la 5 azadeoxycytidine, et après 9 générations, des gènes restent hypométhylés et activés, ces derniers conférant une résistance à une souche de Xanthomonas. La mémoire des stress, à travers des mécanismes épigénétiques, permet alors un meilleur ajustement de l'organisme aux contraintes biotiques et abiotiques sur des temps plus ou moins longs. En outre, chez *A. thaliana,* la fréquence des épimutations a été estimée à $4{,}46\times10^{-4}$ Single Methylation Polymorphisms (SMP) par site CG pour une génération, contre une fréquence de 7×10^{-9} mutation par site CG et par génération (Ossowski *et al.*, 2010 ; van der Graaf *et al.*, 2015). De plus en plus de preuves s'accumulent et montrent que les marques épigénétiques peuvent être transmises à travers les générations. Si la capacité des modifications épigénétiques à se transmettre à la descendance est importante pour jouer un rôle dans l'adaptation, leur caractère réversible permet un ajustement aux conditions environnementales.

Pour évaluer la contribution de l'épigénétique à l'adaptation, Schmid *et al.* (2018) ont étudié chez *A. thaliana,* 17 RILs et leurs deux parents, après 5 générations mimant la sélection. Suite à la sélection, deux génotypes dominaient la population. Ils ont ensuite comparé les traits phénotypiques et

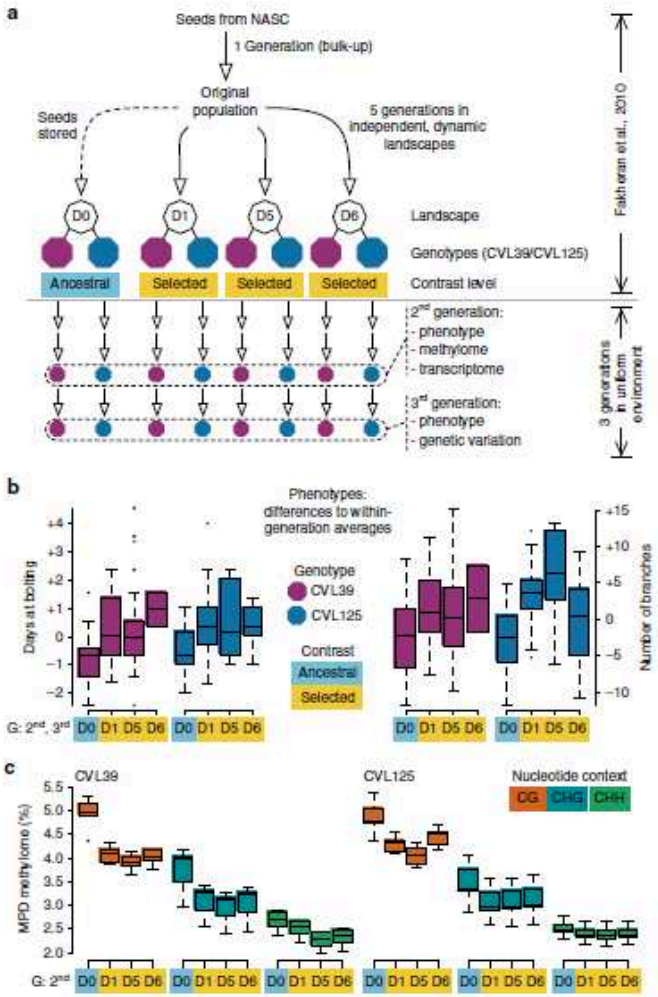


Figure II-8 : Design expérimental utilisé pour démontrer les traits adaptatifs et la diversité épigénétique réduite après la sélection. (Schmid *et al.* 2018).

a. une représentation schématique de la conception expérimentale. La population originale se composait de 19 génotypes également représentés mis en culture dans un environnement sélectif durant 5 générations. Deux génotypes (Rils CVL39 et CVL125) ont dominé les populations sélectionnées et ont été utilisés dans cette étude.
Les descendants provenant de la population originale (D0) et de populations sélectionnées (provenant de trois expériences indépendantes, c'est-à-dire des paysages D1, D5, etD6) ont été cultivés pendant trois générations dans un environnement non sélectif (conditions contrôlées et emplacements aléatoires des plantes). Les phénotypes ont été mesurés dans la deuxième et la troisième génération. Méthylome et transcriptome ont été profilés dans la deuxième génération. Les génomes ont été séquencés à la troisième génération. b Comparaison des caractères phénotypiques de la descendance des populations ancestrales (D0) et sélectionnées (D1/D5/D6). Dans la deuxième et troisième génération, le temps de floraison a été considérablement retardé et le nombre d'inflorescences secondaires a été considérablement augmenté dans le sélectionné par rapport à la population ancestrale (données supplémentaires 1). Pour montrer les deux générations à la fois, les chiffres indiqués sont des différences par rapport aux moyennes pour toutes les populations d'ungénotype au sein d'une génération donnée. c La distance moyenne de paires (MPD) dans les modèles de méthylation de l'ADN entre les individus d'une population donnéereflète la diversité épigénétique au sein de la population. Dans la deuxième génération, la diversité épigénétique était constamment plus élevée dans les populations ancestrales(D0) par rapport aux populations sélectionnées (D1/D5/D6)

la variation épigénétique de ces différentes populations durant trois générations sans sélection (Figure II.8). Des traits phénotypiques comme la montaison et le nombre de ramettes étaient moins importants chez la population ancestrale et ceci a été corrélé à une diminution de la diversité épigénétique. Ces différences sont conservées durant 3 générations sans sélection. Ces résultats suggèrent que l'épigénétique peut être sujette à la sélection et contribuer à une réponse adaptative rapide. Le projet « 1001 epigenomes [9]» chez *A. thaliana* montre que la méthylation de l'ADN est corrélée avec les données géographiques et climatiques ce qui suggère une adaptation locale (Kawakatsu *et al.*, 2016).

Les modifications épigénétiques et les éléments transposables sont sensibles à l'environnement et semblent jouer un rôle dans la plasticité phénotypique et l'adaptation des plantes aux changements climatiques (Rey *et al.*, 2016). Compte tenu des arguments cités précédemment, Rey *et al.* (2016) mettent en perspective ces questions et proposent d'intégrer les éléments transposables et les marques épigénétiques comme deux composantes sensibles à l'environnement et qui peuvent permettre à un organisme d'exprimer une plus grande plasticité et de s'adapter aux changements globaux. Dans le sillage de Rey *et al.* (2016), nous avons posé la même question dans le contexte des invasions biologiques donnant lieu à la publication intitulée et présentée ci-après "Biological Invasion: The Influence of the Hidden Side of the Epi/Genome" (Marin/Genitoni *et al.*, 2019).

[9] Le projet 1001 epigénomes est une composante du projet 1001 génomes lancé en 2008. Ce dernier vise à produire des ressources génomiques, transcriptomiques et épigénomiques sur plusieurs milliers (1001) d'accessions de l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* (Kawakatsu *et al.*, 2016).

5. Épigénétique, une source de flexibilité chez les espèces invasives

5.1. Présentation synthétique de la publication Marin/Genitoni *et al.* 2019

Une espèce invasive a dû, par définition, coloniser de nouveaux milieux et s'adapter rapidement à de nouvelles contraintes environnementales. Les scientifiques ont longtemps vu le succès des invasions biologiques comme un paradoxe. L'effet de goulet d'étranglement subi par la population devrait engendrer une réduction de son potentiel adaptatif. Parmi les hypothèses pouvant expliquer l'invalidité de ce paradoxe, on retrouve notamment les mécanismes épigénétiques (Estoup *et al.*, 2016 ; Stapley *et al.*, 2017). Comme nous l'avons vu précédemment, l'épigénétique est un moyen pour un organisme d'exprimer une plus grande plasticité. Cette dernière fait partie intégrante des nombreux déterminants qui interviennent dans la réussite d'une invasion biologique. On retrouve l'idée communément admise que ces espèces invasives possèdent une plasticité phénotypique plus importante que les espèces dites natives (Davidson *et al.*, 2011 ; Ghalambor *et al.*, 2007).

Nous avons cherché à comprendre les mécanismes régissant les invasions biologiques et leur adaptation rapide à de nouveaux milieux. Deux mécanismes ont été étudiés : les éléments transposables et les modifications épigénétiques. En effet, les liens entre invasions biologiques, plasticité phénotypique, épigénétique et éléments transposables n'étaient pas clairement synthétisés dans la littérature existante et nous avons valorisé ce travail bibliographique sous la forme d'un article de synthèse intitulé "Biological invasion: The influence of the hidden side of the (epi)genome" publié dans Functional Ecology.

Dans le sillage de Prentis *et al.* (2008), Rey et al (2016) et Vogt, (2017), nous posons l'hypothèse d'un rôle primordial des éléments transposables et des mécanismes épigénétiques dans le succès des invasions biologiques. Ces processus sont encore trop peu étudiés chez les espèces invasives. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux éléments transposables. Nous avons repositionné leur rôle et comment ils sont régulés dans le génome. Puis, nous nous sommes attardés sur la manière dont ils interagissent avec l'environnement et notamment les stress abiotiques et biotiques. Et enfin, nous

avons regardé leur intégration dans le contexte des invasions biologiques. Dans un second temps, nous avons fait l'état de l'art des mécanismes épigénétiques comme composante de la réponse aux changements environnementaux et en particulier chez les espèces invasives. Dans un dernier temps, nous avons discuté des limites des études et des défis à relever.

5.2.Publication Marin/Genitoni *et al.* (2019) (Functional Ecology)

Received: 2 July 2018 | Accepted: 7 February 2019

DOI: 10.1111/1365-2435.13317

Functional Ecology | BRITISH ECOLOGICAL SOCIETY

EPIGENETICS IN ECOLOGY AND EVOLUTION – A PRIMER

Biological invasion: The influence of the hidden side of the (epi) genome

Pierre Marin[1*] | Julien Genitoni[2,3*] | Dominique Barloy[2] | Stéphane Maury[3] | Patricia Gibert[1] | Cameron K. Ghalambor[4] | Cristina Vieira[1]

[1]Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR 5558, CNRS, Université Lyon 1, Université de Lyon, Villeurbanne, France

[2]ESE, Ecology and Ecosystem Health, Agrocampus Ouest, INRA, Rennes, France

[3]LBLGC EA 1207, INRA, Université d'Orléans, USC 1328, Orléans, France

[4]Department of Biology and Graduate Degree Program in Ecology, Colorado State University, Fort Collins, Colorado

Correspondence
Cristina Vieira
Email: cristina.vieira@univ-lyon1.fr

Funding information
Institut National de la Recherche Agronomique; Région Bretagne, France; Fondation Rovaltain; National Science Foundation, Grant/Award Number: IOS-1457383; Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: SWING; Université Claude Bernard Lyon 1

Handling Editor: Anthony Herrel

Abstract

1. Understanding the mechanisms underlying biological invasions and rapid adaptation to global change remains a fundamental challenge, particularly in small populations lacking in genetic variation. Two understudied mechanisms that could facilitate adaptive evolution and adaptive plasticity are the increased genetic variation due to transposable elements (TEs), and associated or independent modification of gene expression through epigenetic changes.
2. Here, we focus on the potential role of these genetic and non-genetic mechanisms for facilitating invasion success. Because novel or stressful environments are known to induce both epigenetic changes and TE activity, these mechanisms may play an underappreciated role in generating phenotypic and genetic variation for selection to act on. We review how these mechanisms operate, the evidence for how they respond to novel or stressful environments, and how these mechanisms can contribute to the success of biological invasions by facilitating adaptive evolution and phenotypic plasticity.
3. Because genetic and phenotypic variations due to TEs and epigenetic changes are often well regulated or "hidden" in the native environment, the independent and combined contribution of these mechanisms may only become important when populations colonize novel environments. A focus on the mechanisms that generate and control the expression of this variation in new environments may provide insights into biological invasions that would otherwise not be obvious.
4. Global changes and human activities impact on ecosystems and allow new opportunities for biological invasions. Invasive species succeed by adapting rapidly to new environments. The degree to which rapid responses to environmental change could be mediated by the epigenome—the regulatory system that integrates how environmental and genomic variation jointly shape phenotypic variation—requires greater attention if we want to understand the mechanisms by which populations successfully colonize and adapt to new environments.

KEYWORDS
adaptation, biological invasion, epigenetics, phenotypic plasticity, transposable elements

*Equally contributed.

© 2019 The Authors. Functional Ecology
© 2019 British Ecological Society

1 | INTRODUCTION

In the face of current and future environmental changes, there are two possible outcomes for surviving organisms: to shift their geographical range or to adapt (Aitken, Yeaman, Holliday, Wang, & Curtis-McLane, 2008). Dispersal to more suitable geographical areas is possible for some organisms but can be challenging for others depending on the mode of dispersal. Adapting to new environments can occur either through adaptive phenotypic plasticity or through adaptive evolution. Phenotypic plasticity is defined as the ability for a genotype to express several phenotypes according to different environmental cues and is adaptive when the environment shifts the distribution of phenotypes towards the local optimum (Ghalambor, McKay, Carroll, & Reznick, 2007). Such plastic responses represent the initial morphological, physiological or behavioural response to environmental change (Pigliucci, Murren, & Schlichting, 2006). Evolutionary responses occur across generations, and the rate at which populations can evolve is predicted to be a function of the strength of selection and the amount of standing genetic variation (e.g., Lande & Arnold, 1983). Adaptive plasticity has been proposed as one mechanism allowing for populations to colonize and persist in new environments (Davidson, Jennions, & Nicotra, 2011; Ghalambor et al., 2007; Richards, Bossdorf, Muth, Gurevitch, & Pigliucci, 2006). Yet, invasive populations also pose an interesting dilemma in that they often display evidence of rapid adaptive evolution despite lacking genetic variation; thus, invasive populations constitute good models to tackle the questions related to the mechanisms that contribute to adaptive plasticity and evolution (Simberloff & Rejmanek, 2011). A biological invasion can be defined as the success of a species to establish, develop and maintain populations outside its geographical area of origin (Theoharides & Dukes, 2007; Figure 1). The development of international trade and intercontinental transportation has accelerated the movement of non-native species to new habitats (Early et al., 2016). These non-native species can cause damage to ecological systems (e.g., Lodge, 1993), human health and economy (e.g., Pimentel et al., 2001). Biological invasions also represent "natural experiments" for evolutionary biologists, allowing investigation of evolutionary processes in real-time (Huey, Gilchrist, & Hendry, 2005).

The process of introduction into a new location and of spatial expansion from this point of introduction often imposes a transitory reduction in population size (e.g., Dlugosch & Parker, 2008; Peischl & Excoffier, 2015; Figure 1). Such population bottlenecks are predicted to increase inbreeding depression, increase genetic drift and decrease genetic diversity. A variety of compensatory mechanisms may act to counter the loss of genetic variation and facilitate adaptive evolution for population expansions, such as hybridization, multiple introduction events and propagule pressure, such that genetic diversity in the invasive and native area could be comparable or even greater in invaded regions (Baltazar-Soares, Paiva, Chen, Zhan, & Briski, 2017; Bock et al., 2015; Estoup et al., 2016; Facon et al., 2011; Prentis, Wilson, Dormontt, Richardson, & Lowe, 2008; Wellband, Pettitt-Wade, Fisk, & Heath, 2017). However, studies of genetic diversity and adaptive change in invasive populations rarely take into account the potential role played by transposable elements (TEs) and epigenetic changes (Oliver & Greene, 2009; Oliver, McComb, & Greene, 2013; Rey, Danchin, Mirouze, Loot, & Blanchet, 2016; Schrader et al., 2014; Stapley, Santure, & Dennis, 2015). These mechanisms can act together to rapidly increase genetic and phenotypic diversity in a population. TEs are repeated sequences present in virtually all genomes. They behave "parasitically" within the genome in that they are able to replicate and insert themselves across chromosomes. The amount of the genome made of TEs can vary from a few per cent, such as in yeast (3%; Kim, Vanguri, Boeke, Gabriel, & Voytas, 1998) up to 80% in maize (Schnable et al., 2009; Vitte, Fustier, Alix, & Tenaillon, 2014). Despite variation in their activity and impact across species, TEs have been proposed to be a relevant source of genetic variation. For example, in plants, TEs are considered as a source of genetic and epigenetic variability and thus drivers of evolution (Belyayev, 2014; Lisch, 2013; Vitte et al., 2014). Similarly, diversification and rapid evolution in angiosperms have been attributed to TE sequences (Oliver et al., 2013). In animal model systems like *Drosophila*, TEs have been described as potentially playing a role in speciation since they can be responsible for hybrid incompatibility (Kidwell & Lisch, 2001). More recently, TEs have been hypothesized to facilitate adaptation in invasive species to new environments (Schrader et al., 2014; Stapley et al., 2015). A fundamental challenge in testing this hypothesis in natural populations is linking the genetic variation generated by TEs to changes in fitness. However, the relationship between TEs and fitness is mediated by a variety of mechanisms that have evolved to find and silence deleterious TE-induced changes in gene expression. These silencing systems are largely epigenetic mechanisms, which play a role in influencing gene expression and have been proposed to independently and jointly with TEs facilitate adaptive plasticity and evolution (Lanciano & Mirouze, 2018; Rey et al., 2016; Stapley et al., 2015).

Here, we use a broad definition of epigenetics as any non-genetic molecular modification of the genome that alters gene expression. Epigenetic modifications are non-genetic changes in the sense that there is no DNA sequence change that is passed on in the germline, although there is evidence that some epigenetic modifications can sometimes be transmitted across generations (Meyer, 2018). Epigenetic mechanisms encompass three levels of well-characterized modifications: (a) DNA methylation, (b) histone modifications and (c) non-coding RNA (Allis & Jenuwein, 2016; Duncan, Gluckman, & Dearden, 2014), which can rapidly change gene expression and affect mobility of TEs. Epigenetic changes or epimutations refer to the stable modification of epigenetic marks (such as DNA methylation) on a locus that does not affect the DNA sequence. Epimutation on a locus generates an epiallele corresponding to one of two or more alleles of a given gene differing in their epigenetic properties and encoding different phenotypic characteristics. The epigenetic mechanism silencing TE insertions can be very effective, although the exact mechanism varies across species. For example, in *Drosophila*, silencing of TEs is mainly operated by histone modifications and small RNAs (Aravin, Hannon, & Brennecke, 2007), while in mammals and plants, DNA methylation is the major mechanism.

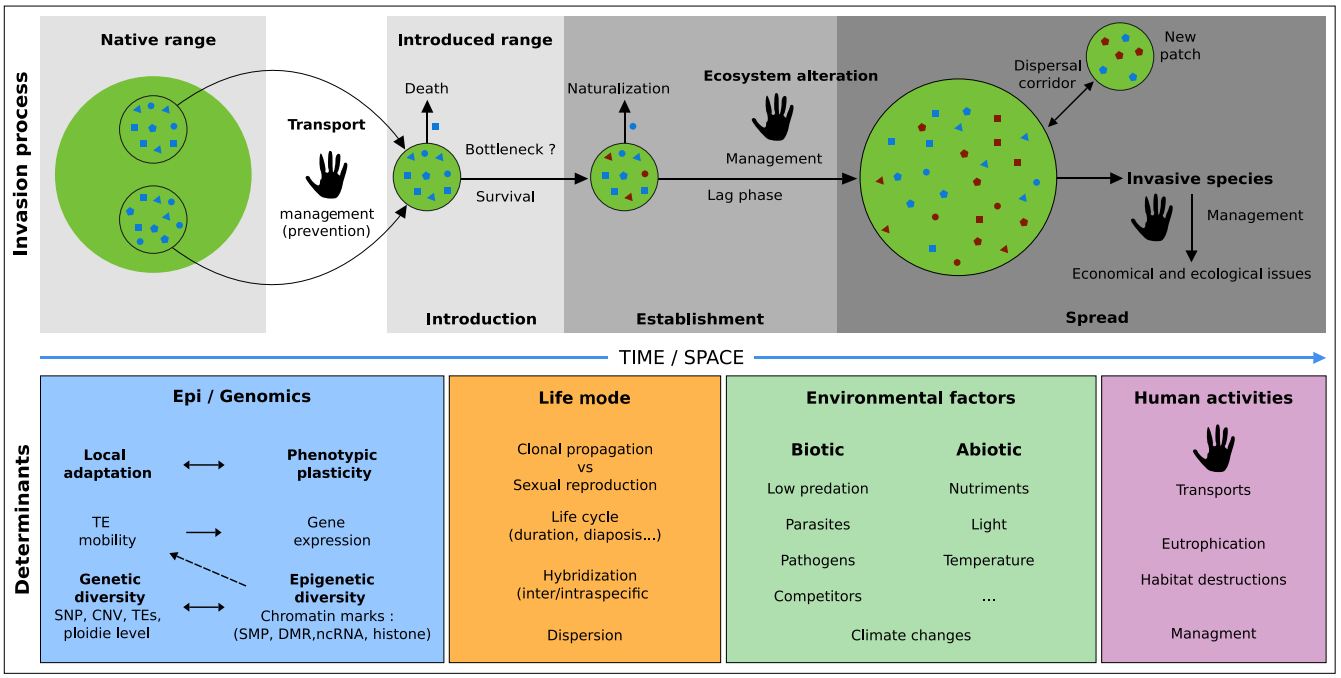


FIGURE 1 Process of invasion and its epi/genomics, life mode, environmental and human activity determinants. A species in its native area (*white frame*) is transported in a new environment (*grey frame*), often by human activities, voluntary or not. Genetic diversity (*blue shape*) is recognized as lower in introduced area. Installation of this new population can be facilitated by repeated introductions (propagule pressure). A bottleneck can take place and lead to the disappearance of the introduced species. Organisms who survive can have a different genetic (*shape*) and epigenetic (*colour*) diversity than from native area. Population becomes established and continues in time; some species can be naturalized, while others are going to continue their expansion until they become invasive. There is an uncontrolled expansion with a selection of the most performing genetic and epigenetic variants in a given environment. These invasive species can then colonize new environments and cause economic and ecological issues. During this process, a multitude of factors comes into play: Epigenetic and genetic mechanisms can modify gene expression and thus the capacity for local adaptation and phenotypic plasticity. Characteristics of organisms are also important factors to consider for the success of a biological invasion: life cycle, type of multiplication, especially clonal, possibility of hybridization (*combined shape*) and the capacities of dispersal can favour the installation of the population in a new environment. Environmental factors, biotic and abiotic, represent the sensibility of the ecosystems. Absence of predators and competitors in the introduction area, as noted in enemy release hypothesis (ERH) and its corollary evolution of increased competitive ability (EICA), as well as the presence of empty ecological niche can partially explain the success of an invasion. Besides, global climate change has been identified as a source of opportunity for new invasions. Finally, human activities are a key factor of either success or failure of an invasion. The human being acts at the origin of the process by the action of transport, voluntary or not. On the other hand, he can, with legislation and prevention, decrease or control this mechanism. He can either promote invasions by altering the ecosystems or limit their impact by controlled actions and management

Both epigenetic mechanisms and TE activity can be sensitive to the environment (Fablet & Vieira, 2011; Lanciano & Mirouze, 2018). For example, histone modifications and DNA methylation have been shown to be modified by abiotic and biotic changes to the environment (Alonso, Ramos-Cruz, & Becker, 2018; Blake & Watson, 2016; Nätt & Thorsell, 2016), and the alteration of these epigenetic mechanisms can in turn alter TE-induced changes that would otherwise not occur. Thus, the linkage between environmental change and epigenetic–TE behaviour leads to the expectation that TEs and epigenetics can contribute to an increase in the genetic and phenotypic diversity following the colonization of a new environment. The environmental induction of these mechanisms can be placed into a larger conceptual framework that considers how phenotypic plasticity can facilitate evolutionary change.

Phenotypic plasticity provides a unifying conceptual framework for incorporating the molecular mechanisms that contribute to invasion success within and across generations. Plastic responses to the environment may be reversible or non-reversible depending on the trait (Piersma & Drent, 2003; Pigliucci, 2005; West-Eberhard, 2005), and they can be adaptive, non-adaptive or neutral with respect to fitness (Ghalambor et al., 2007). We can thus view the predictable environmental induction of TEs and epigenetic changes from the same perspective used to study other environmentally induced plastic traits (Horváth, Merenciano, & González, 2017). Indeed, the epigenetic changes associated with different environmental cues provide a mechanistic understanding for the observed patterns of phenotypic plasticity, and have been hypothesized to facilitate invasions by allowing organisms to express advantageous phenotypes across a broader range of environments (Baker & Stebbins, 1965; Bradshaw, 1965; Richards, 2006; Sultan, 2001). The hypothesis that greater plasticity contributes to the success of an invasion has been supported by some

studies (e.g., Daehler, 2003; Davidson et al., 2011; Nyamukondiwa, Kleynhans, & Terblanche, 2010; Sexton, Mckay, & Sala, 2002; Trussell & Smith, 2000), but not by others (e.g., Chown, Slabber, McGeoch, Janion, & Leinaas, 2007; Godoy, Valladares, & Castro-Díez, 2011; Matzek, 2012; Palacio-López & Gianoli, 2011). Thus, while we have a compelling argument for how phenotypic plasticity and genetic variation can contribute to adaptive evolution and facilitate the invasion processes, we know far less about the contribution of TEs and epigenetic variation (Stapley et al., 2015) and specific tests of these mechanisms in natural populations remain largely unexplored (Schlichting & Wund, 2014).

In this review, we first cover the mechanistic underpinnings of how mobile TEs and epigenetic systems alter genetic variation and gene expression. We use the conceptual framework of how phenotypic plasticity or how environmentally induced changes can facilitate invasions through these mechanisms. We first review the role of TEs as drivers of genetic diversity and the epigenetic system that regulates these genomic rearrangements. We discuss the evidence that TEs generate genetic variation, and environmental conditions can release this variation and make it available to selection. We then review the epigenetic mechanisms that control gene expression, the evidence for transmission across generations, the patterns of environmental induction, and how all these processes may contribute to invasion success. We conclude that by focusing on the epigenome (i.e., the regulatory system that integrates how environmental and genomic variations jointly shape phenotypic variation) we will gain key insights into the mechanisms that contribute to invasion success.

2 | TRANSPOSABLE ELEMENTS IN INVASIVE POPULATIONS

2.1 | TEs and their regulation in the genome

Altered environmental conditions are thought to act as a source of selection that shifts genotype and phenotype frequencies towards new optima. The classical perspective is that selection acts either on standing genetic variation or on spontaneous mutations underlying the phenotypes under selection, leading to adaptive evolutionary change (Orr, 2005). However, there is an increasing appreciation that other types of genetic modifications could contribute to the genetic variation selection acts on. One such mechanism is the genetic variation generated by TEs. First discovered by McClintock (1950) in maize, TEs are defined as mobile repeated DNA sequences that can move in the genome by generating new copies of themselves and induce new mutations (Casacuberta & González, 2013; Chuong, Elde, & Feschotte, 2017; Slotkin & Martienssen, 2007). Because TEs can induce mutations in genes, alter gene regulation and disrupt recombination, they can have deleterious consequences (Slotkin & Martienssen, 2007); however, they can also generate new variation on which selection can act (Kidwell & Lisch, 2001; Stapley et al., 2015). TEs are formally classified into two families according to the transposition process. Type I, or retrotransposons, use an RNA intermediate to produce new copies of themselves. Type II DNA transposons code a transposase enzyme and transpose by a cut-and-paste mechanism (Figure 2). The majority of TE insertions in a genome are neutral or slightly deleterious, such that only small effects are expected on individual fitness. However, when they insert in locations that disrupt gene function or change gene regulation TE can have negative or (rarely) positive fitness consequences (Lanciano & Mirouze, 2018; Slotkin & Martienssen, 2007). Negative impacts of TE insertion should be under natural selection and potentially purged but could also be a source of disease as reported in human health population studies (Wang & Jordan, 2018). Positive fitness effects of TE insertions are now also reported. For example, a role for TEs in the adaptive evolution was proposed in stress response of *Drosophila melanogaster* (González, Karasov, Messer, & Petrov, 2010) and *Arabidopsis thaliana* (McCue, Nuthikattu, Reeder, & Slotkin, 2012), as well as in plant defence against fungi (Hayashi & Yoshida, 2009) or osmotic tolerance (Ito et al., 2016). Yet, to fully understand how TEs spread and are regulated throughout the genome it is important to understand the various mechanisms that have evolved to manage the consequences of these insertions.

Genomes and TEs are locked in an ongoing evolutionary arms race, where TEs act like selfish "parasites" attempting to increase their numbers, and genomes respond with a variety of mechanisms to reduce the mobility of TEs and regulate the impacts of these insertions on gene expression (Aravin et al., 2007; Slotkin & Martienssen, 2007). The regulation of TEs can occur both by transcriptional gene silencing (TGS) and by post-transcriptional gene silencing (PTGS; Castel & Martienssen, 2013; Pumplin & Voinnet, 2013; Slotkin & Martienssen, 2007), and different types of epigenetic regulation have been described in this process. These mechanisms can either use small RNAs, histone modification or DNA methylation. Small non-coding RNA from the piwi RNA (piRNA) family is implicated in TE regulation either by TGS or by PTGS. The piRNA can directly cleave transcripts of TE, avoiding the protein production and transposition, but they can also act on TE insertion and drive histone modifications which will silence the TE copies (Pedersen & Zisoulis, 2016; Sienski, Dönertas, & Brennecke, 2012; Slotkin & Martienssen, 2007; Song & Cao, 2017; Zhang, Tao, et al., 2016). These piRNA pathways are well conserved among eukaryotes (Fablet, Akkouche, Braman, & Vieira, 2014; Fablet, Salces-Ortiz, Menezes, Roy, & Vieira, 2017) and are considered a reliable immunity system contributing to the stability of the genomes (Sienski et al., 2012; Slotkin & Martienssen, 2007; Zhang, Tao, et al., 2016). At the histone level, methylation of the histone 3 lysine 9 (H3K9me3) is known to limit TE expression in *Drosophila* and mammals (Lee, 2015; Matsui et al., 2010). Some data also indicate that the histone modifications that target a specific TE insertion can spread on the region and affect the expression of nearby genes (Elgin & Reuter, 2013; Lanciano & Mirouze, 2018; Lee, 2015; Rebollo et al., 2011; Slotkin & Martienssen, 2007). DNA methylation also affects TE expression. For example, mouse embryo mutants for the DNA methyl transferase 1 (*Dnmt-1*) have higher levels of intracisternal A-particle (IAP) retrotransposon expression (Walsh, Chaillet, & Bestor,

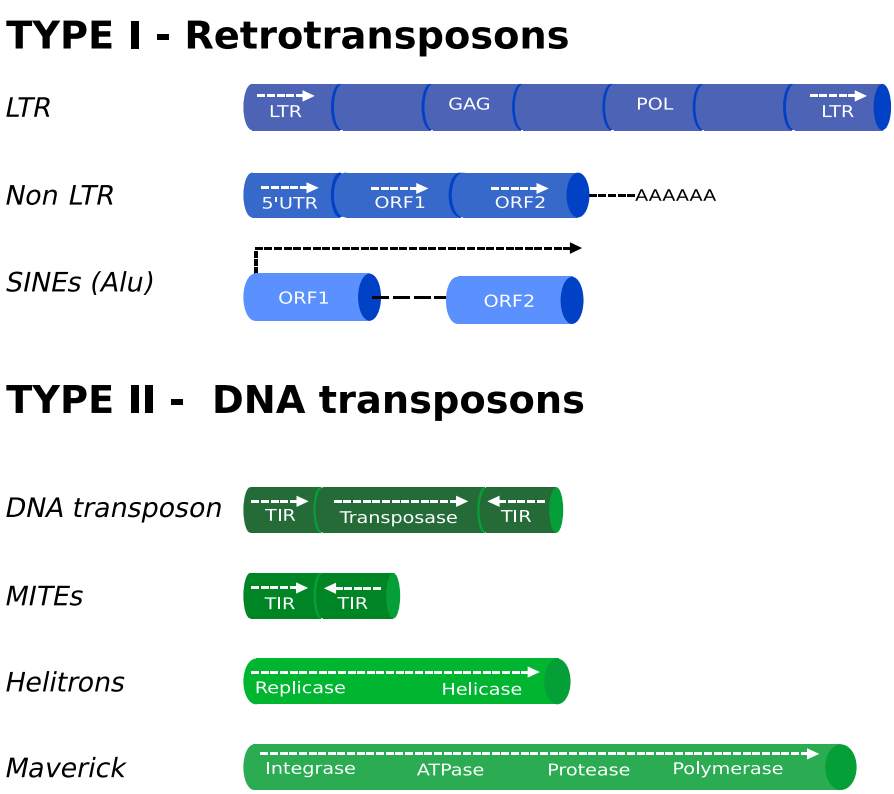


FIGURE 2 Transposable element structures. Transposable elements can be classified into types I and II according to RNA intermediate production and insertion mechanisms. Type I, called retrotransposon, use RNA intermediate via a reverse transcription step, and can be divided into two groups. Long terminal repeats (LTR) elements with direct repeats both at beginning and at end of the element. It presents POL and GAG sequences related to retroviral protein genes. Non-LTR elements also use an RNA intermediate and are characterized by a polyA tail. Short interspersed nuclear elements (SINEs) are non-autonomous transposable element (TE) that will use LINE enzymatic machinery to transpose. Type II elements, named DNA transposons, present terminal inverted repeats (TIR) at each extremity, which are recognized by transposon's transposase and allow the integration in other genome. Miniature inverted repeat transposable elements (MITEs) have no open reading frames (ORFs) and are non-autonomous TEs. Then, helitron transposons use DNA helicase mechanisms to be transposed and do not present TIR pattern. Hence, the recently discovered Maverick subgroup seems to use a self-encoded DNA polymerase and have TIRs

1998). In rice, mutation of DNMT *OsMet1b* gene reduced CG methylation and induced necrotic death in the seedlings (Yamauchi, Johzuka-Hisatomi, Terada, Nakamura, & Iida, 2014). DNA methylation can be induced by environmental conditions (see below) as shown with classic examples of TE-generated epialleles. For example, in mice, the *agouti* gene inducing coat colour modification is due to IAP retrotransposon presence, while in morning glory flowers (*Convolvulaceae*), a methylated MuLE transposon induces petal colour streaks (Slotkin & Martienssen, 2007). Thus, despite the potentially negative consequences of TEs, there are a suite of mechanisms that allow organisms to not only mitigate these impacts, but also coopt them in the process of adaptation. Yet, these mechanisms are also potentially sensitive to the environmental context organisms occur in, leading to the expectation that novel or stressful environments may induce changes that fuel evolution.

2.2 | TEs and environmental stress

Environments that fall outside the historic or normal range experienced by a population may impose stress on organisms by challenging their physiological and cellular systems and reducing fitness. How stressful environments impact the mechanisms by which organisms cope with them is thus of great interest to those interested in invasion biology because invasive populations often encounter novel environmental conditions (e.g., Stapley et al., 2015). Barbara McClintock was the first to hypothesize that the variation generated by TEs can over evolutionary time help populations survive of under stressful conditions, but limited empirical data were available to test these ideas at that time (Casacuberta & González, 2013). Specifically, novel or stressful environments have been implicated in increasing TE activity (Capy, Gasperi, Biémont, & Bazin, 2000; Lanciano & Mirouze, 2018) and disrupting the epigenetic regulation of TEs, such that previously silenced TEs become reactivated (Guerreiro, 2012; Horváth et al., 2017; Stapley et al., 2015; Vieira, Aubry, Lepetit, & Biémont, 1998). The expectation is that such loss of control over TEs will promote a rapid increase in genetic and phenotypic variation available for selection to act on, and that in some of these cases TEs will evolve to become part of the adaptive stress response (Guerreiro, 2012; Horváth et al., 2017; Stapley et al., 2015; Vieira et al., 1998). However, in a recent review of published studies,

Horváth et al. (2017) argue the links between stress and TE response are far from being a generality.

For TEs to become involved in the stress response, there needs to be a functional link between them. In rice, Naito et al. (2009) found that *mping* TE insertions had no effect on the transcriptome under control conditions, but clearly affected the expression of nearby genes under stressful cold and saline conditions. There was no indication any of these changes were adaptive or whether the TE-driven changes in gene expression were due to stress-induced disruption of the epigenetic regulatory mechanisms or some other mechanism. Using a comparative approach, González et al. (2010) identified several TE insertions that could potentially be implicated in the adaptation of *D. melanogaster* to the most southern and northern populations exhibiting clinal variation in Australia and North America. They examined both putatively neutral and adaptive insertions that had increased in these derived populations and found strong evidence for selection on a subset of the putatively adaptive insertions. When they examined the neighbouring genes to these insertions, they found they were genes previously known to be involved in adaptation to a variety of environmental factors (González et al., 2010). Other studies have also found direct links between the presence of the insertion and adaptive phenotypes related to insecticide resistance (Magwire, Bayer, Webster, Cao, & Jiggins, 2011; Merenciano, Ullastres, Cara, Barrón, & González, 2016), cold stress response, oxidative stress (Guio, Barrón, & González, 2014; Guio, Vieira, & González, 2018), xenobiotic stress (Mateo, Ullastres, & González, 2014) and resistance to sigma virus (Magwire et al., 2011). Thus, there is growing evidence that TEs can be under selection to alter patterns of expression on neighbouring genes, leading to adaptive changes in phenotypes.

2.3 | TEs in the context of phenotypic plasticity and invasion

The potential for TEs to resolve the invasion paradox of rapid evolution in response to new environments despite small population sizes and reduced genetic variation, is, in part, dependent on how TEs and their epigenetic control systems respond on ecological time-scales (Stapley, Feulner, Johnston, Santure, & Smadja, 2017). In other words, there must be a predictable increase in genetic and phenotypic variation when populations colonize new environmental conditions, and this should be caused by either the increased production of TEs or the reduced control of TEs. If the expression of TEs predictably changes in response to environmental cues, then we can study the context-dependent nature of TE activity as we would any other phenotypically plastic trait (Rey et al., 2016; Stapley et al., 2017). Thus, we can view how a change in environmental cues (e.g., a stressor) alters TE activity as a form of phenotypic plasticity, but we can also view how TEs change gene expression, providing a mechanistic explanation for patterns of phenotypic plasticity observed in fitness-related traits. In either case, the expectation is that populations likely harbour hidden genetic variation caused by TEs that is rarely revealed in their native range, because selection shapes the epigenetic control mechanisms that tightly regulate TE activity (Slotkin & Martienssen, 2007). However, in novel environments where selection has not had an opportunity to act on the epigenetic control of TEs, we expect increased misregulation of the epigenetic control system, which can lead to a "burst" of TE-related variation (Stapley et al., 2015). This burst of genetic and related phenotypic variation should fuel evolutionary responses to selection. Yet, to date no study has documented that these various mechanisms have directly contributed to the success of an invasive population, but various indirect lines of evidence suggest it is highly plausible.

The role of TEs in the success of invasive populations was reviewed by Stapley et al. (2015) where they outlined the potential ways in which TEs contribute to population expansion and adaptation, and then review the largely indirect evidence supporting this view. Here, we briefly highlight two studies where TEs have been implicated in facilitating adaptation in invasive populations. Goubert et al. (2017) studied populations of the tiger mosquito *Aedes albopictus* in their native range of Vietnam and in their invasive range throughout Europe. They used TEs as neutral markers to identify genomic regions under selection (Goubert et al., 2017). They found the majority of outlier loci had a higher frequency of insertions in the European populations, suggesting that TEs could be linked to genes that have a role in adaptation to temperate environments. Dennenmoser et al. (2017) studied copy number and TE richness in the invasive hybrid sculpin fish, *Cottus* spp., and found an increase in TE copy numbers in invasive *Cottus* populations potentially caused by hybridization. In combination with the studies described above, these studies suggest we can no longer ignore the role of TEs in the evolutionary process, although we still lack a basic understanding of what role TE-related variation plays in the early stages of population divergence when invasive populations are colonizing new environments. Future studies will need to take advantage of recently established populations or experimentally generate new populations to explicitly test if TEs and their epigenetic control play a role in biological invasions.

3 | EPIGENETIC MECHANISMS, A COMPONENT OF THE RAPID RESPONSE TO ENVIRONMENTAL CHANGES IN THE INVASION PROCESS

3.1 | Epigenetic mechanisms play a role in response to environmental change

So far we have considered epigenetic mechanisms in the context of how they control TE activity, but far more research has investigated the independent effects of epigenetic changes for their role in altering patterns of gene expression in response to both biotic and abiotic environmental variations (Amarasinghe, Clayton, & Mallon, 2014; Crisp, Ganguly, Eichten, Borevitz, & Pogson, 2016; Gómez-Díaz, Jordà, Peinado, & Rivero, 2012; Song et al., 2015; Spannhoff et al., 2011). In a diversity of organisms, ranging from invertebrate to vertebrate animals and from annual to perennial plants, environmentally induced epigenetic changes can result in adaptive responses to new and stressful environments (Becker

et al., 2011; Bräutigam et al., 2013; Conde et al., 2017; Gibert, Peronnet, & Schlötterer, 2007; Kawakatsu et al., 2016; Lafon-Placette et al., 2018; Meyer, 2015; Schmitz et al., 2011; Seymour & Becker, 2017). Some of the best examples of adaptive epigenetic effects are observed in plants. For example, following an abiotic or biotic stress plants will exhibit epigenetic changes that prime the defences against future repeated stress, resulting in a "epigenetic memory" that allows an individual to respond more quickly and effectively when the stress appears again (Lämke & Bäurle, 2017). The duration of the primed state within an individual is a key factor to survival and adaptation, and several studies have shown that the epigenetic modifications involved can be transgenerational (Mauch-Mani, Baccelli, Luna, & Flors, 2017).

The transgenerational nature of environmentally induced epigenetic variants (i.e., epimutations or epialleles) provides the critical link between plastic changes in one generation influencing the next generation. However, unlike sequence-based changes that are relatively stable and predictably transmitted regardless of environmental conditions, epigenetic variants occur at higher frequency and exhibit rapid flexibility and reversibility (Heard & Martienssen, 2014; Law & Jacobsen, 2010). For example, with respect to frequency, the rate of epimutations has been estimated at 3×10^{-4} or five orders of magnitude higher than the DNA substitution rate in *A. thaliana* (10^{-9}; see van der Graaf et al., 2015). At the same time, we also know that patterns of methylation and demethylation can rapidly shift in response to different environmental cues within and between generations, making epigenetic patterns also very flexible (Heard & Martienssen, 2014; Law & Jacobsen, 2010; Meyer, 2015). How well this epigenetic information is stored and transmitted from one generation to the next, and how effective this information is in preparing subsequent generations for responding to environmental challenges ultimately determine the importance of epigenetic variation for adaptive plasticity and evolution in response to new environments. The Arabidopsis 1001 Epigenomes project provides evidence that DNA methylation is correlated with geography and climate of origin and could be involve in local adaptation (Kawakatsu et al., 2016). Schmid et al. (2018) reported in *Arabidopsis* that epigenetic variation is subject to selection and can play a role in fast adaptive responses. However, the relative extent to which genetic and epigenetic variations contribute to plant adaptation remains to be elucidated and likely depends on the reproductive mode of the investigated species. If environments are predictable across generations, heritable epigenetic changes could provide an adaptive anticipatory response. However, if environments change between generations, a mismatch can arise between the transmitted epigenetic information and the environment of the descendants. Thus, a critical link that remains to be established is the degree to which heritable epigenetic variation underlies adaptive phenotypes.

The fundamental challenge facing researchers is to disentangle genetic and epigenetic effects on specific phenotypic traits. Establishing the genetic basis of any complex traits is already challenging given that many loci of variable effect all contribute to explain some of the phenotypic variation observed. Then, epigenetic control is an additive layer of complexity in direct interaction with genetic variation (e.g., control of TE insertion and spontaneous deamination of 5-methylcytosine into thymine) leading to a complex situation. One powerful approach that has been used to separate genetic from epigenetic effects is to create epigenetic recombinant inbred lines (epiRILs; Johannes et al., 2009; Reinders & Paszkowski, 2009) where epigenetic variants are placed on a homogeneous genetic background. This approach allows for the quantification of phenotypic variation between different lines and assumes they must be due to the epigenetic variants given the rest of the genomic background is held constant. Zhang, Fischer, Colot, and Bossdorf, (2013) used this approach in *A. thaliana* and demonstrated that epigenetic marks were responsible for phenotypic variance and for plasticity. Similar approaches reveal that for a diversity of traits epiRILs not only explain phenotypic variation, but also that transgenerational inheritance and patterns of plasticity may be purely caused by epigenetic effects (Bossdorf, Arcuri, Richards, & Pigliucci, 2010; Kooke et al., 2015; Zhang et al., 2013). For example, Cortijo et al. (2014) demonstrated that "Differentially Methylated Regions" of epiRIL lines act as epigenetic quantitative trait loci for several traits and could be stably inherited and that DNA methylation could contribute to the phenotypic plasticity of a trait, especially in stressful conditions. The same result was found in the fungus (*Neurospora crassa*) using mutants for the different epigenetic pathways (DNA methylation, histone methylation and RNA interference (Kronholm, Johannesson, & Ketola, 2016)). Another similar strategy to isolate the epigenetic basis of traits is to use clones as proposed by Conde et al. (2017), Lafon-Placette et al. (2018) and Le Gac et al. (2018) who have analysed poplar (*Populus* spp.) clones subjected to distinct environmental conditions (cold, water availability). These studies show that developmental plasticity and memory are associated with differentially expressed genes overlapped by DMRs. These genes were related to abiotic stress response and phytohormone pathways involved in complex traits such as developmental transitions during the annual cycle or drought tolerance. While such methods are not feasible in most plant and animal systems, they demonstrate that environmentally induced epigenetic modification does explain phenotypic variation and examining patterns of epigenetic changes in invasive populations is a worthwhile endeavour.

3.2 | Epigenetic landscape in invasive species

In the case of invasive species, the critical question is: What is the evidence that epigenetic mechanisms play a role in the successful colonization of new environments? To date, relatively few studies have differentiated between the role of genetic versus epigenetic variation on successful invasions (Prentis et al., 2008; Vogt, 2017). We suspect that in time evidence will accumulate that epigenetic mechanisms act as a complementary mechanism in conjunction with standing genetic variation to shape the phenotypic variation exposed to selection. Current attempts to quantify the epigenetic

contribution to population divergence are to measure genome-wide patterns of DNA cytosine methylation polymorphism using methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism. This technique uses a number of restriction enzymes that are varyingly sensitive to cytosine DNA methylation, and cut DNA depending on the methylation status of the cytosine. Using such an approach, it is possible to compare the patterns obtained after digestion between individuals or populations to estimate genetic and epigenetic diversity (Richards, Schrey, & Pigliucci, 2012). In many studies, the experimental design consists of comparisons of epigenetic patterns between populations of the same species from several geographical areas for which the colonization history is known. While such an approach does not explicitly test the relationship between specific epigenetic changes and trait variation, it provides insight into how different environmental conditions induce genome-wide patterns of methylation. Below we briefly discuss some of the relevant plant and animal studies that have used this design and their major findings.

3.2.1 | Invasive plant examples

Given their sedentary nature, plants rely extensively on phenotypic plasticity and epigenetic mechanisms to cope with changing environments (Seymour & Becker, 2017), and there is growing evidence the patterns of methylation vary across populations occupying different environments (Foust et al., 2016; Guarino, Cicatelli, Brundu, Heinze, & Castiglione, 2015; Herrera & Bazaga, 2016; Preite et al., 2015). Thus, it is reasonable to expect that epigenetic variation may underlie invasive plant populations colonizing new environments (Richards et al., 2012). We highlight some of these examples here.

Gao, Geng, Li, Chen, and Yang (2010) investigated how epigenetic profiles change within and among natural populations of alligator weed (*Alternanthera philoxeroides*), an invasive plant in China that can grow in aquatic and terrestrial environments. This species exhibits significant changes in morphology depending on the environment it inhabits, and Gao et al. (2010) induced these differences by simulating aquatic and terrestrial environments in a common garden experiment using clones derived from natural populations occupying both environments. They found more than half of the epigenetic markers were shared under the same common garden environment independent of the population's origin; this similarity indicates that environmentally induced epigenetic reprogramming is a predictable response to environmental cues (Gao et al., 2010). Because the number of polymorphic loci was close to zero among these populations, but the epigenetic diversity was much higher (e.g., approximately a quarter of markers being polymorphic), the conclusion is that the epigenetic changes directly contribute to phenotypic changes underlying invasion success (Gao et al., 2010).

Richards et al. (2012) examined the correlation between epigenetic variation and phenotypic response for two invasive *Fallopia* species (Japanese Knotweed) in the United States. They compared individuals coming from 16 different sites in the United States and found that epigenetic differentiation was higher between populations than between both species. Moreover, they observed greater epigenetic differentiation than genetic differentiation across haplotypes. Thus, because the genetic diversity in the introduced range is less than the epigenetic diversity, it likely originated from the environmental conditions the plants experienced (Richards et al., 2012). More recently, Zhang, Parepa, Fischer, and Bossdorf (2016) have shown that epigenetic variants in Japanese knotweed are correlated with patterns of phenotypic variability of different clones, providing a link between the environment, epigenetic variation and plant phenotypes.

The specific link between methylation, gene expression and phenotypic response to the environments has recently been demonstrated by Xie et al. (2015) in A*geratina adenophora* (crofton weed). This plant originates from Mexico and was introduced to tropical regions of China before invading the north of China with differentiated cold-tolerant populations. Xie et al. (2015) studied methylation state in the C-repeat/dehydration-responsive element binding factor (CBF) pathways, which are responsible for the plant cold response via activation of cold-responsive genes. They sampled several distinct geographical populations and tested their cold tolerance. All populations were screened for expression of seven inducers of CBF pathways (RT-qPCR) and methylation state (bisulphite-PCR). In parallel, they analysed CBF inducer sequences to confirm no genetic difference in these genes or no impact at expression level. They observed a negative correlation between the methylation level of one CBF inducer, ICE1, and cold tolerance among populations. Most cold-sensitive populations were more methylated than cold-tolerant plants. The methylated state seems to be stable due to the same level in the four populations after several cold time treatments (Xie et al., 2015). These results provide some of the strongest evidence demonstrating a strong link between methylation state and rapid response to an environmental stress.

Yet, the relationship between epigenetic variation, population divergence and transgenerational inheritance across environments is not universal. Recently, Liu et al. (2018) examined genetic and epigenetic variation of native and invasive lineages of the common reed (*Phragmites australis*) in North America. They grew populations from different environments under controlled common garden conditions to test the stability of epigenetic inheritance and to partition genetic from epigenetic variation. While they found epigenetic variation to be greater than genetic variation across populations, they did not find convergence in epigenetic markings between populations occupying similar environments, suggesting the relationship between environmentally heritable induced epigenetic variations may not be stable and also dependent on the genetic background (Liu et al., 2018). In comparison with two saltmarsh species, Foust et al. (2016) found while one species showed a significant correlation between epigenetic variation and habitat, the other species did not. Both Foust et al. (2016) and Liu et al. (2018) found a correlation between the amount of genetic and epigenetic variation within a population, suggesting that separating the contribution from these sources of variation will present challenges for interpretation of these patterns.

3.2.2 | Invasive animal examples

Unlike plants that are more sedentary, many animals are mobile and experience a diversity of environments within and between generations. Epigenetic mechanisms may therefore underlie plastic responses of animals expanding their geographical ranges into new environments. Schrey et al. (2012) analysed genetic and epigenetic variation in the invasive house sparrow (*Passer domesticus*). This bird has spread all over the world and exhibits phenotypic variability in different geographical areas, despite a recent invasive period (<150 years). Schrey et al. (2012) studied epigenetic variability of populations in Nairobi (Kenya), which was colonized 50 years ago, and Tampa (Florida, USA), which was colonized over 150 years ago (Schrey et al., 2012). Comparisons of these populations reveal that the amount of within-population epigenetic variation is greater than the between-population variation and that it was associated with a poor genetic diversity. Schrey et al. (2012) suggest that epigenetic variation may have compensated for the low genetic variability and contributed to phenotypic differentiation. In another study of the same species, Liebl, Schrey, Richards, and Martin (2013) sampled seven geographically separated Kenyan populations and found a negative correlation between genetic and epigenetic diversity; higher epigenetic diversity was correlated with a decrease in heterozygosity and an increase in inbreeding (Liebl et al., 2013). The authors suggested that epigenetic variation could be a compensatory mechanism for low genetic diversity in an invading population, allowing an increase in phenotypic variability by expression of cryptic genotypes or by phenotypic plasticity. However, in a more recent comparison of Australian house sparrows, Sheldon, Schrey, Andrew, Ragsdale, and Griffith (2018) failed to detect such compensatory effects. Despite considerable phenotypic differences, Liebl et al. (2013) also failed to find a relationship between epigenetic variation and populations occupying different environments.

Ardura, Zaiko, Morán, Planes, and Garcia-Vazquez (2017) studied epigenetic variation in populations of the invasive pygmy mussel (*Xenostrobus securis*). Specifically, they compared a newly established population to existing older populations to test the hypothesis that epigenetic patterns change over time as the population undergoes sequential invasive steps. They observed a significant hypomethylation in recent invasive populations compared to older ones and suggested that hypomethylation could increase gene expression or genetic recombination, thus impacting the phenotype. The same hypomethylation was detected in one other species, *Ficopomatus enigmaticus* (Ardura et al., 2017). However, the experimental design of these studies presents potential biases due to confounding effects of different environments and the invasive status of the populations.

Huang et al. (2017) used the MSAP technique to reveal changes in DNA methylation frequency, intragroup methylation divergence and methylation differentiation after rapid environmental stress in the marine species *Ciona savignyi*. They induced variation of DNA methylation frequency and DNA methylation divergence after 1 hr of treatment, but these differences disappeared after 48 hr. These results demonstrate that DNA methylation can also be short-lived in response to environmental changes and may not persist.

Lastly, Oppold et al. (2015) and Kreß, Oppold, Kuch, Oehlmann, and Müller (2017) studied epigenetic modifications in the Asian tiger mosquito (*A. albopictus*), which has spread from South-East Asia to every continent except Antarctica and Australia. Invasive populations of this vector for many diseases have low genetic diversity (Kreß et al., 2017; Oppold et al., 2015), yet exhibit rapid adaptive responses to different environments, such as chemical compounds or resistance to cold, and showed alteration of DNA methylation levels. These results should be taken with caution since the levels of DNA methylation in insects are in general very low and some recent papers suggest an absence of significant DNA methylation in Diptera (Bewick, Vogel, Moore, & Schmitz, 2017; Provataris, Meusemann, Niehuis, Grath, & Misof, 2018).

Collectively, these publications highlight the potential role of epigenetics in the invasion process by correlating epigenetic patterns of variation with natural environmental variation, but definitive evidence that such correlations underlie invasion success remains elusive. We see several fundamental challenges that need to be overcome before we can move beyond correlation and establish causal links between environmentally induced epigenetic variation and the phenotypic changes that allow populations to expand in new environments. First, when examining genome-wide patterns of genetic and epigenetic diversity it is extremely difficult to partition out how much each of these sources of variation contributes to observed phenotypes without using experimental designs that control for genetic background. Such experiments are simply not possible for many organisms. Second, while comparing methylation patterns of invasive populations across different environments may reveal higher epigenetic diversity relative to background genetic variation, rarely is there a clear link with the phenotypic response. This challenge is not unique to epigenetic studies, as establishing the genetic basis of any complex trait is exceedingly difficult in non-model organisms. Lastly, many of the current methods such as the MSAP approach sample only a small subset of the genome, which underestimates the epi/genetic diversity and makes it even more difficult to find clear relationships with phenotypes. New genome-wide approaches are emerging to better evaluate genetic and epigenetic diversity (van Gurp et al., 2016; Pu & Zhan, 2017). Thus, while there are compelling reasons to suspect epigenetic changes to be important in the process of adapting to new environments, we still lack the necessary evidence to draw any general conclusions.

4 | CONCLUSIONS AND FUTURE DIRECTIONS

In this review, we highlight significant literature that shows potential links between TE, epigenetics and phenotypic plasticity and their role in rapid adaptation of invasive species to new environments. No broad studies have deal with these three notions concomitantly. It is clear that limited empirical data are available to test this idea, particularly because it is difficult to disentangle genetic and non-genetic variability.

Species introductions can be considered evolutionary experiments and constitute good models for investigating adaptive processes operating at short time-scales (Gibert et al., 2016). The two most commonly used approaches to investigate how invasive populations respond to new environments are as follows: (a) the synchronic approach, where comparisons of native and invasive populations are made, and (b) the diachronic approach, where the invasive population's genetic variation is monitored over time. Ideally, both approaches should be combined, but more importantly if we are to better understand the mechanisms that facilitate and constrain population expansion in new environments, we need to study populations during the initial stages of the invasion. This is the time period when population size, genetic variation and patterns of plasticity will dictate the evolutionary trajectory of the population. While detection and study of such populations are needed, the use of large-scale experiments using mesocosms and experimental introductions to simulate the invasion may ultimately be needed if we are to draw any general conclusions about what mechanisms are most important.

It has been hypothesized that invasive species or populations exhibit greater adaptive phenotypic plasticity or rapidly evolve to new environments (Ghalambor et al., 2007; Prentis et al., 2008; Richards, 2006; Figure 1). The molecular mechanisms underlying these responses have yet to be totally elucidated, but a growing body of literature shows that TEs contribute to genetic variation and epigenetic changes underlie phenotypic plasticity in gene expression. The epigenome provides a mechanistic explanation on how environmental and genomic variations are transformed into phenotypic differences. Thus, while we have reason to suspect TEs and epigenetic changes contribute to adaptive phenotypic plasticity and adaptive evolution, establishing mechanistic links between genes, the environment, gene expression and phenotypes is an exceedingly difficult task. These challenges are part of the larger debate and problem of mapping genotypes to phenotypes (Debat & David, 2001; Wagner & Altenberg, 1996). We know that the environmental context is critical to shaping how the genome is transformed into different phenotypes by altering patterns of gene expression throughout development, but by considering how the epigenome responds to different environments, we can potentially gain a better understanding of this mapping problem (Duncan et al., 2014). Our perspective here is that the potential of the epigenome to facilitate biological invasions may be hidden within the native range, where natural selection has had the opportunity to shape epigenetic control mechanisms (see also Rey et al., 2016; Stapley et al., 2017). The general hypothesis is that if new environments disrupt the epigenetic control of genetic variation, then we will observe the release of this hidden variation, which in turn will facilitate biological invasions through adaptive plasticity and or increased genetic variation. Robust tests of this hypothesis will need to capture the processes occurring during the early stages of colonization and will require comparative studies of the source and descendent populations. Such studies will also need to resolve some fundamental challenges that all epigenomic approaches face. We briefly discuss these below.

4.1 | Phenotypic plasticity versus stochastic environmental effects

Phenotypic plasticity is defined as the capacity of a genotype to produce different phenotypes in response to different environmental cues (e.g., Ghalambor et al., 2007). A defining feature of plasticity is that it represents a predictable response to the environment, such that phenotype of an individual genotype can be predicted based on the environment (Pigliucci, 2005). In contrast, environmentally induced variation that is stochastic, such as developmental noise, represents unpredictable variation (Raser & O'Shea, 2005). This distinction matters when we consider the role the epigenome plays in biological invasions. If new environments induce predictable changes in the epigenetic control of gene expression, then natural selection can shape the pattern of epigenetic change throughout the genome. The concept of predictability is central to determining whether environmentally induced variation is adaptive or non-adaptive, and how selection will act on the distribution of phenotypes (Ghalambor et al., 2015). For example, if plasticity is adaptive then it can allow populations to persist under new conditions and allow time for beneficial mutations to arise (Corl et al., 2018; Ghalambor et al., 2007; Pigliucci, 2005).

However, if new or stressful environments induce stochastic changes in patterns of methylation or histone modification, then the contribution to adaptive evolution is largely based on the probability that by chance some of the variation is beneficial. Under such a scenario, the stability of these patterns across generations is critical to the process, otherwise the patterns of variation generated in one generation will be uncorrelated with the patterns in subsequent generations. It is therefore imperative that future studies examining the role of the epigenome in biological invasions quantify how predictable environmentally induced epigenetic change is, and how heritable these changes are across generations in the presence and absence of the environmental cues.

4.2 | Linking epigenetic marks to traits and separating genetic from epigenetic variation

Identifying the genetic basis of complex traits is a fundamental and ongoing challenge in evolutionary biology, and this is particularly the case for polygenic traits subject to environmental influences. Under controlled environmental conditions, breeding experiments can be designed to partition phenotypic variation into the contributions made by genetic, epigenetic and environmental sources. However, when studying natural populations establishing links between the epigenome and specific traits is often an exceedingly difficult task. To date, most studies investigating the contribution of epigenetic mechanisms to biological invasions have simply quantified the patterns of epigenetic marks for populations occupying different environments. The assumption is that variation in epigenetic marking underlies differences in phenotypes, but such correlations are rarely tested in outbred natural populations.

Establishing the relationship between epigenetic changes and phenotypes is closely related to the general problem of separating genetic from epigenetic effects on phenotypic variation. In other words, when we observe phenotypic differences between invasive populations occupying different environments, how much of the observed variation can be directly attributed to the underlying epigenetic versus genetic diversity? In model organisms, clonal or isogenic lines can be generated that place epigenetic variation against a common genetic background, thus allowing for observed phenotypic differences to be attributed to the epigenetic effects (but see Menezes et al., 2018, for the difficulty to disentangle the two sources of variation). However, in natural populations not only does the genetic background vary across individuals and populations, epigenetic and genetic diversity can be positively correlated with each other making results even more difficult to interpret. We anticipate that future sequencing technology and advances in bioinformatic tools will continue to improve and help overcome some of these challenges, especially for non-model species (Billet, Genitoni, Bozec, Renault, & Barloy, 2018). Thus, epigenome-wide association study is an interesting approach to associate single methylation polymorphisms (used as marker) with a phenotype of interest (Lin, Barton, & Holbrook, 2016).

4.3 | Separating genetic and environmentally induced changes in TE activity

It will be important to quantify how much the role TEs play in adaptive changes in response to new environments requires a joint understanding of the epigenetic control of genetic variation. TE regulation is mediated by epigenetic marks, and the modification of their expression in new environments could reflect increased mobility or misregulation of the epigenetic control mechanisms. Distinguishing between these alternatives is important if we are interested in knowing whether new environments increase genetic variation through TE activity or simply expose existing variation that was previously hidden. Disentangling epigenetic from genetic variability is becoming easier but remains a very challenging problem, in particular if TEs are accounted for. We envision studies that do a better job of quantifying genome size, the percentage of the genome made up of TEs and the total number of small TE variations (Goubert et al., 2015; Lerat, Fablet, Modolo, Lopez-Maestre, & Vieira, 2017). This could be done by simulating genomes with different TE amounts and using software like dnaPipeTE (Goubert et al., 2015) for which no reference genome is needed. Still, the identification of insertion polymorphism in natural population which will give us indications of increased genetic variance is not an easy task, despite incredible bioinformatics developments (Villanueva-Cañas, Rech, Cara, & González, 2017). The availability of third-generation sequencing technologies will be decisive to facilitate both the incorporation of TEs in the genetic variability analyses and also the identification of specific epigenetic changes associated with TE.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by the ANR (grant SWING ANR to P.G. and C.V.), the "INRA Département EFPA" (grant PI EFPA-2016 to D.B. and S.M.), the RTP3E-CNRS (http://rtp-3e.wixsite.com/rt3e), the Fondation Rovaltain (France) and the "Région Bretagne and INRA Département EFPA" (PhD grant to J.G.). C.K.G. was supported by a National Science Foundation grant (IOS-1457383) and the University Lyon 1.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

C.V. and P.G. conceived the idea and initial structure of the manuscript; P.M. and J.G. wrote the first draft of the manuscript; S.M. and D.B. contributed to the epigenetics section; C.K.G. significantly reorganized and correct the manuscript. All the co-authors significantly contributed to the writing and revisions.

DATA ACCESSIBILITY

No data were collected for this manuscript.

ORCID

Dominique Barloy https://orcid.org/0000-0001-5810-4871

Cristina Vieira https://orcid.org/0000-0003-3414-3993

REFERENCES

Aitken, S. N., Yeaman, S., Holliday, J. A., Wang, T., & Curtis-McLane, S. (2008). Adaptation, migration or extirpation: Climate change outcomes for tree populations: Climate change outcomes for tree populations. *Evolutionary Applications*, *1*(1), 95–111. https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2007.00013.x

Allis, C. D., & Jenuwein, T. (2016). The molecular hallmarks of epigenetic control. *Nature Reviews Genetics*, *17*(8), 487–500. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.59

Alonso, C., Ramos-Cruz, D., & Becker, C. (2018). The role of plant epigenetics in biotic interactions. *New Phytologist*, *221*, 731–737. https://doi.org/10.1111/nph.15408

Amarasinghe, H. E., Clayton, C. I., & Mallon, E. B. (2014). Methylation and worker reproduction in the bumble-bee (*Bombus terrestris*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *281*(1780), 20132502–20132502. https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2502

Aravin, A. A., Hannon, G. J., & Brennecke, J. (2007). The Piwi-piRNA pathway provides an adaptive defense in the transposon arms race. *Science (New York, N.Y.)*, *318*(5851), 761–764. https://doi.org/10.1126/science.1146484

Ardura, A., Zaiko, A., Morán, P., Planes, S., & Garcia-Vazquez, E. (2017). Epigenetic signatures of invasive status in populations of marine invertebrates. *Scientific Reports*, *7*, 42193. https://doi.org/10.1038/srep42193

Baker, H. G., & Stebbins, G. L. (1965). *The genetics of colonizing species: Proceedings of the first international union of biological sciences symposia on general biology*. New York, NY: Academic Press.

Baltazar-Soares, M., Paiva, F., Chen, Y., Zhan, A., & Briski, E. (2017). Diversity and distribution of genetic variation in gammarids: Comparing patterns between invasive and non-invasive species.

Ecology and Evolution, *7*(19), 7687–7698. https://doi.org/10.1002/ece3.3208

Becker, C., Hagmann, J., Müller, J., Koenig, D., Stegle, O., Borgwardt, K., & Weigel, D. (2011). Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature*, *480*(7376), 245–249. https://doi.org/10.1038/nature10555

Belyayev, A. (2014). Bursts of transposable elements as an evolutionary driving force. *Journal of Evolutionary Biology*, *27*(12), 2573–2584. https://doi.org/10.1111/jeb.12513

Bewick, A. J., Vogel, K. J., Moore, A. J., & Schmitz, R. J. (2017). Evolution of DNA methylation across insects. *Molecular Biology and Evolution*, *34*, 654–665, https://doi.org/10.1093/molbev/msw264

Billet, K., Genitoni, J., Bozec, M., Renault, D., & Barloy, D. (2018). Aquatic and terrestrial morphotypes of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora*, show distinct morphological and metabolomic responses. *Ecology and Evolution*, *8*(5), 2568–2579. https://doi.org/10.1002/ece3.3848

Blake, G. E., & Watson, E. D. (2016). Unravelling the complex mechanisms of transgenerational epigenetic inheritance. *Current Opinion in Chemical Biology*, *33*, 101–107. https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2016.06.008

Bock, D. G., Caseys, C., Cousens, R. D., Hahn, M. A., Heredia, S. M., Hübner, S., … Rieseberg, L. H. (2015). What we still don't know about invasion genetics. *Molecular Ecology*, *24*(9), 2277–2297. https://doi.org/10.1111/mec.13032

Bossdorf, O., Arcuri, D., Richards, C. L., & Pigliucci, M. (2010). Experimental alteration of DNA methylation affects the phenotypic plasticity of ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. *Evolutionary Ecology*, *24*(3), 541–553. https://doi.org/10.1007/s10682-010-9372-7

Bradshaw, A. D. (1965). Evolutionary significance of phenotypic plasticity in plants. In E.W. Caspari & J.M. Thoday (Eds.) *Advances in genetics* (Vol. *13*, pp. 115–155). New York, London: Elsevier. https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60048-6

Bräutigam, K., Vining, K. J., Lafon-Placette, C., Fossdal, C. G., Mirouze, M., Marcos, J. G., … Cervera, M.-T. (2013). Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. *Ecology and Evolution*, *3*(2), 399–415. https://doi.org/10.1002/ece3.461

Capy, P., Gasperi, G., Biémont, C., & Bazin, C. (2000). Stress and transposable elements: Co-evolution or useful parasites? *Heredity*, *85*(2), 101–106. https://doi.org/10.1046/j.1365-2540.2000.00751.x

Casacuberta, E., & González, J. (2013). The impact of transposable elements in environmental adaptation. *Molecular Ecology*, *22*(6), 1503–1517. https://doi.org/10.1111/mec.12170

Castel, S. E., & Martienssen, R. A. (2013). RNA interference in the nucleus: Roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics*, *14*(2), 100–112. https://doi.org/10.1038/nrg3355

Chown, S. L., Slabber, S., McGeoch, M. A., Janion, C., & Leinaas, H. P. (2007). Phenotypic plasticity mediates climate change responses among invasive and indigenous arthropods. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *274*(1625), 2531–2537. https://doi.org/10.1098/rspb.2007.0772

Chuong, E. B., Elde, N. C., & Feschotte, C. (2017). Regulatory activities of transposable elements: From conflicts to benefits. *Nature Reviews Genetics*, *18*(2), 71–86. https://doi.org/10.1038/nrg.2016.139

Conde, D., Le Gac, A.-L., Perales, M., Dervinis, C., Kirst, M., Maury, S., … Allona, I. (2017). Chilling-responsive DEMETER-LIKE DNA demethylase mediates in poplar bud break: Role of active DNA demethylase in trees' bud break. *Plant, Cell & Environment*, *40*(10), 2236–2249. https://doi.org/10.1111/pce.13019

Corl, A., Bi, K., Luke, C., Challa, A. S., Stern, A. J., Sinervo, B., & Nielsen, R. (2018). The genetic basis of adaptation following plastic changes in coloration in a novel environment. *Current Biology*, *28*(18), 2970–2977.e7. https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.06.075

Cortijo, S., Wardenaar, R., Colome-Tatche, M., Gilly, A., Etcheverry, M., Labadie, K., … Johannes, F. (2014). Mapping the epigenetic basis of complex traits. *Science*, *343*(6175), 1145–1148. https://doi.org/10.1126/science.1248127

Crisp, P. A., Ganguly, D., Eichten, S. R., Borevitz, J. O., & Pogson, B. J. (2016). Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science Advances*, *2*(2), e1501340–e1501340. https://doi.org/10.1126/sciadv.1501340

Daehler, C. C. (2003). Performance comparisons of co-occurring native and alien invasive plants: Implications for conservation and restoration. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *34*(1), 183–211. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.34.011802.132403

Davidson, A. M., Jennions, M., & Nicotra, A. B. (2011). Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and if so, is it adaptive? A meta-analysis: Invasive species have higher phenotypic plasticity. *Ecology Letters*, *14*(4), 419–431. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2011.01596.x

Debat, V., & David, P. (2001). Mapping phenotypes: Canalization, plasticity and developmental stability. *Trends in Ecology & Evolution*, *16*(10), 555–561. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(01)02266-2

Dennenmoser, S., Sedlazeck, F. J., Iwaszkiewicz, E., Li, X. Y., Altmüller, J., & Nolte, A. W. (2017). Copy number increases of transposable elements and protein-coding genes in an invasive fish of hybrid origin. *Molecular Ecology*, *26*(18), 4712–4724. https://doi.org/10.1111/mec.14134

Dlugosch, K. M., & Parker, I. M. (2008). Founding events in species invasions: Genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Molecular Ecology*, *17*(1), 431–449. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03538.x

Duncan, E. J., Gluckman, P. D., & Dearden, P. K. (2014). Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype? *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *322*(4), 208–220. https://doi.org/10.1002/jez.b.22571

Early, R., Bradley, B. A., Dukes, J. S., Lawler, J. J., Olden, J. D., Blumenthal, D. M., … Tatem, A. J. (2016). Global threats from invasive alien species in the twenty-first century and national response capacities. *Nature Communications*, *7*, 12485. https://doi.org/10.1038/ncomms12485

Elgin, S. C. R., & Reuter, G. (2013). Position-effect variegation, heterochromatin formation, and gene silencing in *Drosophila*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *5*(8), a017780. https://doi.org/10.1101/cshperspect.a017780

Estoup, A., Ravigné, V., Hufbauer, R., Vitalis, R., Gautier, M., & Facon, B. (2016). Is there a genetic paradox of biological invasion? *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, *47*(1), 51–72. https://doi.org/10.1146/annurev-ecolsys-121415-032116

Fablet, M., Akkouche, A., Braman, V., & Vieira, C. (2014). Variable expression levels detected in the *Drosophila* effectors of piRNA biogenesis. *Gene*, *537*(1), 149–153. https://doi.org/10.1016/j.gene.2013.11.095

Fablet, M., Salces-Ortiz, J., Menezes, B. F., Roy, M., & Vieira, C. (2017). Self and nonself from a genomic perspective: Transposable elements. In E.D. Pontarotti (Ed.,) *Evolutionary biology: Self/nonself evolution, species and complex traits evolution, methods and concepts* (pp. 111–128). Cham, NY: Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-319-61569-1_6

Fablet, M., & Vieira, C. (2011). Evolvability, epigenetics and transposable elements. *Biomolecular Concepts*, *2*(5), 333–341. https://doi.org/10.1515/BMC.2011.035

Facon, B., Crespin, L., Loiseau, A., Lombaert, E., Magro, A., & Estoup, A. (2011). Can things get worse when an invasive species hybridizes? The harlequin ladybird *Harmonia axyridis* in France as a case study: Postinvasion hybridization in *Harmonia axyridis*. *Evolutionary Applications*, *4*(1), 71–88. https://doi.org/10.1111/j.1752-4571.2010.00134.x

Foust, C. M., Preite, V., Schrey, A. W., Alvarez, M., Robertson, M. H., Verhoeven, K. J. F., & Richards, C. L. (2016). Genetic and epigenetic

differences associated with environmental gradients in replicate populations of two salt marsh perennials. *Molecular Ecology*, *25*(8), 1639–1652. https://doi.org/10.1111/mec.13522

Gao, L., Geng, Y., Li, B., Chen, J., & Yang, J. (2010). Genome-wide DNA methylation alterations of *Alternanthera philoxeroides* in natural and manipulated habitats: Implications for epigenetic regulation of rapid responses to environmental fluctuation and phenotypic variation: Environmental epigenetics of *A. philoxeroides*. *Plant, Cell & Environment*, *33*(11), 1820–1827. https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.2010.02186.x

Ghalambor, C. K., Hoke, K. L., Ruell, E. W., Fischer, E. K., Reznick, D. N., & Hughes, K. A. (2015). Non-adaptive plasticity potentiates rapid adaptive evolution of gene expression in nature. *Nature*, *525*(7569), 372–375. https://doi.org/10.1038/nature15256

Ghalambor, C. K., McKay, J. K., Carroll, S. P., & Reznick, D. N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology*, *21*(3), 394–407. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01283.x

Gibert, J.-M., Peronnet, F., & Schlötterer, C. (2007). Phenotypic plasticity in *Drosophila* pigmentation caused by temperature sensitivity of a chromatin regulator network. *PLoS Genetics*, *3*(2), e30. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030030

Gibert, P., Hill, M., Pascual, M., Plantamp, C., Terblanche, J. S., Yassin, A., & Sgrò, C. M. (2016). *Drosophila* as models to understand the adaptive process during invasion. *Biological Invasions*, *18*, 1089–1103. https://doi.org/10.1007/s10530-016-1087-4

Godoy, O., Valladares, F., & Castro-Díez, P. (2011). Multispecies comparison reveals that invasive and native plants differ in their traits but not in their plasticity: Phenotypic plasticity and invasiveness. *Functional Ecology*, *25*(6), 1248–1259. https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2011.01886.x

Gómez-Díaz, E., Jordà, M., Peinado, M. A., & Rivero, A. (2012). Epigenetics of host–pathogen interactions: The road ahead and the road behind. *PLoS Pathogens*, *8*(11), e1003007. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003007

González, J., Karasov, T. L., Messer, P. W., & Petrov, D. A. (2010). Genome-wide patterns of adaptation to temperate environments associated with transposable elements in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, *6*(4), e1000905. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000905

Goubert, C., Henri, H., Minard, G., Valiente Moro, C., Mavingui, P., Vieira, C., & Boulesteix, M. (2017). High-throughput sequencing of transposable element insertions suggests adaptive evolution of the invasive Asian tiger mosquito towards temperate environments. *Molecular Ecology*, *26*(15), 3968–3981. https://doi.org/10.1111/mec.14184

Goubert, C., Modolo, L., Vieira, C., ValienteMoro, C., Mavingui, P., & Boulesteix, M. (2015). De novo assembly and annotation of the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) repeatome with dnaPipeTE from raw genomic reads and comparative analysis with the yellow fever mosquito (*Aedes aegypti*). *Genome Biology and Evolution*, *7*(4), 1192–1205. https://doi.org/10.1093/gbe/evv050

Guarino, F., Cicatelli, A., Brundu, G., Heinze, B., & Castiglione, S. (2015). Epigenetic diversity of clonal white poplar (*Populus alba* L.) populations: Could methylation support the success of vegetative reproduction strategy? *PLoS ONE*, *10*(7), e0131480. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131480

Guerreiro, M. P. G. (2012). What makes transposable elements move in the *Drosophila* genome? *Heredity*, *108*(5), 461–468. https://doi.org/10.1038/hdy.2011.89

Guio, L., Barrón, M. G., & González, J. (2014). The transposable element *Bari-Jheh* mediates oxidative stress response in *Drosophila*. *Molecular Ecology*, *23*(8), 2020–2030. https://doi.org/10.1111/mec.12711

Guio, L., Vieira, C., & González, J. (2018). Stress affects the epigenetic marks added by natural transposable element insertions in *Drosophila melanogaster*. *Scientific Reports*, *8*(1), 12197. https://doi.org/10.1038/s41598-018-30491-w

Hayashi, K., & Yoshida, H. (2009). Refunctionalization of the ancient rice blast disease resistance gene *Pit* by the recruitment of a retrotransposon as a promoter. *The Plant Journal*, *57*(3), 413–425. https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2008.03694.x

Heard, E., & Martienssen, R. A. (2014). Transgenerational epigenetic inheritance: Myths and mechanisms. *Cell*, *157*(1), 95–109. https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.02.045

Herrera, C. M., & Bazaga, P. (2016). Genetic and epigenetic divergence between disturbed and undisturbed subpopulations of a Mediterranean shrub: A 20-year field experiment. *Ecology and Evolution*, *6*(11), 3832–3847. https://doi.org/10.1002/ece3.2161

Horváth, V., Merenciano, M., & González, J. (2017). Revisiting the relationship between transposable elements and the eukaryotic stress response. *Trends in Genetics*, *33*(11), 832–841. https://doi.org/10.1016/j.tig.2017.08.007

Huang, X., Li, S., Ni, P., Gao, Y., Jiang, B., Zhou, Z., & Zhan, A. (2017). Rapid response to changing environments during biological invasions: DNA methylation perspectives. *Molecular Ecology*, *26*(23), 6621–6633. https://doi.org/10.1111/mec.14382

Huey, R. B., Gilchrist, G. W., & Hendry, A. P.(2005). Using invasive species to study evolution, In SAX, Dov F., STACHOWICZ, John J., GAINES, Steven Dean, p. 139-164. *Species invasions: Insights to ecology, evolution and biogeography*, Sunderland, MA: Sunderland, Sinauer Associates Incorporated, p. 26.

Ito, H., Kim, J.-M., Matsunaga, W., Saze, H., Matsui, A., Endo, T. A., … Seki, M. (2016). A stress-activated transposon in *Arabidopsis* induces transgenerational abscisic acid insensitivity. *Scientific Reports*, *6*(1), 23181. https://doi.org/10.1038/srep23181

Johannes, F., Porcher, E., Teixeira, F. K., Saliba-Colombani, V., Simon, M., Agier, N., … Colot, V. (2009). Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genetics*, *5*(6), e1000530. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000530

Kawakatsu, T., Huang, S.-S., Jupe, F., Sasaki, E., Schmitz, R. J., Urich, M. A., … Zhou, X. (2016). Epigenomic diversity in a global collection of *Arabidopsis thaliana* accessions. *Cell*, *166*(2), 492–505. https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.06.044

Kidwell, M. G., & Lisch, D. R. (2001). Perspective: Transposable elements, parasitic DNA, and genome evolution. *Evolution; International Journal of Organic Evolution*, *55*(1), 1–24. https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2001.tb01268.x

Kim, J. M., Vanguri, S., Boeke, J. D., Gabriel, A., & Voytas, D. F. (1998). Transposable elements and genome organization: A comprehensive survey of retrotransposons revealed by the complete *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *Genome Research*, *8*(5), 464–478. https://doi.org/10.1101/gr.8.5.464

Kooke, R., Johannes, F., Wardenaar, R., Becker, F., Etcheverry, M., Colot, V., … Keurentjes, J. J. B. (2015). Epigenetic basis of morphological variation and phenotypic plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell Online*, *27*(2), 337–348. https://doi.org/10.1105/tpc.114.133025

Kreß, A., Oppold, A.-M., Kuch, U., Oehlmann, J., & Müller, R. (2017). Cold tolerance of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* and its response to epigenetic alterations. *Journal of Insect Physiology*, *99*, 113–121. https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2017.04.003

Kronholm, I., Johannesson, H., & Ketola, T. (2016). Epigenetic control of phenotypic plasticity in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *G3: Genes|genomes|genetics*, *6*, 4009–4022. https://doi.org/10.1534/g3.116.033860.

Lafon-Placette, C., Le Gac, A.-L., Chauveau, D., Segura, V., Delaunay, A., Lesage-Descauses, M.-C., … Maury, S. (2018). Changes in the epigenome and transcriptome of the poplar shoot apical meristem in response to water availability affect preferentially hormone pathways. *Journal of Experimental Botany*, *69*(3), 537–551. https://doi.org/10.1093/jxb/erx409

Lämke, J., & Bäurle, I. (2017). Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress

memory in plants. *Genome Biology*, *18*(1), 124. https://doi.org/10.1186/s13059-017-1263-6.

Lanciano, S., & Mirouze, M. (2018). Transposable elements: All mobile, all different, some stress responsive, some adaptive? *Current Opinion in Genetics & Development*, *49*, 106–114. https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.04.002

Lande, R., & Arnold, S. J. (1983). The measurement of selection on correlated characters. *Evolution*, *37*(6), 1210. https://doi.org/10.2307/2408842

Law, J. A., & Jacobsen, S. E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics*, *11*(3), 204–220. https://doi.org/10.1038/nrg2719

Le Gac, A.-L., Lafon-Placette, C., Chauveau, D., Segura, V., Delaunay, A., Fichot, R., … Maury, S. (2018). Winter-dormant shoot apical meristem in poplar trees shows environmental epigenetic memory. *Journal of Experimental Botany*, *69*(20), 4821–4837. https://doi.org/10.1093/jxb/ery271

Lee, Y. C. G. (2015). The role of piRNA-mediated epigenetic silencing in the population dynamics of transposable elements in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Genetics*, *11*(6), e1005269. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005269

Lerat, E., Fablet, M., Modolo, L., Lopez-Maestre, H., & Vieira, C. (2017). TEtools facilitates big data expression analysis of transposable elements and reveals an antagonism between their activity and that of piRNA genes. *Nucleic Acids Research*, *45*, e17. https://doi.org/10.1093/nar/gkw953

Liebl, A. L., Schrey, A. W., Richards, C. L., & Martin, L. B. (2013). Patterns of DNA methylation throughout a range expansion of an introduced songbird. *Integrative and Comparative Biology*, *53*(2), 351–358. https://doi.org/10.1093/icb/ict007

Lin, X., Barton, S., & Holbrook, J. D. (2016). How to make DNA methylome wide association studies more powerful. *Epigenomics*, *8*(8), 1117–1129. https://doi.org/10.2217/epi-2016-0017

Lisch, D. (2013). How important are transposons for plant evolution? *Nature Reviews Genetics*, *14*(1), 49–61. https://doi.org/10.1038/nrg3374

Liu, L., Pei, C., Liu, S., Guo, X., Du, N., & Guo, W. (2018). Genetic and epigenetic changes during the invasion of a cosmopolitan species (*Phragmites australis*). *Ecology and Evolution*, *8*(13), 6615–6624. https://doi.org/10.1002/ece3.4144

Lodge, D. M. (1993). Biological invasions: Lessons for ecology. *Trends in Ecology & Evolution*, *8*(4), 133–137. https://doi.org/10.1016/0169-5347(93)90025-K

Magwire, M. M., Bayer, F., Webster, C. L., Cao, C., & Jiggins, F. M. (2011). Successive increases in the resistance of *Drosophila* to viral infection through a transposon insertion followed by a duplication. *PLoS Genetics*, *7*(10), e1002337. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002337

Mateo, L., Ullastres, A., & González, J. (2014). A transposable element insertion confers xenobiotic resistance in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, *10*(8), e1004560. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004560

Matsui, T., Leung, D., Miyashita, H., Maksakova, I. A., Miyachi, H., Kimura, H., … Shinkai, Y. (2010). Proviral silencing in embryonic stem cells requires the histone methyltransferase ESET. *Nature*, *464*(7290), 927–931. https://doi.org/10.1038/nature08858

Matzek, V. (2012). Trait values, not trait plasticity, best explain invasive species' performance in a changing environment. *PLoS ONE*, *7*(10), e48821. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048821

Mauch-Mani, B., Baccelli, I., Luna, E., & Flors, V. (2017). Defense priming: An adaptive part of induced resistance. *Annual Review of Plant Biology*, *68*(1), 485–512. https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-042916-041132

McClintock, B. (1950). The origin and behavior of mutable loci in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *36*(6), 344–355. https://doi.org/10.1073/pnas.36.6.344

McCue, A. D., Nuthikattu, S., Reeder, S. H., & Slotkin, R. K. (2012). Gene expression and stress response mediated by the epigenetic regulation of a transposable element small RNA. *PLoS Genetics*, *8*(2), e1002474. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002474

Menezes, B. F., Salces-Ortiz, J., Muller, H., Burlet, N., Martinez, S., Fablet, M., & Vieira, C. (2018). An attempt to select non-genetic variation in resistance to starvation and reduced chill coma recovery time in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Experimental Biology*, *221*, jeb186254. https://doi.org/10.1242/jeb.186254

Merenciano, M., Ullastres, A., de Cara, M. A. R., Barrón, M. G., & González, J. (2016). Multiple independent retroelement insertions in the promoter of a stress response gene have variable molecular and functional effects in *Drosophila*. *PLoS Genetics*, *12*(8), e1006249. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006249

Meyer, P. (2015). Epigenetic variation and environmental change. *Journal of Experimental Botany*, *66*(12), 3541–3548. https://doi.org/10.1093/jxb/eru502

Meyer, P. (2018). Chapter one—Epigenetics—A historical perspective. In M. Mirouze, E. Bucher, & P. Gallusci (Eds.), *Advances in botanical research*, Vol. *88* (pp. 1–19). New York, NY: Academic Press. https://doi.org/10.1016/bs.abr.2018.08.003

Naito, K., Zhang, F., Tsukiyama, T., Saito, H., Hancock, C. N., Richardson, A. O., … Wessler, S. R. (2009). Unexpected consequences of a sudden and massive transposon amplification on rice gene expression. *Nature*, *461*(7267), 1130–1134. https://doi.org/10.1038/nature08479

Nätt, D., & Thorsell, A. (2016). Stress-induced transposon reactivation: A mediator or an estimator of allostatic load? *Environmental Epigenetics*, *2*(3), 1–7. https://doi.org/10.1093/eep/dvw015

Nyamukondiwa, C., Kleynhans, E., & Terblanche, J. S. (2010). Phenotypic plasticity of thermal tolerance contributes to the invasion potential of Mediterranean fruit flies (*Ceratitis capitata*). *Ecological Entomology*, *35*(5), 565–575. https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2010.01215.x

Oliver, K. R., & Greene, W. K. (2009). Transposable elements: Powerful facilitators of evolution. *BioEssays*, *31*(7), 703–714. https://doi.org/10.1002/bies.200800219

Oliver, K. R., McComb, J. A., & Greene, W. K. (2013). Transposable elements: Powerful contributors to angiosperm evolution and diversity. *Genome Biology and Evolution*, *5*(10), 1886–1901. https://doi.org/10.1093/gbe/evt141

Oppold, A., Kreß, A., Vanden Bussche, J., Diogo, J. B., Kuch, U., Oehlmann, J., … Müller, R. (2015). Epigenetic alterations and decreasing insecticide sensitivity of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *122*, 45–53. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2015.06.036

Orr, H. A. (2005). The genetic theory of adaptation: A brief history. *Nature Reviews Genetics*, *6*(2), 119–127. https://doi.org/10.1038/nrg1523

Palacio-López, K., & Gianoli, E. (2011). Invasive plants do not display greater phenotypic plasticity than their native or non-invasive counterparts: A meta-analysis. *Oikos*, *120*(9), 1393–1401. https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2010.19114.x

Pedersen, I. M., & Zisoulis, D. G. (2016). Transposable elements and miRNA: Regulation of genomic stability and plasticity. *Mobile Genetic Elements*, *6*(3), e1175537. https://doi.org/10.1080/2159256X.2016.1175537

Peischl, S., & Excoffier, L. (2015). Expansion load: Recessive mutations and the role of standing genetic variation. *Molecular Ecology*, *24*(9), 2084–2094. https://doi.org/10.1111/mec.13154

Piersma, T., & Drent, J. (2003). Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. *Trends in Ecology & Evolution*, *18*(5), 228–233. https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00036-3

Pigliucci, M. (2005). Evolution of phenotypic plasticity: Where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution*, *20*(9), 481–486. https://doi.org/10.1016/j.tree.2005.06.001

Pigliucci, M., Murren, C. J., & Schlichting, C. D. (2006). Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. *Journal of Experimental Biology*, *209*(12), 2362–2367. https://doi.org/10.1242/jeb.02070

Pimentel, D., McNair, S., Janecka, J., Wightman, J., Simmonds, C., O'Connell, C., … Tsomondo, T. (2001). Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. *Agriculture, Ecosystem & Environment*, *84*, 1–20.

Preite, V., Snoek, L. B., Oplaat, C., Biere, A., van der Putten, W. H., & Verhoeven, K. J. F. (2015). The epigenetic footprint of poleward range-expanding plants in apomictic dandelions. *Molecular Ecology*, *24*(17), 4406–4418. https://doi.org/10.1111/mec.13329

Prentis, P. J., Wilson, J. R. U., Dormontt, E. E., Richardson, D. M., & Lowe, A. J. (2008). Adaptive evolution in invasive species. *Trends in Plant Science*, *13*(6), 288–294. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2008.03.004

Provataris, P., Meusemann, K., Niehuis, O., Grath, S., & Misof, B. (2018). Signatures of DNA methylation across insects suggest reduced DNA methylation levels in Holometabola. *Genome Biology and Evolution*, *10*(4), 1185–1197. https://doi.org/10.1093/gbe/evy066

Pu, C., & Zhan, A. (2017). Epigenetic divergence of key genes associated with water temperature and salinity in a highly invasive model ascidian. *Biological Invasions*, *19*(7), 2015–2028. https://doi.org/10.1007/s10530-017-1409-1

Pumplin, N., & Voinnet, O. (2013). RNA silencing suppression by plant pathogens: Defence, counter-defence and counter-counter-defence. *Nature Reviews Microbiology*, *11*(11), 745–760. https://doi.org/10.1038/nrmicro3120

Raser, J. M., & O'Shea, E. K. (2005). Noise in gene expression: Origins, consequences, and control. *Science (New York, N.Y.)*, *309*(5743), 2010–2013. https://doi.org/10.1126/science.1105891

Rebollo, R., Karimi, M. M., Bilenky, M., Gagnier, L., Miceli-Royer, K., Zhang, Y., … Mager, D. L. (2011). Retrotransposon-induced heterochromatin spreading in the mouse revealed by insertional polymorphisms. *PLoS Genetics*, *7*(9), e1002301. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002301

Reinders, J., & Paszkowski, J. (2009). Unlocking the *Arabidopsis* epigenome. *Epigenetics*, *4*(8), 557–563. https://doi.org/10.4161/epi.4.8.10347

Rey, O., Danchin, E., Mirouze, M., Loot, C., & Blanchet, S. (2016). Adaptation to global change: A transposable element–epigenetics perspective. *Trends in Ecology & Evolution*, *31*(7), 514–526. https://doi.org/10.1016/j.tree.2016.03.013

Richards, C. L., Bossdorf, O., Muth, N. Z., Gurevitch, J., & Pigliucci, M. (2006). Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. *Ecology Letters*, *9*(8), 981–993. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2006.00950.x

Richards, C. L., Schrey, A. W., & Pigliucci, M. (2012). Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation. *Ecology Letters*, *15*(9), 1016–1025. https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2012.01824.x

Richards, E. J. (2006). Inherited epigenetic variation—Revisiting soft inheritance. *Nature Reviews Genetics*, *7*(5), 395–401. https://doi.org/10.1038/nrg1834

Schlichting, C. D., & Wund, M. A. (2014). Phenotypic plasticity and epigenetic marking: An assessment of evidence for genetic accommodation: Special section. *Evolution*, *68*(3), 656–672. https://doi.org/10.1111/evo.12348

Schmid, M. W., Heichinger, C., Coman Schmid, D., Guthörl, D., Gagliardini, V., Bruggmann, R., … Grossniklaus, U. (2018). Contribution of epigenetic variation to adaptation in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, *9*(1), 4446. https://doi.org/10.1038/s41467-018-06932-5

Schmitz, R. J., Schultz, M. D., Lewsey, M. G., O'Malley, R. C., Urich, M. A., Libiger, O., … Ecker, J. R. (2011). Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants. *Science*, *334*(6054), 369–373. https://doi.org/10.1126/science.1212959

Schnable, P. S., Ware, D., Fulton, R. S., Stein, J. C., Wei, F., Pasternak, S., … Wilson, R. K. (2009). The B73 Maize genome: Complexity, diversity, and dynamics. *Science*, *326*(5956), 1112–1115. https://doi.org/10.1126/science.1178534

Schrader, L., Kim, J. W., Ence, D., Zimin, A., Klein, A., Wyschetzki, K., … Oettler, J. (2014). Transposable element islands facilitate adaptation to novel environments in an invasive species. *Nature Communications*, *5*, 5495. https://doi.org/10.1038/ncomms6495

Schrey, A. W., Coon, C. A. C., Grispo, M. T., Awad, M., Imboma, T., McCoy, E. D., … Martin, L. B. (2012). Epigenetic variation may compensate for decreased genetic variation with introductions: A case study using house sparrows (*Passer domesticus*) on two continents. *Genetics Research International*, *2012*, 1–7. https://doi.org/10.1155/2012/979751

Sexton, J. P., Mckay, J. K., & Sala, A. (2002). Plasticity and genetic diversity may allow saltcedar to invade cold climates in north America. *Ecological Applications*, *12*(6), *9*. https://doi.org/10.1890/1051-0761(2002)012[1652:PAGDMA]2.0.CO;2

Seymour, D. K., & Becker, C. (2017). The causes and consequences of DNA methylome variation in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *36*, 56–63. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.01.005

Sheldon, E. L., Schrey, A., Andrew, S. C., Ragsdale, A., & Griffith, S. C. (2018). Epigenetic and genetic variation among three separate introductions of the house sparrow (*Passer domesticus*) into Australia. *Royal Society Open Science*, *5*(4), 172185. https://doi.org/10.1098/rsos.172185

Sienski, G., Dönertas, D., & Brennecke, J. (2012). Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell*, *151*(5), 964–980. https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.10.040

Simberloff, D., & Rejmanek, M. (2011). *Encyclopedia of biological invasions*. Oakland, CA: University of California Press.

Slotkin, R. K., & Martienssen, R. (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature Reviews Genetics*, *8*(4), 272–285. https://doi.org/10.1038/nrg2072

Song, X., & Cao, X. (2017). Transposon-mediated epigenetic regulation contributes to phenotypic diversity and environmental adaptation in rice. *Current Opinion in Plant Biology*, *36*, 111–118. https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.02.004

Song, Y., Liu, L., Feng, Y., Wei, Y., Yue, X., He, W., … An, L. (2015). Chilling- and freezing- induced alterations in cytosine methylation and its association with the cold tolerance of an alpine subnival plant, *Chorispora bungeana*. *PLoS ONE*, *10*(8), e0135485. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135485

Spannhoff, A., Kim, Y. K., Raynal, N.-M., Gharibyan, V., Su, M.-B., Zhou, Y.-Y., … Bedford, M. T. (2011). Histone deacetylase inhibitor activity in royal jelly might facilitate caste switching in bees. *EMBO Reports*, *12*(3), 238–243. https://doi.org/10.1038/embor.2011.9

Stapley, J., Feulner, P. G. D., Johnston, S. E., Santure, A. W., & Smadja, C. M. (2017). Variation in recombination frequency and distribution across eukaryotes: Patterns and processes. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, *372*(1736), 20160455. https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0455

Stapley, J., Santure, A. W., & Dennis, S. R. (2015). Transposable elements as agents of rapid adaptation may explain the genetic paradox of invasive species. *Molecular Ecology*, *24*(9), 2241–2252. https://doi.org/10.1111/mec.13089

Sultan, S. E. (2001). Phenotypic plasticity for fitness components in *Polygonum* species of contrasting ecological breadth. *Ecology*, *82*(2), 328–343.

Theoharides, K. A., & Dukes, J. S. (2007). Plant invasion across space and time: Factors affecting nonindigenous species success during four stages of invasion. *New Phytologist*, *176*(2), 256–273. https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02207.x

Trussell, G. C., & Smith, L. D. (2000). Induced defenses in response to an invading crab predator: An explanation of historical and geographic

phenotypic change. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(5), 2123–2127. https://doi.org/10.1073/pnas.040423397

van der Graaf, A., Wardenaar, R., Neumann, D. A., Taudt, A., Shaw, R. G., Jansen, R. C., … Johannes, F. (2015). Rate, spectrum, and evolutionary dynamics of spontaneous epimutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *112*(21), 6676–6681. https://doi.org/10.1073/pnas.1424254112

van Gurp, T. P., Wagemaker, N. C. A. M., Wouters, B., Vergeer, P., Ouborg, J. N. J., & Verhoeven, K. J. F. (2016). epiGBS: Reference-free reduced representation bisulfite sequencing. *Nature Methods*, *13*(4), 322–324. https://doi.org/10.1038/nmeth.3763

Vieira, C., Aubry, P., Lepetit, D., & Biémont, C. (1998). A temperature cline in copy number for 412 but not roo/B104 retrotransposons in populations of *Drosophila simulans*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *265*(1402), 1161–1165. https://doi.org/10.1098/rspb.1998.0413

Villanueva-Cañas, J. L., Rech, G. E., de Cara, M. A. R., & González, J. (2017). Beyond SNPs: How to detect selection on transposable element insertions. *Methods in Ecology and Evolution*, *8*(6), 728–737. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12781

Vitte, C., Fustier, M.-A., Alix, K., & Tenaillon, M. I. (2014). The bright side of transposons in crop evolution. *Briefings in Functional Genomics*, *13*(4), 276–295. https://doi.org/10.1093/bfgp/elu002

Vogt, G. (2017). Facilitation of environmental adaptation and evolution by epigenetic phenotype variation: Insights from clonal, invasive, polyploid, and domesticated animals. *Environmental Epigenetics*, *3*(1), dvx002. https://doi.org/10.1093/eep/dvx002

Wagner, G. P., & Altenberg, L. (1996). Perspective: Complex adaptations and the evolution of evolvability. *Evolution*, *50*(3), 967–976. https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1996.tb02339.x

Walsh, C. P., Chaillet, J. R., & Bestor, T. H. (1998). Transcription of IAP endogenous retroviruses is constrained by cytosine methylation. *Nature Genetics*, *20*, 116. https://doi.org/10.1038/2413

Wang, L., & Jordan, I. K. (2018). Transposable element activity, genome regulation and human health. *Current Opinion in Genetics & Development*, *49*, 25–33. https://doi.org/10.1016/j.gde.2018.02.006

Wellband, K. W., Pettitt-Wade, H., Fisk, A. T., & Heath, D. D. (2017). Differential invasion success in aquatic invasive species: The role of within- and among-population genetic diversity. *Biological Invasions*, *19*(9), 2609–2621. https://doi.org/10.1007/s10530-017-1471-8

West-Eberhard, M. J. (2005). Phenotypic accommodation: Adaptive innovation due to developmental plasticity. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, *304B*(6), 610–618. https://doi.org/10.1002/jez.b.21071

Xie, H. J., Li, H., Liu, D., Dai, W. M., He, J. Y., Lin, S., … Qiang, S. (2015). *ICE1* demethylation drives the range expansion of a plant invader through cold tolerance divergence. *Molecular Ecology*, *24*(4), 835–850. https://doi.org/10.1111/mec.13067

Yamauchi, T., Johzuka-Hisatomi, Y., Terada, R., Nakamura, I., & Iida, S. (2014). The *MET1b* gene encoding a maintenance DNA methyltransferase is indispensable for normal development in rice. *Plant Molecular Biology*, *85*(3), 219–232. https://doi.org/10.1007/s11103-014-0178-9

Zhang, H., Tao, Z., Hong, H., Chen, Z., Wu, C., Li, X., … Wang, S. (2016). Transposon-derived small RNA is responsible for modified function of WRKY45 locus. *Nature Plants*, *2*(3), 16016. https://doi.org/10.1038/nplants.2016.16

Zhang, Y.-Y., Fischer, M., Colot, V., & Bossdorf, O. (2013). Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. *New Phytologist*, *197*(1), 314–322. https://doi.org/10.1111/nph.12010

Zhang, Y.-Y., Parepa, M., Fischer, M., & Bossdorf, O. (2016). Epigenetics of colonizing species? A study of Japanese knotweed in central Europe. In S. C. H. Barrett, R. I. Colautti, K. M. Dlugosch, & L. H. Rieseberg (Eds.), Invasion genetics (pp. 328–340). Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd. https://doi.org/10.1002/9781119072799.ch19

SUPPORTING INFORMATION

Additional supporting information may be found online in the Supporting Information section at the end of the article.

How to cite this article: Marin P, Genitoni J, Barloy D, et al. Biological invasion: The influence of the hidden side of the (epi)genome. *Funct Ecol*. 2019;00:1–16. https://doi.org/10.1111/1365-2435.13317

III. Résultats : Mise en évidence expérimentale du rôle de l'épigénome dans la flexibilité des morphotypes terrestre et aquatique de la jussie.

1. Présentation synthétique de la publication Genitoni *et al*. en révision

La capacité des plantes invasives à coloniser rapidement de nouveaux milieux pose la question de leurs sources de flexibilité. Rey *et al.* (2016) ainsi que Marin/Genitoni *et al.* (2019) présentent les éléments transposables et les mécanismes épigénétiques comme une source de flexibilité qui pourrait participer à cette. La méthylation de l'ADN intervient dans nombreux processus du développement des plantes, mais également dans la réponse à l'environnement. Pourtant, il existe encore peu d'études sur les modèles invasifs.

L'objectif de ce travail est d'étudier la méthylation de l'ADN chez une plante invasive dans la réponse au changement de milieu. *Ludwigia grandiflora, est* une plante invasive aquatique pour laquelle un morphotype terrestre a récemment été décrit. Cette invasion secondaire fait de cette espèce un bon candidat pour l'étude des mécanismes d'adaptation rapide. (Haury *et al.*, 2014; Billet *et al.*, 2018). Nous faisons l'hypothèse que les morphotypes terrestre et aquatique de la jussie en réponse au changement de milieu (terrestre ou aquatique) présentent des différences dans leur pourcentage de méthylation.

Pour tester cette hypothèse, nous avons adopté une approche corrélative basée sur l'utilisation d'un agent pharmacologique hypométhylant, appelé zébularine. L'effet de ce traitement qui doit diminuer artificiellement le niveau de méthylation de l'ADN a été ensuite analysé. Ainsi, nous avons sur les tissus néo-formés (feuilles et racines) (1) évalué le pourcentage de méthylation global (par HPLC) des morphotypes en condition aquatique et terrestre, puis nous avons (2) quantifié les impacts de l'hypométhylation sur des traits physiologiques (morphologie et développement, métabolites et phytohormones). Nous avons observé que si le niveau de méthylation global est identique entre les

morphotypes et conditions sans traitement hypométhylant, la zébularine a bien induit une hypométhylation comme attendu dans les parties néoformées au cours du traitement chez les deux morphotypes, et ce indépendamment des conditions. Cette hypométhylation est associée à des changements physiologiques. Une analyse intégrative de type ACP de toutes ces variables indique que le morphotype aquatique hypométhylé tendrait à se rapprocher des caractéristiques du morphotype terrestre témoin.

Nos résultats suggèrent une possible implication de la méthylation de l'ADN et des phytohormones dans la colonisation du milieu terrestre par la jussie et encouragent notamment à appliquer une stratégie épigénomique sur ce modèle (voir « perspectives » dans la partie 4).

Cet article a fait l'objet d'une première révision dans la revue Physiologia plantarum. Les reviewers ont notamment abordé trois points clés pour améliorer ce papier :

- Le premier point, le plus important, stipulait l'absence de données génétiques concernant la diversité entre les deux morphotypes de *Ludwigia grandiflora*. Ce manque rendait nos conclusions trop spéculatives quant au rôle de l'épigénétique. Les résultats de diversité génétique sont une composante de la thèse de Luis Portillo (2017-2020). Ainsi des données génétiques sur la diversité des morphotypes aquatique et terrestre ont été obtenues. Ainsi, il existe une diversité génétique importante au sein de la population du marais de Mazerolles, mais il n'y a pas de structuration significative au sein de cette population. Ces résultats vont être intégrés à l'article et nous reverrons nos conclusions pour y ajouter la composante génétique.

- Le second point concernait le manque de quantification de la plasticité phénotypique pourtant abordé dans l'article. Nous proposons de calculer l'indice de plasticité RDPI et d'ajouter un tableau statistique de ces analyses en données supplémentaires.

- Enfin, les reviewers ont questionné les analyses statistiques utilisées et l'absence de certains résultats statistiques dans les tableaux et les figures. Les tableaux et figures ont été corrigés dans ce sens. Avec l'aide d'un statisticien, nous allons retravailler voire faire évoluer le choix des tests utilisés.

La publication est ainsi en révision et sera resoumise prochainement après avoir inclus la réponse aux demandes justifiés des reviewers.

2. Publication Genitoni et al. en révision (Physiologia plantarum)

Hypomethylation of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora*, mimics the adaptive transition into terrestrial morphotype

Julien Genitoni[1,2], Danièle Vassaux[1], Alain Delaunay[2], Sylvie Citerne[3], David Renault[4], Dominique Barloy[1*], Stéphane Maury[2]

[1] ESE, Ecology and Ecosystem Health, Agrocampus Ouest, INRA, Rennes, France

[2] Laboratoire de Biologie des Ligneux et des Grandes Cultures (LBLGC), EA1207 USC1328 INRA, Université d'Orléans, 45067, Orléans, France

[3] Plateau Technique de Chimie du Végétal, Institut Jean-Pierre Bourgin, Versailles, France

[4] UMR CNRS 6553 EcoBio, University of Rennes 1, Rennes, France

- Corresponding author: dominique.barloy@agrocampus-ouest.fr

Abstract

Ongoing global changes affect ecosystems and open up new opportunities for biological invasion. The ability of invasive species to rapidly adapt to new environments represents a relevant model to study short-term adapting mechanisms. The aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora*, is classified as harmful in rivers in Europe. Its recent dispersion in wet meadows, especially in France, has led to the appearence of two distinct morphotypes. Indeed, *L. grandiflora* showed rapid transition from aquatic to terrestrial morphotypes in less than five years. Here, we investigate epigenetic as a possible source of flexibility involved in this fast terrestrial transition. To test this hypothesis, artifitial hypomethylation was induced on both morphotypes. Both morphotype responses were evaluated by analysing global DNA methylation, morphological changes, phytohormones and metabolites profiles in both aquatic and terrestrial conditions in shoot and root tissues. Hypomethylation significantly affected morphological

variables such as leaf numbers and biomass production, phytohormones levels such as auxin and salicylic acid and some metabolite amounts, as sugars and amino acids. Our results showed that effects of hypomethylation depend on morphotypes, conditions and plant tissues highlighting differences among the morphotypes and their plasticity. Finally, using a correlative integrative approach, the hypomethylation of the aquatic morphotype was shown to mimic the characteristics of the terrestrial morphotype. Altogether, our data suggest that DNA methylation may play a key role in *Ludwigia grandiflora* plasticity during its terrestrial fast transition.

Keywords: Water primrose, Epigenetics, DNA methylation, Metabolite, Phytohormone.

Abbreviations

ABA, abscissic acid; Am, aquatic morphotype; Ctrl, control; DMS, dry mass of shoots; DMR, dry mass of roots; FMS, fresh mass of shoots; FMR, fresh mass of roots; IAA, auxin; JA, jasmonic acid; JL, leucine jasmonyl acid; LI, length of internodes; LP, length of plant; nbB, number of nodes with buds; nbL, number of leaves; nbI, number of internodes; nbNR, number of nodes with roots; Rr, root ratio (FMR/DMR); SA, salicylic acid; Sr, shoot ratio (FMS/DMS); Tm, terrestrial morphotype; WC, water content ((FMS+FMR)/(DMS+DMR)); Zeb, zebularine.

Introduction

Global change and human activity impact ecosystems and allow new opportunities for geographic expansion of invasive species (van Kleunen *et al.* 2015, Early *et al.* 2016). Yet, the capability of the organisms to adapt rapidly to the newly encountered environmental conditions is crucial for the establishement of a viable population. This is especially true for plant species that are constrained to immobility. Moreover, invasion processes can occasionally result in bottlenecks, i.e. a large decrease of the genetic diversity of the few surviving propagules. In spite of this situation, they spread and cause economic and ecological issues (Theoharides and Dukes 2007). Rapid adaptive mechanisms such as phenotypic plasticity, which is the ability of one genotype to produce several phenotypes according to the environment (Pigliucci 2005), are commonly cited as an important factor favouring the invasion success. Theoretically, organisms characterized by a greater plasticity should be able to thrive in a larger range of environmental conditions, as compared with their less plastic relatives. While high level of phenotypic plasticity reported in invasive species, (Trussell and Smith 2000, Sexton *et al.* 2002, Daehler 2003, Davidson *et al.* 2011, Morris 2014) is still under debate (Chown *et al.* 2007, Godoy *et al.* 2011, Matzek, 2012, Lamarque *et al.* 2013), the sources of flexibility in invasive species remains to be established.

Epigenetics can be defined as any non-genetic molecular modification of the genome that alters gene expression (Meyer, 2018). This definition broadly encompasses several levels of chromatin modifications, including DNA methylation, histone modifications and variants, non-coding RNAs (Duncan *et al.* 2014, Allis and Jenuwein 2016). Epigenetics has been recently proposed as a potential source of flexibility involved in the success of invasive species by allowing organisms to express advantageous phenotypes across a broader range of environments (Richards 2006, Richards *et al.* 2017, for a recent review see Marin *et al.* 2019). Indeed, these last years many studies have highlighted the role of epigenetics in many mechanisms in plants, such as development (Guo *et al.* 2018, Li *et al.* 2018), responses to biotic and abiotic stress, (Tricker 2015, Crisp *et al.* 2016, Lämke and Bäurle, 2017), memory and priming (Mauch-Mani *et al.* 2017, Le Gac *et al.* 2018, Sow *et al.* 2018, Le Gac *et al.* 2019), phenotypic plasticity (Gourcilleau *et al.* 2010, Becker *et al.* 2011, Schmitz *et al.* 2011, Baulcombe and Dean 2014, Kooke *et al.* 2015, Conde *et al.* 2017, Lafon-Placette *et al.* 2018, Maury *et al.* 2019) and

possibly adaptation (Bräutigam *et al.* 2013, Kawakatsu *et al.* 2016, Rey *et al.* 2016, Schmid *et al.* 2018, Gourcilleau *et al.* 2019). Thus, Kooke *et al.* (2015), using epiRILs on *Arabidopsis thaliana* based on *ddm 1-2* lines, tested morphological responses after salin condition. They found several phenotypes among epiRILs and that hypomethylation affects phenotypic plasticity in stress response. While the role of epigenetics and transposable elements in invasive processes could be key sources of flexibility for invasive species during colonisation of new environment, actual available studies have only established correlations between methylation patterns, phenotypes and environments (Gao *et al.* 2010, Richards *et al.* 2012, Xie *et al.* 2015, Marin *et al.* 2019).

Epigenomics methods such as Whole-Genome Bisulfite Sequencing (WGBS) can provide detailed information at the scale of the cytosines over the whole genome (Yong *et al.* 2016), these approaches require a complete reference genome. Other methods using pharmacological approach with a hypomethylating agent as zebularine and 5-azacytidine are commonly used. Such a strategy has already been reported successfully in model plants such as *Arabidopsis thaliana* (Baubec *et al.* 2009, Amoah *et al.* 2012) and many others (Burn *et al.* 1993, Brock and Davidson 1994, Finnegan *et al.* 1998, Fieldes *et al.* 2005, Causevic *et al.* 2006, Trap-Gentil *et al.* 2011) but not in invasive plants. The global DNA methylation (%mC), is a widely used and proven epigenetic indicator in plants (Causevic *et al.* 2006, Gourcilleau *et al.* 2010, Trap-Gentil *et al.* 2011, Teyssier *et al.* 2014, Alonso *et al.* 2015, Alonso *et al.* 2016, Le Gac *et al.* 2018, Sow *et al.* 2018, Gourcilleau *et al.* 2019) using the most approved HPLC technique (Lambé *et al.* 1997, Trap-Gentil *et al.* 2011, Teyssier *et al.* 2014, Alonso *et al.* 2016, Kurdyukov and Bullock 2016, Yong *et al.* 2016, Sow *et al.* 2018).

Ludwigia grandiflora, subsp. *hexapetala*, native to South America, is an aquatic invasive plant in Europe (Hussner *et al.* 2016). *L. grandiflora* can live in a wide range of environments (Haury *et al.* 2014). In France, it colonizes aquatic habitats, such as static or slow-flowing waters, river banks and more recently wet meadows (Dandelot *et al.* 2005, Lambert *et al.* 2010). As mentioned in Billet *et al.* (2018), *L. grandiflora* is an amphibious plant characterized by an aquatic morphotype (Am). Recently, water primrose invaded wet meadows and a new terrestrial morphotype (Tm) appeared. The population

studied in Billet *et al.* (2018) appeared in France in 1995 for the aquatic morphotype and five years later for the terrestrial one. This secondary invasion could lead to loss of financial support for farmers because of depreciation of fodder value and abandonment of pasturing. This begs the question of fast adaptation of this invasive plant to a new environment. Am in its original condition is characterized by an elongated morphology with few leaf number, on the contrary Tm presents a bushy morphology with a greater root system and more leaves than aquatic morphotype (Haury *et al.* 2014, Billet *et al.* 2018).

Water primrose reproduces essentially by clonal propagation, one population should exhibit low genetic diversity and makes it a good candidate to test the role of epigenetic mechanisms in invasive plants according to Zhang *et al.* (2013). The aim of this study is to explore the involvement of an epigenetic component in the adaptation of *L. grandiflora* to the terrestrial environment. We hypothesized that DNA methylation is differently mobilized by terrestrial and aquatic morphotypes according to environment and involved in the fast terrestrial transition, as it was suggested in changing environment for *A.thaliana* and *Alternanthera philoxeroides* (Li *et al.* 2013). Here, we used a pharmacological approach using zebularine to perturbate DNA methylation on Am and Tm from the same population of *L. grandiflora* previously studied in Billet *et al.* (2018) in response to aquatic and terrestrial conditions. To characterize the hypomethylation effect of zebularine, a correlative approach was conducted using morphological, physiological (metabolomics and phytohormones) and methylation percentage variables.

Material and methods

Plant material and experimental design

Aquatic (Am) and terrestrial (Tm) morphotypes of *L. grandiflora* were collected from the Mazerolles swamps (Nantes, France, N47 23.260, W1 28.206). After collection, plants were grown in a greenhouse in aquatic condition for Am and in terrestrial conditions for Tm (Billet *et al.* 2018).

For the zebularine experiment, a 10 cm portion from the stem apex was collected, without roots, buds, and lateral stems. All plants were preconditioned during 2 weeks, as described in Billet *et al.* (2018) to promote root development. For morphological analyses, two replicates of nine plants were

randomly grouped by three plants per container for aquatic (Am-a and Tm-a) and terrestrial (Am-t and Tm-t) conditions for both morphotypes. The plants were then placed in a growth chamber (22°C, 16 h day/8 h night). Similarly, three replicates of six plants were carried out for physiological (phytohormones and metabolites quantifications) and %mC analyses for each morphotype (Am and Tm), condition (-a and -t) and treatment (ctrl and zeb) combination, for a total of 288 plants. Zebularine (Sigma-Aldrich) treatment at 150 µM was applied in the liquid solution at the beginning of the experiment and renewed 7 days later. Plants without zebularine were grown as a control. Morphology sampling for physiological and methylation analyses were conducted 14 days after the beginning of the experiment. *De novo* shoots and roots, taken five centimeters from the apex (including stems, leaves, and buds) were sampled separately from six randomly collected plants per morphotype (Am or Tm), treatment (zebularine or control) and condition (aquatic or terrestrial). Samples for physiological analysis were pooled and immediately snap-frozen in liquid nitrogen, then lyophilized over 48 hr using a Cosmos 20K (Cryotec, Saint-Gély-du-Fesc, France) and stored at −80°C.

Morphological analyses

Nine plants per morphotype, condition and treatment were analysed. The following morphological, growth and fitness traits were measured:

Length of the plant (LP) in centimeter (cm), number of internodes (nbI), and number of leaves (nbL), which characterize plant morphology. The length of internodes in centimeter was calculated as the ratio of LP/nbI. Number of nodes with roots (nbNR), number of nodes with buds (nbB) variables are associated with the fitness of the plant. As mentioned in Billet *et al.*, 2018, fitness of *L. grandiflora* is considered as the ability to produce propagules from buds or nodes with roots. *L. grandiflora* has the ability to form new plant from small (>1 cm) plant fragments. Biomass of plants in grams (g) was determined by measuring the fresh mass of shoots (FMS) and roots (FMR). After oven drying the samples at 105°C for 48 h, we obtained their respective dry mass (DMS and DMR). To determine water content, the ratios of fresh/dry mass of shoots (Sr) and roots (Rr) were calculated.

DNA extraction and determination of global DNA methylation percentage by HPLC

Genomic DNA extraction was carried out using the CTAB protocol described in Lafon-Placette *et al.*, (2013). Quantity and quality of gDNA were checked by NanoDrop spectrometer and electrophoresis on agarose gel and ethidium bromide staining under UV light. Genomic DNA was hydrolyzed into nucleosides and analyzed by HPLC using a GeminiTM column (150 × 4.6 mm, 5 µm; Phenomenex, Le Pecq, France). Finally, an isocratic mobile phase consisting of 0.5% methanol (v/v) and 5 mM acetic acid in water, as described by Zhu *et al.* (2013) and Le Gac *et al.* (2018) was used. Global DNA methylcytosine percentage (% mC) was calculated as follows:

$$\%mC=(mC/(C+mC))\times100,$$

where C is the 2′-deoxycytidine content and mC is the 5-methyl-2′-deoxycytidine content. For each set of conditions, we analyzed three biological replicates for each morphotype, condition and treatment. Each sample was hydrolyzed twice and two HPLC runs were carried out by hydrolysis. Controls for this procedure included the use of co-migration with commercial standards (Sigma-Aldrich), confirmation by enzyme restriction analysis and tests for RNA contamination were based on the HPLC detection of ribonucleosides which have already been detailed in Zhu *et al.* (2013).

Phytohormone quantification

Quantification of Abscisic acid (ABA), Salicylic acid (SA), Jasmonic acid (JA), Jasmonyl Leucine acid (JLA) and Auxins (IAA) were carried out in both shoots and roots. For each sample, 1 mg of dry powder was extracted with 0.8 mL of acetone/water/acetic acid (80/19/1 v:v:v). Phytohormones stable labelled isotopes used as internal standards were prepared as described in (Roux *et al.* 2014). 1 ng of each standard was added to the sample. The extract was vigorously shaken for 1min, sonicated for 1 min at 25 Hz, shaken for 10 minutes at 10°C in a Thermomixer (Eppendorf®, and then centrifuged (8,000g, 10 °C, 10 min.). The supernatants were collected, and the pellets were re-extracted twice with 0.4 mL of the same extraction solution, then vigorously shaken (1 min) and sonicated (1 min; 25 Hz). After the centrifugations, the three supernatants were pooled and dried (Final Volume 1.6 mL).

Each dry extract was dissolved in 100 µL of acetonitrile/water (50/50 v/v), filtered, and analyzed using a Waters Acquity ultra performance liquid chromatograph coupled to a Waters Xevo Triple quadrupole mass spectrometer TQS (UPLC-ESI-MS/MS). The compounds were separated on a reverse-phase column (Uptisphere C18 UP3HDO, 100*2.1 mm*3µm particle size; Interchim, France) using a flow rate of 0.4 mL min-1 and a binary gradient: (A) acetic acid 0.1 % in water (v/v) and (B) acetonitrile with 0.1 % acetic acid, the column temperature was 40 °C, for Abscisic acid, salicylic acid, jasmonic acid, and indole-3-acetic acid we used the following binary gradient (time, % A): (0 min., 98 %), (3 min., 70 %), (7.5 min., 50 %), (8.5 min., 5 %), (9.6 min., 0%), (13.2 min., 98 %), (15.7 min., 98 %), Mass spectrometry was conducted in electrospray and Multiple Reaction Monitoring scanning mode (MRM mode), in positive ion mode for the indole-3-acetic acid and in negative ion mode for the other hormones. Relevant instrumental parameters were set as follows: capillary 1.5 kV (negative mode), source block and desolvation gas temperatures 130 °C and 500 °C, respectively. Nitrogen was used to assist the cone and desolvation (150 L h-1 and 800 L h-1, respectively), argon was used as the collision gas at a flow of 0.18 mL min-1.

Metabolomic fingerprint

Gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) was used to scan for the metabolites that could be detected from the samples (amino acids, organic acids, polyamines, polyols, or sugars). For the preparation of the samples, the method described in Serra *et al.* (2013) was used and adapted as in Billet *et al.* (2018). Briefly, for each sample, an aliquot of 10 mg of lyophilized powder was homogenized in 600 µl of a solution of ice-cold methanol/chloroform (2:1, v/v). Then, a volume of 400 µl of ultra-pure water was added. Samples were homogenized and centrifuged for 10 min at 4,000 g (4°C). One hundred and twenty and eighty microliters of the upper phase containing metabolites were transferred to new glass vials for roots and shoots respectively. The derivatization of the samples was conducted with a CTC CombiPAL autosampler (CTC Analytics AG, Zwingen, Switzerland), as described in Serra *et al.* (2013). The GC-MS platform consisted in an Agilent 7890B gas chromatograph

coupled to a 5977B mass spectrometer. The injector was held at 250°C, and the temperature of the oven ranged from 70 to 170 °C at 5 °C per mon, fom 170 to 280 °C at 7 °C per min, and from 280 to 320 °C at 15 °C per min; at the end of the temperature ramps, the oven remained at 320 °C for 4 min. A 30 m fused silica column (HP5 MS 30 m, I.D. 0.25 mm, thickness 0.25 µm, 5% Diphenyl / 95% Dimethylpolysiloxan, Agilent Technologies) was used, with helium as the gas carrier at 1 mL per min. The temperatures of the transfer line and ion source were 280 and 230 °C, respectively. The split mode (split ratio: 2:1) was used for the injection of 1 µL of each sample, and detection was realized by electronic impact (electron energy: 70 eV), in full scan mode. The detected peaks were annotated with MassHunter. Most detected metabolites were identified, and calibration curves were drawn for calculating concentration of each metabolite.

Statistical analysis

The effect of the zebularine treatment on the morphology and physiology of both morphotypes was assessed by running principal component analyses (PCAs) and analyses of variance (ANOVAs). Four-way ANOVA were carried out with morphotype, treatment, condition and biological replicate as factors and three-way ANOVA without using morphotype as a factor. Then two and three way interactions were analyzed. The residuals normality and the homoscedasticity were verified by Shapiro–Wilk's and Bartlett's tests, and normality was achieved, when required by transforming morphological traits and the metabolite concentrations (Log10). The Tukey's test was used to compare means for all data.

Finally, we tried to link metabolites where concentration varied among the experimental treatments with metabolic pathways. To achieve this goal, we performed pathway enrichment analyses in Metaboanalyst 3.0 (Xia *et al.* 2015). Fisher's exact test algorithm was performed for these pathway analyses, with *Arabidopsis thaliana* as the reference model. In this procedure, the number of hits between the metabolites in our dataset and all metabolites of a given pathway was calculated. Data presented in the figures are untransformed.

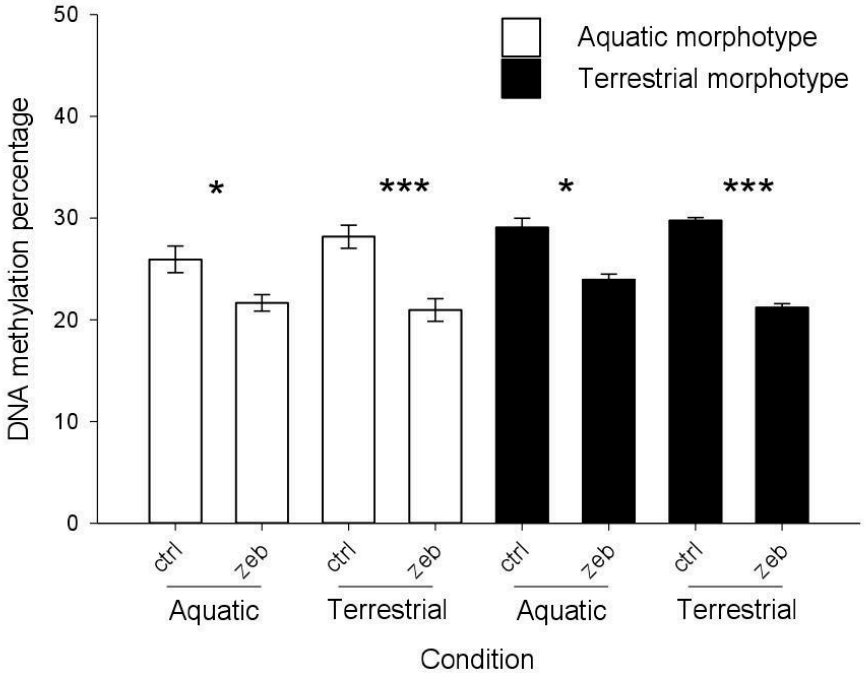


Fig. 1: Global DNA methylation percentages in *de novo*-formed-shoot of aquatic and terrestrial morphotypes (white and black, respectively) in aquatic and terrestrial conditions with or without 14 days of zebularine treatment (zeb for 150 µM of zebularine and ctrl for control). Bars represent the mean value of three biological replicates with their standard errors.Stars correspond to means comparison by *t*-test between zeb and ctrl for a given morphotype and condition. Significance codes are: 0.001= "***"; 0.01= "**"; 0.05= "*"; absence of star means no significant difference.

Results

Zebularine induces hypomethylation in the aquatic and terrestrial morphotypes of the invasive *L. grandiflora* plant.

A 14-day zebularine treatment was applied to induce DNA hypomethylation on Am and Tm of the invasive *L. grandiflora* plant grown in aquatic and terrestrial conditions. Only *de novo* formed shoots during the treatment were used to assess the global DNA methylation percentage (%mC) by HPLC method (Fig. 1; see Materials and Methods for procedure). The methylation percentages ranged from 25.9% to 29.8% for control plants and from 20.9% to 23.9% for plant treated with zebularine (Fig. 1). A 4-way analysis of variance was carried out by comparison of morphotype (Am or Tm), treatment (zebularine or control), condition (aquatic or terrestrial) and biological replicate. DNA methylation percentage was significantly effected by morphotypes, treatment and the interaction between condition and treatment (p = 8.82e-03, 4.88e-08 and 1.86e-2, respectively). Anova analysis revealed a significant decrease of %mC in zebularine-treated plants (p = 4.88e-08). Specifically, the zebularine treatment induced a methylation decrease ranging from 7.2% and 8.6% for Am and Tm grown in terrestrial condition and from 4.3% and 5.1 % in aquatic condition, respectively (Fig. 1). However, we observed similar methylation levels between morphotypes independently of conditions for both treatments.

The data showed that no significant variation of global DNA methylation was observed among morphotypes and conditions but a significant hypomethylation was obtained after a 14 days zebularine treatment in both morphotypes and conditions.

Hypomethylation of both morphotypes affects growth and morphology in aquatic and terrestrial conditions.

After a 14-day treatment, Am and Tm grown in aquatic (-a) and terrestrial (-t) conditions were pictured (Fig. 2a) and analysed for morphology, biomass and water content traits (Fig. 2b). While no necrosis symptom was observed for zebularine-treated plants (Fig. 2a), morphology and growth of the plants appeared to be affected, for example with an increased number of leaves in hypomethylated Am in aquatic condition (Fig. 2a). Analyses of variance were carried out (morphotype, condition, treatment, biological replicate, double or triple interactions; Fig. 2b, Table S1 and see supplementary traits

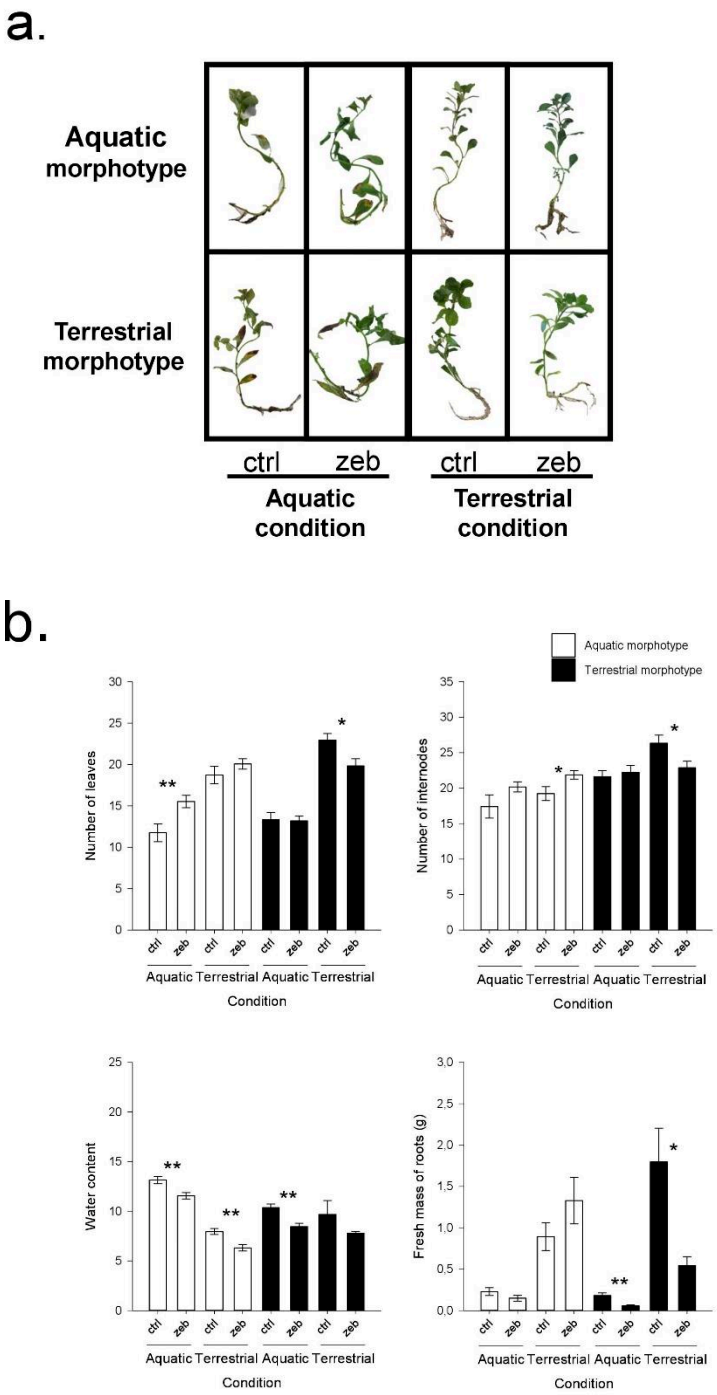


Fig. 2: Phenotype of hypomethylated aquatic and terrestrial morphotypes (white and black, respectively) of *Ludwigia grandiflora* grown in terrestrial or aquatic conditions.

a. Pictures of control and zebularine treated plants in each condition. b. Number of leaves, of internodes, water content and fress mass of roots (in g). Bars represent the mean value of ten biological replicates with their standard errors. Stars correspond to means comparison by *t*-test between zeb and ctrl for a given morphotype and condition. Significance codes are: 0.001= "***"; 0.01= "**"; 0.05= "*"; absence of star means no significant difference. Supplementary data for statistics are presented in Supporting Information Table S1.

measured in Fig.S1). A significant impact was observed on hypomethylated plants as exemplified by the increased number of leaves in hypomethylated Am in aquatic condition (Am-a) and the increased number of internodes in terrestrial condition (Am-t) (Fig. 2b). Effects of hypomethylation are also observed with the decrease of fresh mass of roots, number of leaves and number of internodes in the hypomethylated Tm in terrestrial condition (Tm-t) and a decrease of fresh mass of roots in hypomethylated Tm in aquatic condition (Tm-a) (Fig. 2b) . Indeed, zebularine treatment impacted differently both morphotypes in their original condition (Am-a *versus* Tm-t) and also in changing condition (Am-t *versus* Tm-a) (Fig. 2b; Table S1 and Fig.S1). Hypomethylation has also significantly decreased the water content excepted for Tm in terrestrial condition (Fig. 2b and Table S1).

Another strong difference observed by the analyses of variance was about the growth condition (aquatic *versus* terrestrial) independently of zebularine treatment. Plants grown in aquatic condition have showed an elongated morphology, with a greater plant length and length of internode, and a greater water content and shoot ratio (p <0,05; Table S1; Fig.S1). On the contrary, plants having grown in terrestrial condition were characterized by a greater number of leaves, number of internodes, biomasses variables (Fresh and Dry masses of roots and shoots) and number of buds (Fig. 2a and b, Table S1 and Fig.S1).

Altogether, DNA hypomethylation as well as growth condition (-a or -t) positively or negatively affects several morphological, biomass and water content traits depending on morphotypes. Opposite effects could be observed between the two morphotypes in their original condition. This suggests that DNA methylation could be involved in the phenotype establishement and the plasticity of the invasive *L. grandiflora* morphotypes.

Hypomethylation of morphotypes is associated to phytohormone balance changes in aquatic and terrestrial conditions.

Quantification of phytohormones (SA, Auxine, LJA, JA and ABA) using HPLC-electrospray ionisation-MS/MS (see Materials and Methods for procedure) was carried out on *de novo* formed shoot and root tissues (Fig. 3 and Fig.S2). Four way analyses of variance were carried out by comparison of

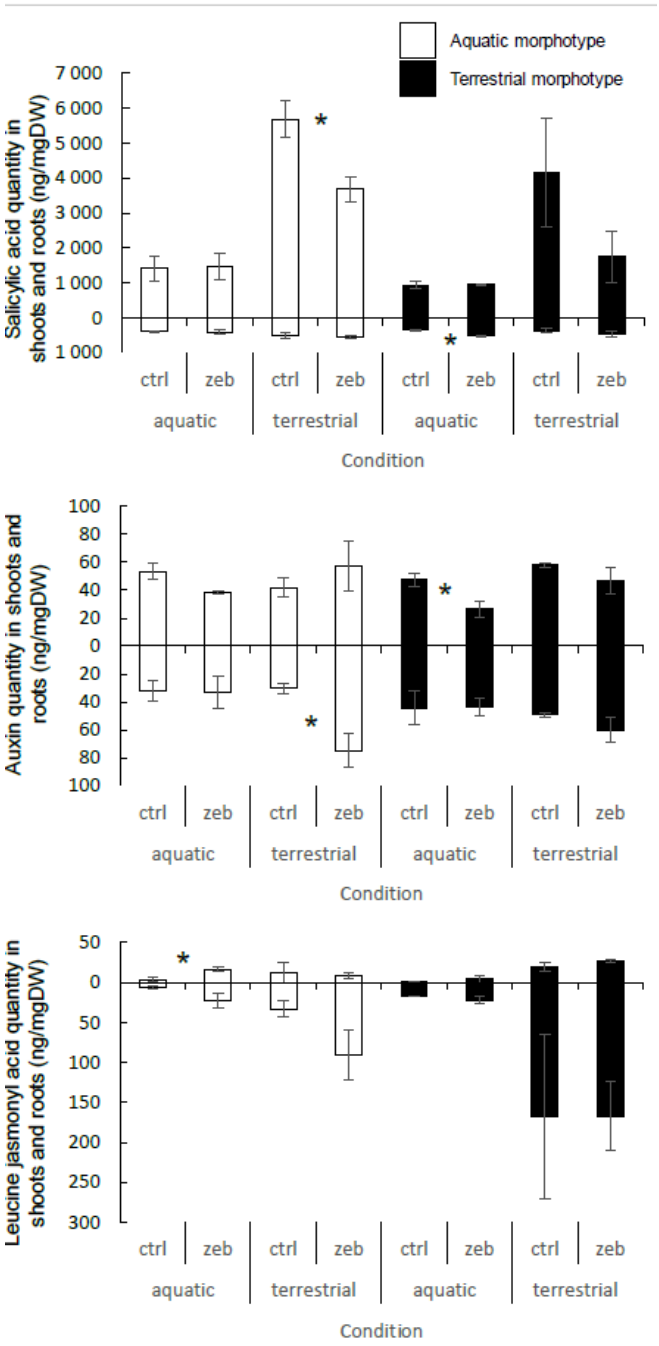


Fig. 3: Phytohormones quantities in roots and shoots of aquatic and terrestrial morphotypes (white and black) of *Ludwigia grandiflora* grown in terrestrial or aquatic conditions. Auxine, Salycilic acid and leucine jasmonyl acid (in ng/mg of dry mass). Bars represent the mean value of three biological replicates with their standard errors. Stars correspond to means comparison by *t*-test between zeb and ctrl for a given morphotype and condition. Significance codes are: 0.001= "***"; 0.01= "**"; 0.05= "*"; absence of star means no significant difference. Supplementary data for statistics are presented in Supporting Information Table S2.

morphotype (Am or Tm), treatment (zebularine or control), condition (aquatic or terrestrial) and biological replicate for each phytohormone in shoots and roots (Table S2). Significant differences were observed in shoots or roots for four phytohormones: ABA, SA, Auxine and LJA (Table S2) revealing modifications of the phytohormone balances in each situation.

In order to focus on the hypomethylation effect, *t*-tests between control and zebularine treatments for each morphotype/condition were carried out with significant differences only for SA, Auxine and LJA (Fig. 3; Fig.S2). The main effects were observed for SA and Auxine with opposite variations in Am-t and Tm-a, ie. changing condition for each morphotype (for example the aquatic morphotype in terrestrial condition; Fig. 3). Indeed, hypomethylation of Am-t is associated to a decrease of SA (in shoots) and an increase of Auxine (in roots), while Tm-a exhibited an increase of SA (in roots) and a decrease of Auxine (in shoots) ($p<0.05$; Fig. 3; Table S2). To summarize, phytohormone balance is a sensitive physiological variable affected by morphotype (Am *versus* Tm), condition (-a *versus* –t), organ (shoots *versus* roots) and hypomethylation (zebularine *versus* control). Hypomethylation was shown to more specifically affect the morphotypes in changing conditions (Am-t and Tm-a; Fig. 3).

Hypomethylated aquatic and terrestrial morphotypes exhibit distinct metabolic profiles in a condition-dependant way.

Quantification of metabolites (sugars, polyols, amono-acids, organic acids) using GC-MS (see Materials and Methods for procedure) was carried out on *de novo* formed shoot and root tissues (Fig. 4 and Fig.S3). 4-way analyses of variance were carried out by comparison of morphotype (Am or Tm), treatment (zebularine or control), condition (aquatic or terrestrial) and biological replicate for 35 quantified metabolites (Table S3). Significant effects of morphotype, condition and treatment were detected for 7, 19 and 10 metabolites, respectively (Table S3) revealing modifications of the metabolites accumulation. Condition (-a or -t) was the most discriminating factor ($p<0.05$). Aquatic condition is characterized by a higher amount of amino acids such as valine, leucine, serine and aspartic acid or other compounds such as phosphoric acid, GABA, putrescine, glycerol-3-phosphate and quinic acid ($p<0.05$; Table S3). However, terrestrial condition is characterized by a greater quantity of sugar (fructose, glucose,

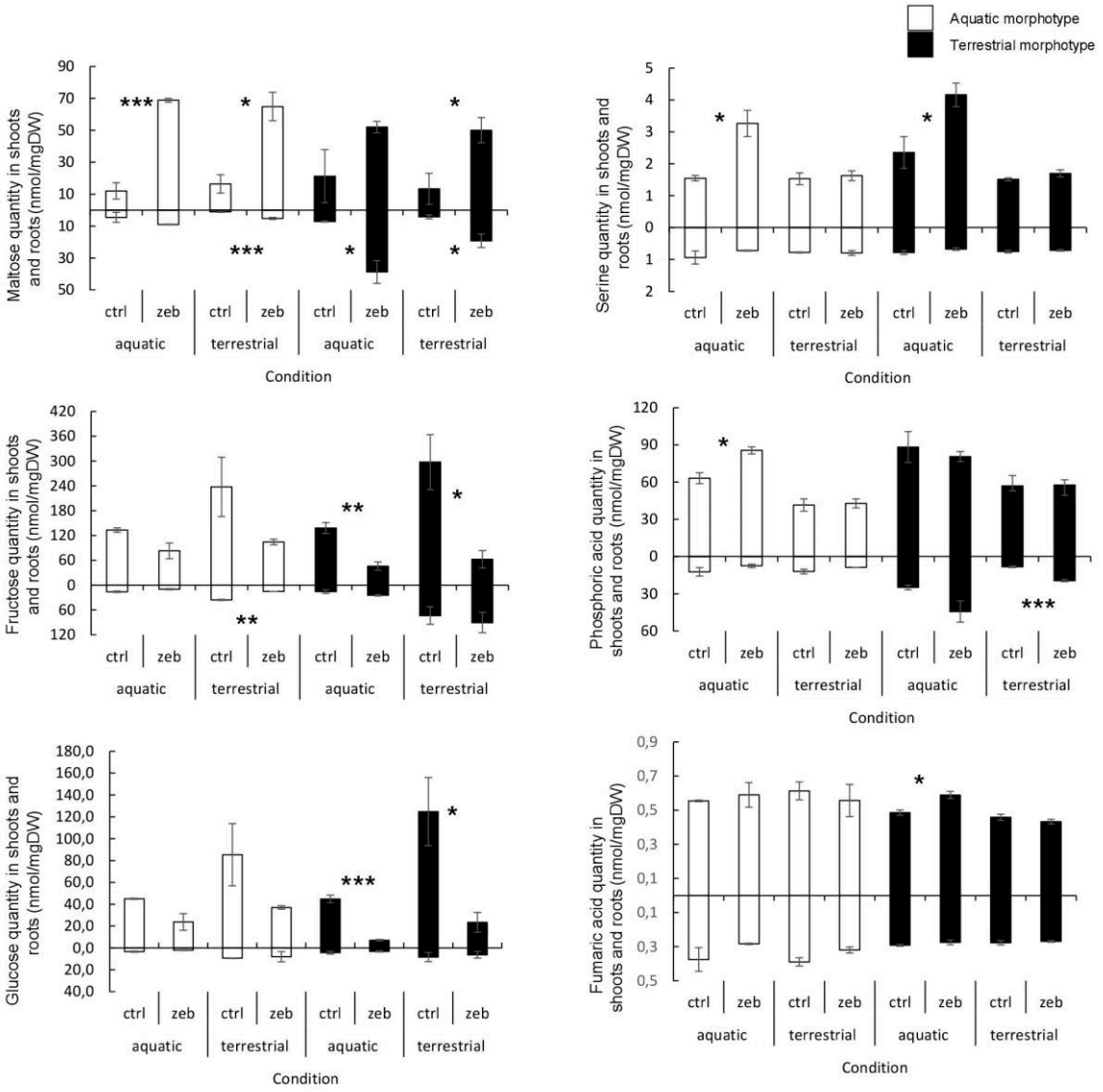


Fig. 4: Metabolites quantities in roots and shoots of aquatic and terrestrial morphotypes (white and black) of *Ludwigia grandiflora* grown in terrestrial and aquatic conditions. Maltose, serine, fructose, phosphoric acid, glucose, fumaric acid quantities were expressed in nmol/mg of dry mass. Bars represent the mean value of three biological replicates with their standard errors. Stars correspond to means comparison by *t*-test between zeb and ctrl for a given morphotype and condition. Significance codes are: 0.001= "***"; 0.01= "**"; 0.05= "*"; absence of star means no significant difference. Supplementary data for statistics are presented in Supporting Information Table S3.

galactose), polyol (sorbitol, erythritol and inositol) and other compounds as proline, glyceric acid, gluconolactone, malic acid (p<0.05; Table S3).

In order to focus on the hypomethylation effect, *t*-tests between control and zebularine treatments for each morphotype/condition were carried out with significant differences. Hypomethylation of DNA impacted 18 metabolites in shoots and 11 in roots (p<0.05; Fig. 4; Fig.S3). Independently of morphotype and condition, zebularine treatment affected the amounts of four sugars. Six representative metabolites of the hypomethylation-induced variability are detailed in Fig. 4 (others are in Fig.S3). Indeed, hypomethylation was associated to a significant change (up or down, mainly in shoots) in *i*) all morphotype/condition situations (Maltose); *ii*) one morphotype in both conditions (Glucose); *iii*) one condition for each morphotype (Serine); *iv*) in both morphotypes for their original conditions only (Phosphoric acid) or *v*) specific morphotypes x conditions situations (Fructose and Fumaric acid). To summarize, metabolites are highly sensitive variables affected by morphotype (Am *versus* Tm), condition (-a *versus* –t), organ (shoots *versus* roots) and hypomethylation (zebularine *versus* control). Hypomethylation was shown to affect some metabolites but in a complex intereaction with morphotype, condition and organ.

Integrative correlative approach shows that hypomethylation of the aquatic morphotype mimics the transition to the terrestrial morphotype.

In order to characterize the variability of the two morphotypes in distinct situations, particularly the hypomethylation effect, a Principal Component Analysis (PCA) was conducted combining morphological, phytohormones and %mC variables which were significantly affected by hypomethylation according to anova and *t*-test analysis (Fig. 5). The main plane of principal component analysis (F1 x F2) explained 57.08% of the variability, with 41.71% for F1 alone. F1 axis allowed discriminating aquatic and terrestrial conditions (numbers of leaves and nodes with buds) while F2 mainly distinguished hypomethylation. The global DNA methylation percentages were only correlated with two variables of the PCA (Fig.S4): the roots ratio (Rr; r=0.41 at p <0.05,) and the SA in roots (r=-0.42 at p<0.05).

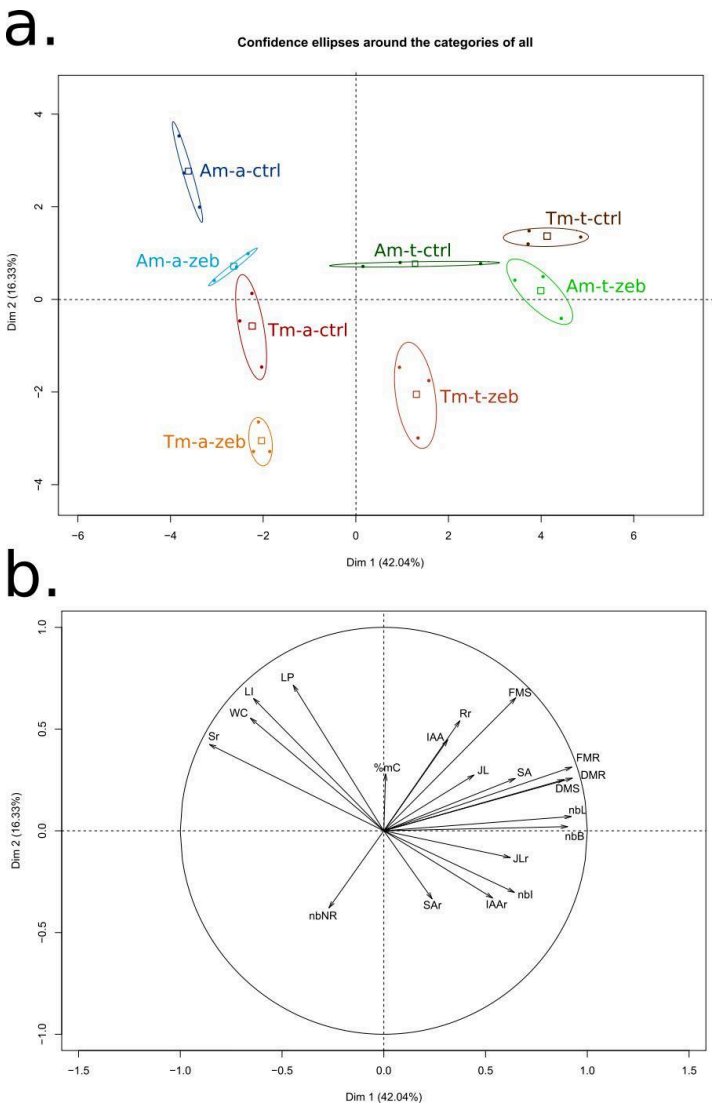


Fig. 5: Principal component analysis (PCA) representation allowing the characterization of the morphological and physiological variability of hypomethylated (zeb) or not (ctrl) aquatic and terrestrial morphotypes in aquatic (Am-a, Tm-a) and terrestrial (Am-t, Tm-t) conditions. (a) Individuals factor map. Each data point represented one biological repeat. (b) Variables factor map. Morphological variables represented are number of leaves (nbL), length of internodes (LI), number of nodes (nbI), number of nodes with roots (nbNR), number of buds (nbB), fresh and dry mass of roots and shoots (FMS, FMR, DMS and DMR), shoots and roots ratio (FMS/DMS = Sr; FMR/DMR = Rr), water content (WC). Phytohormones represented are auxin (IAA), salicylic acid (SA) and leucine jasmonyl acid (JL) in shoots and in roots (IAAr, SAr, JLr). Global DNA methylation percentages are indicated by %mC.

The main observation was that the hypomethylated aquatic morphotype in aquatic and terrestrial conditions (Am-a-zeb and Am-t-zeb; Fig. 5a) were getting closer on the PCA to the control terrestrial morphotype in each condition (Tm-a-ctrl and Tm-t-ctrl, respectively).

Another PCA with metabolomic data was tested using a subset of metabolites not to unbalance the analysis. Six metabolites showing significant correlations with %mC (Fig.S4) and other metabolites significantly affected by hypomethylation according to anova and *t*-test were selected (Fig.S5). The effect of hypomethylation was mainly observed this time in the aquatic condition explained principally by Water Content (WC), shoot ratio (Sr) and some metabolites in shoots, such as organic acid (phosphoric acid, aspartic acid), amino acid (phenylalanine, serine, leucine) and G3P (Fig. 5b). These variables were significantly affected by zebularine on aquatic morphotype in aquatic condition ($p<0.05$ and Fig.S1). Based on mean comparison using tuckey-*test*, no significant difference was observed after zebularine treatment between Tm-a-ctrl and Am-a-zeb, while significant difference between Tm-a-ctrl and Am-a-ctrl remained ($p<0.05$ for WC, $p<0.0001$ for Sr). The other important result was hypomethylated terrestrial morphotype, which showed different phenotype after hypomethylation. Futhermore, according to metabolomic analysis terrestrial morphotype in aquatic condition has the most diverse phenotype (Fig.S5).

According to these integrative approaches, hypomethylation of the aquatic morphotype induces a terrestrial morphotype-'like' situation, suggesting a role for epigenetics in the fast adaptation of the aquatic invasive *L.grandiflora* to the terrestrial condition.

Discussion

Morphotypes of the invasive *L. grandiflora* plant showed distinct morphological and physiological responses to aquatic and terrestrial conditions but similar global DNA methylation levels.

Ludwigia grandiflora originating from South America is an aquatic invasive plant in Europe (Hussner *et al.* 2016) that has been reported in a wide range of environments (Haury *et al.* 2014) colonizing aquatic habitats but also recently terrestrial ones with wet meadows becoming problematic for farmers (Dandelot *et al.* 2005, Lambert *et al.* 2010). Two distinct invasive morphotypes, an aquatic and a terrestrial one, have been identified (Haury *et al.* 2014, Billet *et al.* 2018). The present analysis confirms these differences at the morphological and metabolomic levels (Billet *et al.* 2018). For example, as

shown by Billet *et al.* (2018) in their original conditions, aquatic morphotype has a lower number of nodes with an elongated morphology, smaller number of leaves and stronger water content than terrestrial morphotype. On the contrary, greater number of leaves and mass of roots significantly characterized terrestrial morphotype. In addition, Billet *et al.* (2018) have identified a specific metabolite accumulation in roots in terrestrial condition involving the three following pathways: amino sugar and nucleotide sugar metabolism, the starch and sucrose metabolism and galactose, fructose, mannose metabolism ; and two pathways in shoots in aquatic condition, the valine, leucine, and isoleucine metabolism and degradation pathway. Here, if no significant differences using metaboanalyst were detected, higher quantities of sugars in terrestrial condition and amino acids in aquatic condition were found as described in Billet *et al.* (2018).

In the present work, we complete the initial characterization of these two morphotypes with the quantification of phytohormones and DNA methylation levels. These two processes are well-known regulators of plant development and their response to environmental variations (Sahu *et al.* 2013, Fang *et al.* 2016, Li *et al.* 2018, Avramova 2019). Recently, it has also been proposed that phytohormone and epigenetic act in crosstalk to ensure phenotypic plasticity (Yamamuro *et al.* 2016, Maury *et al.* 2019). In our study, phytohormones were mainly observed to vary between conditions (plasticity) than between morphotypes. Thus, ABA, JA and SA were present in greater amounts in terrestrial condition according to their role in drought responses (Kohli *et al.* 2013).

Here, we analyzed two morphotypes originating from one clonally propagated population thereby excluding or extremely reducing the effect of genetic variation and allowing to test the role of epigenetic mechanisms in invasive plants (Zhang *et al.* 2013). In plants, DNA methylation is involved in transposon silencing and gene expression that can change phenotype in response to environmental variations (Lande 2009, Meyer 2015, Kawakatsu *et al.* 2016, Bewick and Schmitz 2017, Seymour and Becker 2017). Although epigenomic methods such as whole-genome bisulfite sequencing (WGBS) provide detailed information at the genomic scale, they require a complete reference genome that is still lacking in *L. grandiflora*. In addition, this plant has been reported as a decaploid genome leading to a complex situation (Dandelot *et al.* 2005). We measured the global DNA methylation (%mC) using the most approved HPLC technique (Zhu *et al.* 2013, Kurdyukov and Bullock 2016). Although this

approach does not provide epigenetic characterization at the detailed level of genes and genomic regions. It is a widely used and proven epigenetic indicator in plants accessible from the cell to the population level (Lambé *et al.* 1997, Causevic *et al.* 2006, Gourcilleau *et al.* 2010, Raj *et al.* 2011, Trap-Gentil *et al.* 2011, Latzel *et al.* 2013, Alonso *et al.* 2015, Garg *et al.* 2015, Alonso *et al.* 2016, Le Gac *et al.* 2018, Sow *et al.* 2018, Gourcilleau *et al.* 2019, Le Gac *et al.* 2019). Here, we found that global methylation level in *L. grandiflora* (estimated genome size around 700 Mb, personal communication D. Barloy) was about ~28% of mC which is five times higher than in *Arabidopsis thaliana* (5%; 135Mb) and two times higher than *Antirrhinum majus* (15%; 400-500Mb); consistent with the relation among global DNA methylation (%mC) and the genome size reported in angiosperms (Alonso *et al.* 2015). However, in our study, we could not detect any significant variation of %mC between morphotypes and conditions as reported recently in isogenic lines of *Antirrhinum majus* in different shade avoidance conditions (Gourcilleau *et al.* 2019). Few studies using MSAP technics are available (Marin *et al.* 2019) such as one on the aquatic invasive species *Alternanthera philoxeroides* showing differences in DNA methylation level according to aquatic and terrestrial forms, tissues, and flooding (Li *et al.* 2013).

Altogether, this proposes to further investigate methylation polymorphism in our system using approaches that do not require a reference genome e.g., epigenome bisulfite sequencing (epiGBS), bisulfite converted restriction site associated DNA sequencing (bsRADseq), Epi RADseq and methylated DNA immunoprecipitation (meDIP)(van Gurp *et al.* 2016, Trucchi *et al.* 2016). However, here our objective was an initial epigenetic characterization with a widely used epigenetic indicator (%mC) and to assess the effect of zebularine treatment.

Zebularine induced hypomethylation on the *L. grandiflora* morphotypes in terrestrial and aquatic conditions.

Hypomethylant chemical agents such as zebularine and 5-azacytidine are used in cancer research (Cheng *et al.* 2004). In addition, there is a renewed use of the hypomethylant chemical agent for the study of DNA methylation and its role in organism responses to the environment (Baubec *et al.* 2009, Bossdorf *et al.* 2010, Richards *et al.* 2010, Hudson *et al.* 2011, Zhong *et al.* 2013, Latzel *et al.* 2016, Osorio-Montalvo *et al.* 2018, Puy *et al.* 2018). Zebularine is an inhibitor of methyltransferase, which causes an

hypomethylation of *de novo* tissues. Our study was carried out at concentration and duration in accordance to the cited literature. We assessed the %mC using HPLC method in *de novo* formed shoot apex because it is the place where new tissues start their differentiated growth and development in contact to zebularine (Aranda *et al.* 2017). We found that 14 days zebularine treatment induces a significant decrease of %mC in *de novo* formed shoots for all situations (morphotypes x conditions) and ranging from 4 and 9% as it was previously reported in *Arabidopsis thaliana* (Baubec *et al.* 2009).

Altogether, zebularine is an effective way to reduce the percentage of methylation in plant *de novo* formed tissues. This allows us to generate, for the first time, hypomethylated *L. grandiflora* morphotypes in both conditions to assess the impact of DNA hypomethylation on invasive plant's fast adaptation.

Induced hypomethylation affects morphotypes and their plasticity proposing a role of epigenetic in the fast transition from aquatic to terrestrial morphotypes

Hypomethylated morphotypes in both terrestrial and aquatic conditions were shown to exhibit significant variations compared to controls at the developmental, hormonal and metabolic levels. Developmental effects induced by variations of DNA methylation have already been largely reported in plants for example: Baubec *et al.* (2009) showed a reduction of growth after zebularine treatment in *Arabidopsis thaliana.* Alonso *et al.* (2017) observed a decrease of leaf numbers after treatment with 5-azacytidine and Tatra *et al.* (2000) reported stem elongation in *Stellaria longipes* in response to shade using 5-azacytidine. Here, similar results were observed for *Ludwigia grandiflora* morphotypes but with positive effect on development such as an increase of leaf and internode numbers.

Another main input of our analysis, was to combine developmental analysis with hormone and metabolite levels. Phytohormones contribute not only to development but also to stress responses in plants. In addition, there is growing evidence of a crosstalk between hormonal balance and epigenetic regulation (Yamamuro *et al.* 2016, Zhang *et al.* 2016, Campos-Rivero *et al.* 2017, Maury *et al.* 2019).

Here, we showed that hormonal balances of SA, Auxine and LJA were affected in relation to the plasticity of the morphotypes in changing conditions. In addition, we detected a significant negative correlation between %mC and SA amount in roots. This is in accordance to Zhang *et al.* (2016) reporting

that the chromatin remodeler DDM1, involved in DNA methylation patterns, promotes hybrid vigor by regulating SA. In addition, connections between DNA methylation and hormone pathways in shoot apex have been recently highlighted (Lafon-Placette *et al.* 2018, Le Gac *et al.* 2018, Maury *et al.* 2019). Few studies suggested also relationships between phytohormones, metabolites and epigenetic mechanisms (Latzel *et al.* 2012, Kooke *et al.* 2018, Schvartzman *et al.* 2018). Indeed, Kooke *et al.* (2018) found some correlations between several EpiRIL of *Arabidopsis thaliana* and some secondary metabolites. Shen *et al.* (2016) summarized interaction between metabolic/redox signaling with epigenetics according to environmental conditions in plant adaptation suggesting a "bi-directional interplay" of epigenetics and metabolism. Here, we found several metabolites (amino acids, sugars and organic acids) affected by hypomethylation and six of them could be correlated to the %mC levels. However, the complex interplay among epigenetic and metabolism needs more insight before being clearly interpreted.

Our fine characterization of the hypomethylation effects on the two invasive morphotypes in terrestrial and aquatic conditions at the developmental, hormonal and metabolic levels allow us to carry out an integrative approach using PCA. As we hypothesized, DNA hypomethylation impacted differently aquatic and terrestrial morphotypes of *L. grandiflora* in response to both conditions. The main outcome of this integrative analysis was that inducing hypomethylation on the aquatic morphotype gives a control terrestrial morphotype like phenotype. Altogether, our data suggest that hypomethylation of the invasive aquatic morphotype mimics the terrestrial fast transition and propose an implication of the epigenome in the appearance of this new terrestrial invasive morphotype. Our data strongly supports the actual hypothesis of a role of epigenetics in biological invasions (Marin *et al.* 2019) and the next challenge will be to evaluate, at the genomic scale, the combined roles of epigenetics and transposable elements.

Author contributions

J.G, S.M and D.B designed and conducted the research. J.G and D.B performed zebularin treatment and measured morphological traits. A.D and S.M carried out DNA methylation analysis, S.C quantified phytohormones and D.R with J.G realized metabolomic analysis. J.G, S.M and D.B analyzed the data, conceived the idea and the initial structure of the manuscript. All authors have read and approved the final manuscript.

Acknowledgments

This work was supported by the the "INRA Département EFPA" (grant PI EFPA-2016 to D.Band S.M.), the RTP3E-CNRS (http://rtp-3e.wixsite.com/rt3e), the "Région Bretagne and INRA Département EFPA" (PhD grant to J.G.) and LabEx Saclay Plant Sciences-SPS (ANR-10-LABX-0040-SPS).

References

Allis CD, Jenuwein T (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. Nature Reviews Genetics 17: 487–500

Alonso C, Medrano M, Pérez R, Bazaga P, Herrera CM (2017) Tissue-Specific Response to Experimental Demethylation at Seed Germination in the Non-Model Herb Erodium cicutarium. Epigenomes 1: 16

Alonso C, Pérez R, Bazaga P, Herrera CM (2015) Global DNA cytosine methylation as an evolving trait: phylogenetic signal and correlated evolution with genome size in angiosperms. Front Genet. doi: 10.3389/fgene.2015.00004

Alonso C, Pérez R, Bazaga P, Medrano M, Herrera CM (2016) MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. Molecular Ecology Resources 16: 80–90

Amoah S, Kurup S, Rodriguez Lopez C, Welham SJ, Powers SJ, Hopkins CJ, Wilkinson MJ, King GJ (2012) A Hypomethylated population of Brassica rapa for forward and reverse Epi-genetics. BMC Plant Biology 12: 193

Aranda J, Attana F, Tuñón I (2017) Molecular Mechanism of Inhibition of DNA Methylation by Zebularine. ACS Catal 7: 1728–1732

Avramova Z (2019) Defence-related priming and responses to recurring drought: Two manifestations of plant transcriptional memory mediated by the ABA and JA signalling pathways. Plant, Cell & Environment 42: 983–997

Baubec T, Pecinka A, Rozhon W, Mittelsten Scheid O (2009) Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine. The Plant Journal 57: 542–554

Baulcombe DC, Dean C (2014) Epigenetic Regulation in Plant Responses to the Environment. Cold Spring Harb Perspect Biol. doi: 10.1101/cshperspect.a019471

Becker C, Hagmann J, Müller J, Koenig D, Stegle O, Borgwardt K, Weigel D (2011) Spontaneous epigenetic variation in the Arabidopsis thaliana methylome. Nature 480: 245–249

Bewick AJ, Schmitz RJ (2017) Gene body DNA methylation in plants. Curr Opin Plant Biol 36: 103–110

Billet K, Genitoni J, Bozec M, Renault D, Barloy D (2018) Aquatic and terrestrial morphotypes of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora* , show distinct morphological and metabolomic responses. Ecology and Evolution 8: 2568–2579

Bossdorf O, Arcuri D, Richards CL, Pigliucci M (2010) Experimental alteration of DNA methylation affects the phenotypic plasticity of ecologically relevant traits in Arabidopsis thaliana. Evolutionary Ecology 24: 541–553

Bräutigam K, Vining KJ, Lafon-Placette C, Fossdal CG, Mirouze M, Marcos JG, Fluch S, Fraga MF, Guevara MÁ, Abarca D, et al (2013) Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. Ecology and Evolution 3: 399–415

Brock RD, Davidson JL (1994) 5-azacytidine and gamma rays partially substitute for cold treatment in vernalizing winter wheat. Environmental and Experimental Botany 34: 195–199

Burn JE, Bagnall DJ, Metzger JD, Dennis ES, Peacock WJ (1993) DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. PNAS 90: 287–291

Campos-Rivero G, Osorio-Montalvo P, Sánchez-Borges R, Us-Camas R, Duarte-Aké F, De-la-Peña C (2017) Plant hormone signaling in flowering: An epigenetic point of view. Journal of Plant Physiology 214: 16–27

Causevic A, Gentil M-V, Delaunay A, El-Soud WA, Garcia Z, Pannetier C, Brignolas F, Hagège D, Maury S (2006) Relationship between DNA methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation states in sugarbeet lines. Planta 224: 812–827

Cheng JC, Yoo CB, Weisenberger DJ, Chuang J, Wozniak C, Liang G, Marquez VE, Greer S, Orntoft TF, Thykjaer T, et al (2004) Preferential response of cancer cells to zebularine. Cancer Cell 6: 151–158

Chown SL, Slabber S, McGeoch MA, Janion C, Leinaas HP (2007) Phenotypic plasticity mediates climate change responses among invasive and indigenous arthropods. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences 274: 2531–2537

Conde D, Le Gac A-L, Perales M, Dervinis C, Kirst M, Maury S, González-Melendi P, Allona I (2017) Chilling-responsive DEMETER-LIKE DNA demethylase mediates in poplar bud break: Role of active DNA demethylase in trees' bud break. Plant, Cell & Environment 40: 2236–2249

Crisp PA, Ganguly D, Eichten SR, Borevitz JO, Pogson BJ (2016) Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. Science Advances 2: e1501340–e1501340

Daehler CC (2003) Performance Comparisons of Co-Occurring Native and Alien Invasive Plants: Implications for Conservation and Restoration. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics 34: 183–211

Dandelot S, Verlaque R, Dutartre A, Cazaubon A (2005) Ecological, Dynamic and Taxonomic Problems Due to Ludwigia (Onagraceae) in France. Hydrobiologia 551: 131–136

Davidson AM, Jennions M, Nicotra AB (2011) Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis: Invasive species have higher phenotypic plasticity. Ecology Letters 14: 419–431

Duncan EJ, Gluckman PD, Dearden PK (2014) Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype?: EPIGENETICS, PLASTICITY, AND EVOLUTION. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution 322: 208–220

Early R, Bradley BA, Dukes JS, Lawler JJ, Olden JD, Blumenthal DM, Gonzalez P, Grosholz ED, Ibañez I, Miller LP, et al (2016) Global threats from invasive alien species in the twenty-first century and national response capacities. Nature Communications 7: 12485

Fang C, Zhang H, Wan J, Wu Y, Li K, Jin C, Chen W, Wang S, Wang W, Zhang H, et al (2016) Control of Leaf Senescence by an MeOH-Jasmonates Cascade that Is Epigenetically Regulated by OsSRT1 in Rice. Molecular Plant 9: 1366–1378

Fieldes MA, Schaeffer SM, Krech MJ, Brown JCL (2005) DNA hypomethylation in 5-azacytidine-induced early-flowering lines of flax. Theor Appl Genet 111: 136–149

Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ, Dennis ES (1998) DNA METHYLATION IN PLANTS. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 49: 223–247

Fox J (2005) The R Commander: A Basic-Statistics Graphical User Interface to R. Journal of Statistical Software 14: 1–42

Gao L, Geng Y, Li B, Chen J, Yang J (2010) Genome-wide DNA methylation alterations of Alternanthera philoxeroides in natural and manipulated habitats: implications for epigenetic

regulation of rapid responses to environmental fluctuation and phenotypic variation: Environmental epigenetics of A. philoxeroides. Plant, Cell & Environment 33: 1820–1827

Garg R, Narayana Chevala V, Shankar R, Jain M (2015) Divergent DNA methylation patterns associated with gene expression in rice cultivars with contrasting drought and salinity stress response. Scientific Reports 5: 14922

Godoy O, Valladares F, Castro-Díez P (2011) Multispecies comparison reveals that invasive and native plants differ in their traits but not in their plasticity: Phenotypic plasticity and invasiveness. Functional Ecology 25: 1248–1259

Gourcilleau D, Bogeat-Triboulot M-B, Thiec DL, Lafon-Placette C, Delaunay A, El-Soud WA, Brignolas F, Maury S (2010) DNA methylation and histone acetylation: genotypic variations in hybrid poplars, impact of water deficit and relationships with productivity. Ann For Sci 67: 208

Gourcilleau D, Mousset M, Latutrie M, Marin S, Delaunay A, Maury S, Pujol B (2019) Assessing Global DNA Methylation Changes Associated with Plasticity in Seven Highly Inbred Lines of Snapdragon Plants (Antirrhinum majus). Genes 10: 256

Guo J-E, Hu Z, Yu X, Li A, Li F, Wang Y, Tian S, Chen G (2018) A histone deacetylase gene, SlHDA3, acts as a negative regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation. Plant Cell Reports 37: 125–135

van Gurp TP, Wagemaker NCAM, Wouters B, Vergeer P, Ouborg JNJ, Verhoeven KJF (2016) epiGBS: reference-free reduced representation bisulfite sequencing. Nature Methods 13: 322–324

Haury J, Druel A, Cabral T, Paulet Y, Bozec M, Coudreuse J (2014) Which adaptations of some invasive Ludwigia spp. (Rosidae, Onagraceae) populations occur in contrasting hydrological conditions in Western France? Hydrobiologia 737: 45–56

Hudson K, Luo S, Hagemann N, Preuss D (2011) Changes in Global Gene Expression in Response to Chemical and Genetic Perturbation of Chromatin Structure. PLOS ONE 6: e20587

Hussner A, Windhaus M, Starfinger U (2016) From weed biology to successful control: an example of successful management of *Ludwigia grandiflora* in Germany. Weed Research 56: 434–441

Kawakatsu T, Huang S-SC, Jupe F, Sasaki E, Schmitz RJ, Urich MA, Castanon R, Nery JR, Barragan C, He Y, et al (2016) Epigenomic Diversity in a Global Collection of Arabidopsis thaliana Accessions. Cell 166: 492–505

van Kleunen M, Dawson W, Essl F, Pergl J, Winter M, Weber E, Kreft H, Weigelt P, Kartesz J, Nishino M, et al (2015) Global exchange and accumulation of non-native plants. Nature 525: 100–103

Kohli A, Sreenivasulu N, Lakshmanan P, Kumar PP (2013) The phytohormone crosstalk paradigm takes center stage in understanding how plants respond to abiotic stresses. Plant Cell Reports 32: 945–957

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 Online 27: 337–348

Kooke R, Morgado L, Becker FFM, Eekelen H van, Hazarika R, Zhang QF, Vos RCH de, Johannes F, Keurentjes JJB (2018) Epigenetic mapping of the Arabidopsis metabolome reveals mediators of the epigenotype-phenotype map. Genome Res gr.232371.117

Kurdyukov S, Bullock M (2016) DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. Biology 5: 3

Lafon-Placette C, Le Gac A-L, Chauveau D, Segura V, Delaunay A, Lesage-Descauses M-C, Hummel I, Cohen D, Jesson B, Le Thiec D, et al (2018) Changes in the epigenome and transcriptome of the poplar shoot apical meristem in response to water availability affect preferentially hormone pathways. J Exp Bot 69: 537–551

Lamarque LJ, Porté AJ, Eymeric C, Lasnier J-B, Lortie CJ, Delzon S (2013) A Test for Pre-Adapted Phenotypic Plasticity in the Invasive Tree Acer negundo L. PLoS ONE 8: e74239

Lambé P, Mutambel HSN, Fouché J-G, Deltour R, Foidart J-M, Gaspar T (1997) DNA methylation as a key process in regulation of organogenic totipotency and plant neoplastic progression? In Vitro CellDevBiol-Plant 33: 155–162

Lambert E, Dutartre A, Coudreuse J, Haury J (2010) Relationships between the biomass production of invasive Ludwigia species and physical properties of habitats in France. Hydrobiologia 656: 173–186

Lämke J, Bäurle I (2017) Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. Genome Biology. doi: 10.1186/s13059-017-1263-6

Lande R (2009) Adaptation to an extraordinary environment by evolution of phenotypic plasticity and genetic assimilation. Journal of Evolutionary Biology 22: 1435–1446

Latzel V, Allan E, Bortolini Silveira A, Colot V, Fischer M, Bossdorf O (2013) Epigenetic diversity increases the productivity and stability of plant populations. Nature Communications. doi: 10.1038/ncomms3875

Latzel V, Rendina González AP, Rosenthal J (2016) Epigenetic Memory as a Basis for Intelligent Behavior in Clonal Plants. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2016.01354

Latzel V, Zhang Y, Karlsson Moritz K, Fischer M, Bossdorf O (2012) Epigenetic variation in plant responses to defence hormones. Annals of Botany 110: 1423–1428

Le Gac A-L, Delaunay A, Maury S, Lafon-Placette C (2019) Developmental, genetic and environmental variations of global DNA methylation in the first leaves emerging from the shoot apical meristem in poplar trees. Plant Signaling & Behavior 14: 1596717

Le Gac A-L, Lafon-Placette C, Chauveau D, Segura V, Delaunay A, Fichot R, Marron N, Le Jan I, Berthelot A, Bodineau G, et al (2018) Winter-dormant shoot apical meristem in poplar trees shows environmental epigenetic memory. Journal of Experimental Botany 69: 4821–4837

Lê S, Josse J, Husson F (2008) FactoMineR : An *R* Package for Multivariate Analysis. Journal of Statistical Software. doi: 10.18637/jss.v025.i01

Li W, Chen W, Qi X, Wang Q, Chen J (2013) Variation of cytosine methylation in response to water availability in two contrasting growth types of an amphibious plant Alternanthera philoxeroides. Biochemical Systematics and Ecology 50: 175–181

Li Y, Kumar S, Qian W (2018) Active DNA demethylation: mechanism and role in plant development. Plant Cell Rep 37: 77–85

Marin P, Genitoni J, Barloy D, Maury S, Gibert P, Ghalambor CK, Vieira C (2019) Biological invasion: The influence of the hidden side of the (epi)genome. Funct Ecol. doi: 10.1111/1365-2435.13317

Matzek V (2012) Trait Values, Not Trait Plasticity, Best Explain Invasive Species' Performance in a Changing Environment. PLoS ONE 7: e48821

Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E, Flors V (2017) Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. Annual Review of Plant Biology 68: 485–512

Maury S, Sow MD, Le Gac A-L, Genitoni J, Lafon-Placette C, Mozgova I (2019) Phytohormone and chromatin Crosstalk: The Missing Link For Developmental Plasticity? Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2019.00395

Meyer P (2018) Chapter One - Epigenetics – A Historical Perspective. *In* M Mirouze, E Bucher, P Gallusci, eds, Advances in Botanical Research. Academic Press, pp 1–19

Meyer P (2015) Epigenetic variation and environmental change: Fig. 1. Journal of Experimental Botany 66: 3541–3548

Morris MRJ (2014) Plasticity-Mediated Persistence in New and Changing Environments. International Journal of Evolutionary Biology 2014: 1–18

Osorio-Montalvo P, Sáenz-Carbonell L, De-la-Peña C (2018) 5-Azacytidine: A Promoter of Epigenetic Changes in the Quest to Improve Plant Somatic Embryogenesis. International Journal of Molecular Sciences 19: 3182

Pigliucci M (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? Trends in Ecology & Evolution 20: 481–486

Puy J, Dvořáková H, Carmona CP, Bello F de, Hiiesalu I, Latzel V (2018) Improved demethylation in ecological epigenetic experiments: Testing a simple and harmless foliar demethylation application. Methods in Ecology and Evolution 9: 744–753

Raj S, Bräutigam K, Hamanishi ET, Wilkins O, Thomas BR, Schroeder W, Mansfield SD, Plant AL, Campbell MM (2011) Clone history shapes Populus drought responses. Proceedings of the National Academy of Sciences 108: 12521–12526

Rey O, Danchin E, Mirouze M, Loot C, Blanchet S (2016) Adaptation to Global Change: A Transposable Element–Epigenetics Perspective. Trends in Ecology & Evolution 31: 514–526

Richards CL, Alonso C, Becker C, Bossdorf O, Bucher E, Colomé-Tatché M, Durka W, Engelhardt J, Gaspar B, Gogol-Döring A, et al (2017) Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. Ecol Lett 20: 1576–1590

Richards CL, Bossdorf O, Pigliucci M (2010) What Role Does Heritable Epigenetic Variation Play in Phenotypic Evolution? BioScience 60: 232–237

Richards CL, Schrey AW, Pigliucci M (2012) Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation. Ecology Letters 15: 1016–1025

Richards EJ (2006) Inherited epigenetic variation — revisiting soft inheritance. Nature Reviews Genetics 7: 395–401

Roux CL, Prete SD, Boutet-Mercey S, Perreau F, Balagué C, Roby D, Fagard M, Gaudin V (2014) The hnRNP-Q Protein LIF2 Participates in the Plant Immune Response. PLOS ONE 9: e99343

Sahu PP, Pandey G, Sharma N, Puranik S, Muthamilarasan M, Prasad M (2013) Epigenetic mechanisms of plant stress responses and adaptation. Plant Cell Reports 32: 1151–1159

Schmid MW, Heichinger C, Coman Schmid D, Guthörl D, Gagliardini V, Bruggmann R, Aluri S, Aquino C, Schmid B, Turnbull LA, et al (2018) Contribution of epigenetic variation to adaptation in Arabidopsis. Nature Communications. doi: 10.1038/s41467-018-06932-5

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

Schvartzman JM, Thompson CB, Finley LWS (2018) Metabolic regulation of chromatin modifications and gene expression. J Cell Biol 217: 2247–2259

Serra A-A, Nuttens A, Larvor V, Renault D, Couée I, Sulmon C, Gouesbet G (2013) Low environmentally relevant levels of bioactive xenobiotics and associated degradation products cause cryptic perturbations of metabolism and molecular stress responses in Arabidopsis thaliana. J Exp Bot 64: 2753–2766

Sexton JP, MCKay JK, Sala A (2002) Plasticity and genetic diversity may allow saltcedar to invade cold climates in North America. Ecological Applications 12: 9

Seymour DK, Becker C (2017) The causes and consequences of DNA methylome variation in plants. Current Opinion in Plant Biology 36: 56–63

Shen Y, Issakidis-Bourguet E, Zhou D-X (2016) Perspectives on the interactions between metabolism, redox, and epigenetics in plants. Journal of Experimental Botany 67: 5291–5300

Sow MD, Segura V, Chamaillard S, Jorge V, Delaunay A, Lafon-Placette C, Fichot R, Faivre-Rampant P, Villar M, Brignolas F, et al (2018) Narrow-sense heritability and PST estimates of

DNA methylation in three Populus nigra L. populations under contrasting water availability. Tree Genetics & Genomes 14: 78

Tatra GS, Miranda J, Chinnappa CC, Reid DM (2000) Effect of light quality and 5-azacytidine on genomic methylation and stem elongation in two ecotypes of Stellaria longipes. Physiologia Plantarum 109: 313–321

Teyssier C, Maury S, Beaufour M, Grondin C, Delaunay A, Le Metté C, Ader K, Cadene M, Label P, Lelu-Walter M-A (2014) In search of markers for somatic embryo maturation in hybrid larch (*Larix* × *eurolepis*): global DNA methylation and proteomic analyses. Physiologia Plantarum 150: 271–291

Theoharides KA, Dukes JS (2007) Plant invasion across space and time: factors affecting nonindigenous species success during four stages of invasion. New Phytologist 176: 256–273

Trap-Gentil M-V, Hébrard C, Lafon-Placette C, Delaunay A, Hagège D, Joseph C, Brignolas F, Lefebvre M, Barnes S, Maury S (2011) Time course and amplitude of DNA methylation in the shoot apical meristem are critical points for bolting induction in sugar beet and bolting tolerance between genotypes. J Exp Bot 62: 2585–2597

Tricker PJ (2015) Transgenerational inheritance or resetting of stress-induced epigenetic modifications: two sides of the same coin. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2015.00699

Trucchi E, Mazzarella AB, Gilfillan GD, Lorenzo MT, Schönswetter P, Paun O (2016) BsRADseq: screening DNA methylation in natural populations of non-model species. Molecular Ecology 25: 1697–1713

Trussell GC, Smith LD (2000) Induced defenses in response to an invading crab predator: An explanation of historical and geographic phenotypic change. Proceedings of the National Academy of Sciences 97: 2123–2127

Xia J, Sinelnikov IV, Han B, Wishart DS (2015) MetaboAnalyst 3.0--making metabolomics more meaningful. Nucleic Acids Res 43: W251-257

Xie HJ, Li H, Liu D, Dai WM, He JY, Lin S, Duan H, Liu LL, Chen SG, Song XL, et al (2015) *ICE1* demethylation drives the range expansion of a plant invader through cold tolerance divergence. Molecular Ecology 24: 835–850

Yamamuro C, Zhu J-K, Yang Z (2016) Epigenetic Modifications and Plant Hormone Action. Molecular Plant 9: 57–70

Yong W-S, Hsu F-M, Chen P-Y (2016) Profiling genome-wide DNA methylation. Epigenetics & Chromatin 9: 26

Zhang Q, Li Y, Xu T, Srivastava AK, Wang D, Zeng L, Yang L, He L, Zhang H, Zheng Z, et al (2016) The chromatin remodeler DDM1 promotes hybrid vigor by regulating salicylic acid metabolism. Cell Discovery. doi: 10.1038/celldisc.2016.27

Zhang Y-Y, Fischer M, Colot V, Bossdorf O (2013) Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. New Phytologist 197: 314–322

Zhong S, Fei Z, Chen Y-R, Zheng Y, Huang M, Vrebalov J, McQuinn R, Gapper N, Liu B, Xiang J, et al (2013) Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. Nature Biotechnology 31: 154–159

Zhu R, Shevchenko O, Ma C, Maury S, Freitag M, Strauss SH (2013) Poplars with a PtDDM1-RNAi transgene have reduced DNA methylation and show aberrant post-dormancy morphology. Planta 237: 1483–1493

Supporting information

Table S1. Morphological biomass and water content variables in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t).

Table S2. Phytohormones quantities in roots and shoots in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t).

Table S3. Metabololites amounts in shoots and roots in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t).

Fig.S1 Supplementary morphological variables measured in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t).

Fig.S2 Supplementary phytohormones measured (shoots and roots) in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t).

Fig.S3 Supplementary metabolites measured (shoots and roots) in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t).

Fig.S4 Correlation matrix between morphological, phytohormone and metabolites variables and global DNA methylation percentages.

Fig.S5 Principal Component analysis (PCA) of global methylation percentages, morphological traits, phytohormones and metabolites (shoots and roots) in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t).

Supporting information

Table S1. Morphological biomass and water content variables in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t). Significance codes: .001 "***"; .01 "**"; .05 "*"; nonsignificant "NS." Anova

	Factors	morphotype		condition		treatment	
		p	Inequality	p	Inequality	p	Inequality
Morphological variables	Length	***	Am>Tm	***	a>t	NS	
	number of leaves	NS		***	t>a	NS	
	number of internodes	***	Tm>Am	**	t>a		
	Length of internodes	***	Am>Tm	***	a>t	**	ctrl>zeb
	Number of nodes with roots	***	Tm>Am	***	a>t	NS	
	Number of buds	NS		***	t>a	NS	
Biomass variables	(log) Fresh mass of shoots	***	Am>Tm	***	t>a	*	ctrl>zeb
	Fresh mass of roots	NS		***	t>a	NS	
	(log) Dry mass of shoots	**	Am>Tm	***	t>a	NS	
	(log) Dry mass of roots	NS		***	t>a	NS	
Water content	Water content			***	a>t	***	ctrl>zeb
	Shoots ratio	***	Am>Tm	***	a>t	***	ctrl>zeb
	Roots ratio					*	ctrl>zeb

Table S2. Phytohormones quantities in roots and shoots in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t). Significance codes: .001 "***"; .01 "**"; .05 "*"; nonsignificant "NS." Anova. Analysis of variance for auxin was not performed in roots as the results were derived from different quantifications

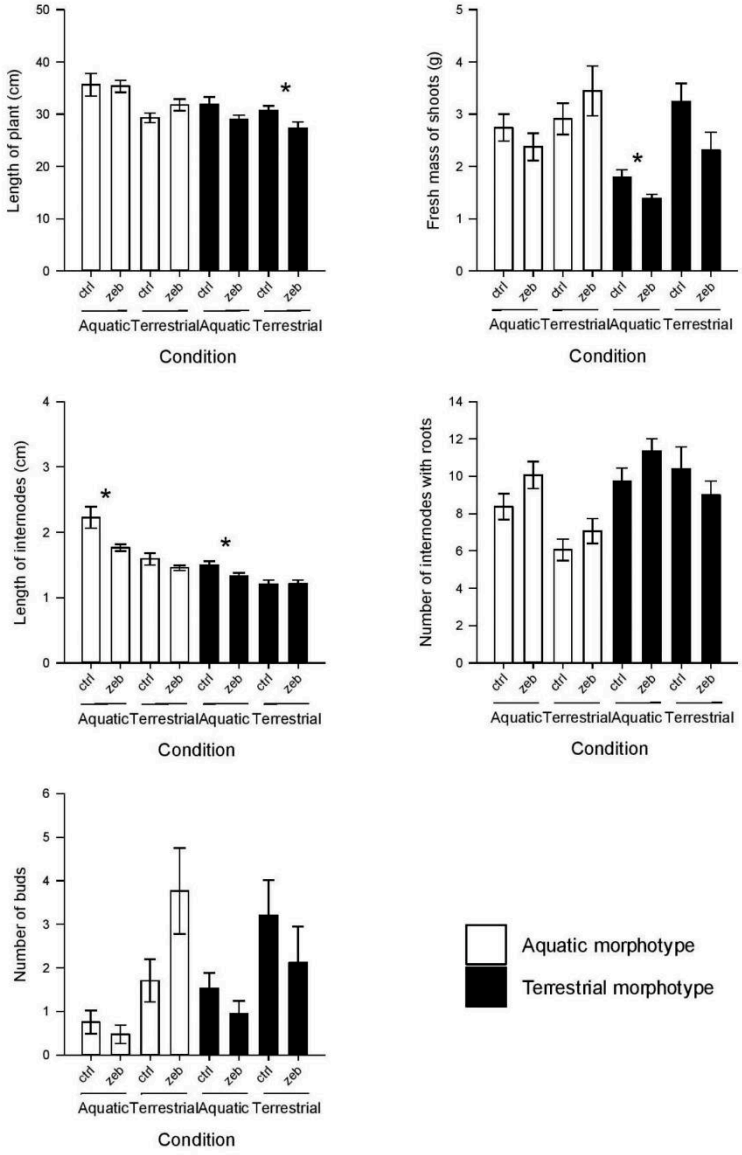
	Factors	**morphotype**		**condition**		**treatment**	
		p	Inequality	p	Inequality	p	Inequality
In shoots	Abscisic acid	NS		**	t>a	NS	
	Auxin	NS		NS		NS	
	Jasmonic acid	NS		NS		NS	
	Leucine jasmonyl acid	NS		*	t>a	NS	
	Salycilic acid	*	Am>Tm	***	t>a	*	ctrl>zeb
In roots	Auxin	Anova do not carried out because auxin results come from different quantifications					
	Jasmonic acid	NS		***	t>a	***	ctrl>zeb
	(log) Leucine jasmonyl acid	**	Tm>Am	***	t>a	*	zeb>ctrl
	Salycilic acid	NS		NS		NS	

Table S3. Metabololites amounts in shoots and roots in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t). Significance codes: .001 "***"; .01 "**"; .05 "*"; nonsignificant "NS." Anova

	Shoots			
Morphotype	**Am>Tm**		**Tm>Am**	
	metabolites	pvalue	metabolites	pvalue
	Proline	***	Phosphoric acid	*
	Galactose	**	Serine	*
	Fumaric acid	*	Aminobutyric acid	**
			Quinic acid	*
Condition	**a>t**		**t>a**	
	metabolites	pvalue	metabolites	pvalue
	Valine	**	Proline	**
	Leucine	***	Malic acid	***
	Phosphoric acid	***	Fructose	*
	Serine	***	Glucose	**
	Aspartic acid	***	Galactose	**
	Aminobutyric acid	**	Sorbitol	**
	Putrescine	*	Gluconolactone	*
	G3P	***	Erythritol	**
	Quinic acid	**	Glyceric acid	***
			Inositol	*
Treatment	**ctrl>zeb**		**zeb>ctrl**	
	metabolites	pvalue	metabolites	pvalue
	Proline	***	Leucine	**
	Fructose	***	Serine	***
	Glucose	***	G3P	**
	Ethanolamine	*	F6P	*
			G6P	*
			Maltose	***

	Roots			
Morphotype	**Am>Tm**		**Tm>Am**	
	metabolites	pvalue	metabolites	pvalue
	Fumaric acid	**	Phosphoric acid	***
			Quinic acid	***
			Fructose	***
			Maltose	***
			Mannose	**
	a>t		**t>a**	

	metabolites	pvalue	metabolites	pvalue
Condition	Phosphoric acid	***	Glycerol	*
	Phenylalanine	*	Malic acid	***
	Arabitol	*	G3P	*
	Quinic acid	***	Citric acid	***
	Maltose	*	Fructose	***
			Galactose	***
			Glucose	*
			Galatunoric acid	***
Treatment	**ctrl>zeb**		**zeb>ctrl**	
	metabolites	pvalue	metabolites	pvalue
	Glycerol	*	Phosphoric acid	*
	Fumaric acid	*	Quinic acid	*
	Mannose	***	F6P	*
			G6P	*
			Maltose	***


Length of plant (cm)
Fresh mass of shoots (g)
Length of internodes (cm)
Number of internodes with roots
Number of buds
ctrl
zeb
Aquatic
Terrestrial
Condition
Aquatic morphotype
Terrestrial morphotype

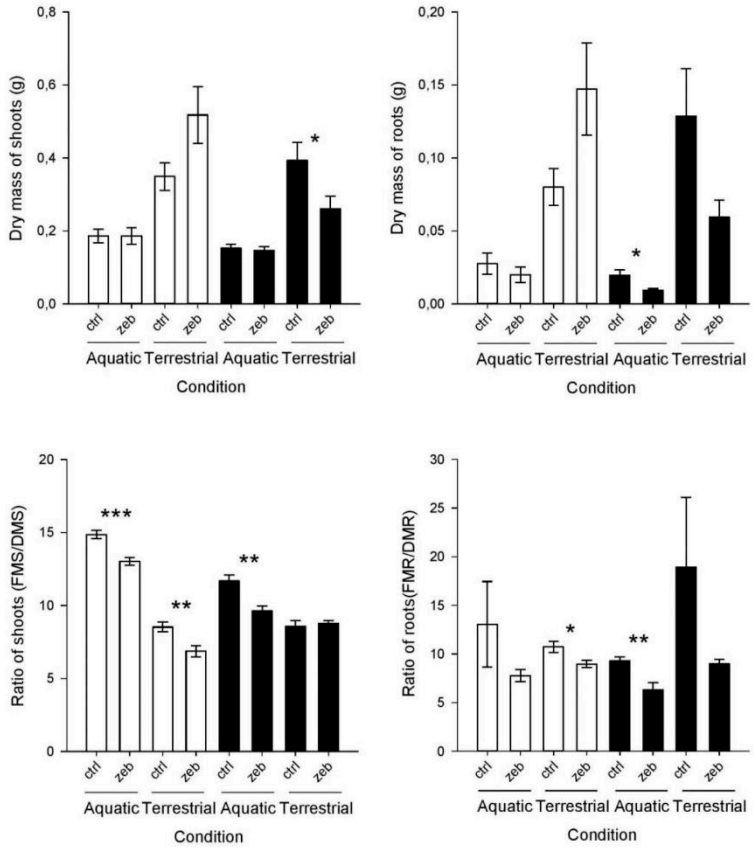


Fig.S1 Supplementary morphological variables measured in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t). Length of plant, length of internodes (cm), fresh mass of shoots, dry mass of shoots and roots (g), number of buds, number of internodes with roots ratio of shoots and water content. Bars represent the mean value of ten biological replicates with their standard errors. Stars correspond to means comparison by *t*-test between zeb and ctrl for a given morphotype and condition. Significance codes are: 0.001= "***"; 0.01= "**"; 0.05= "*"; absence of star means no significant difference.

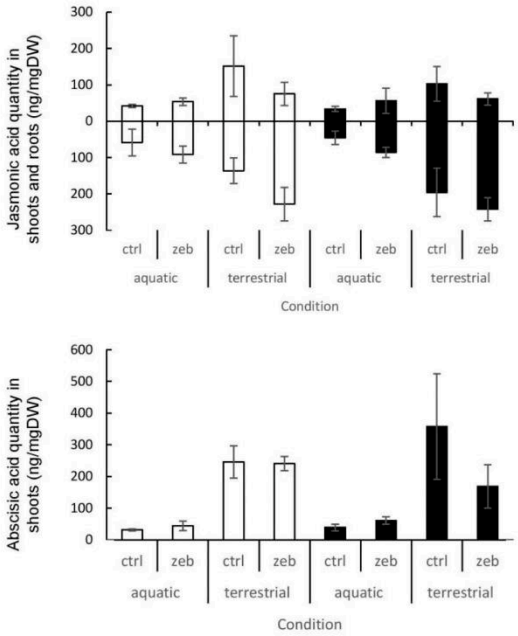
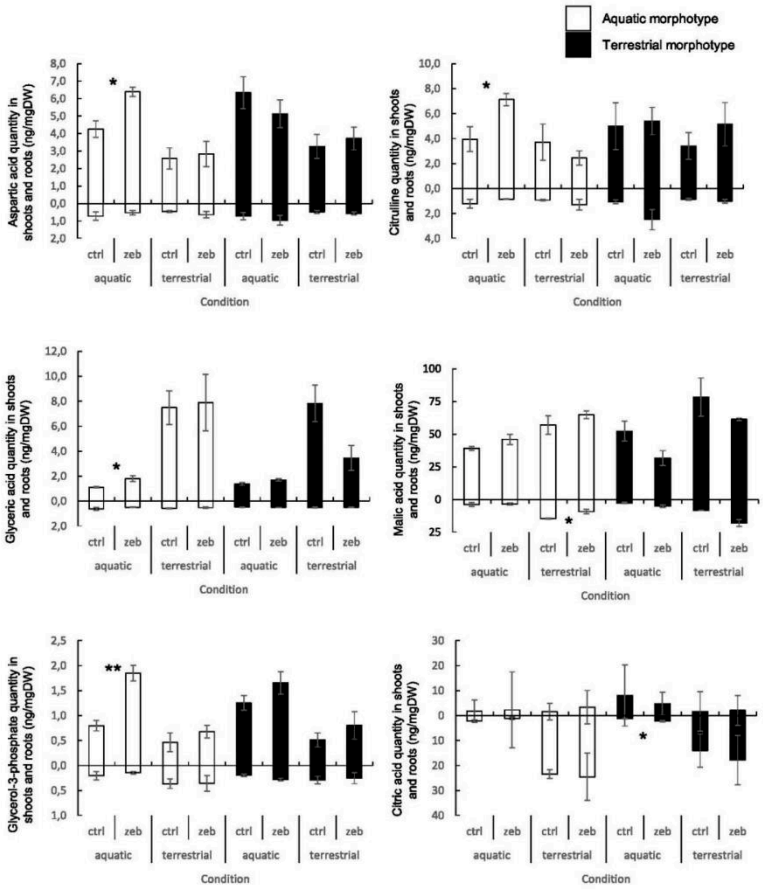
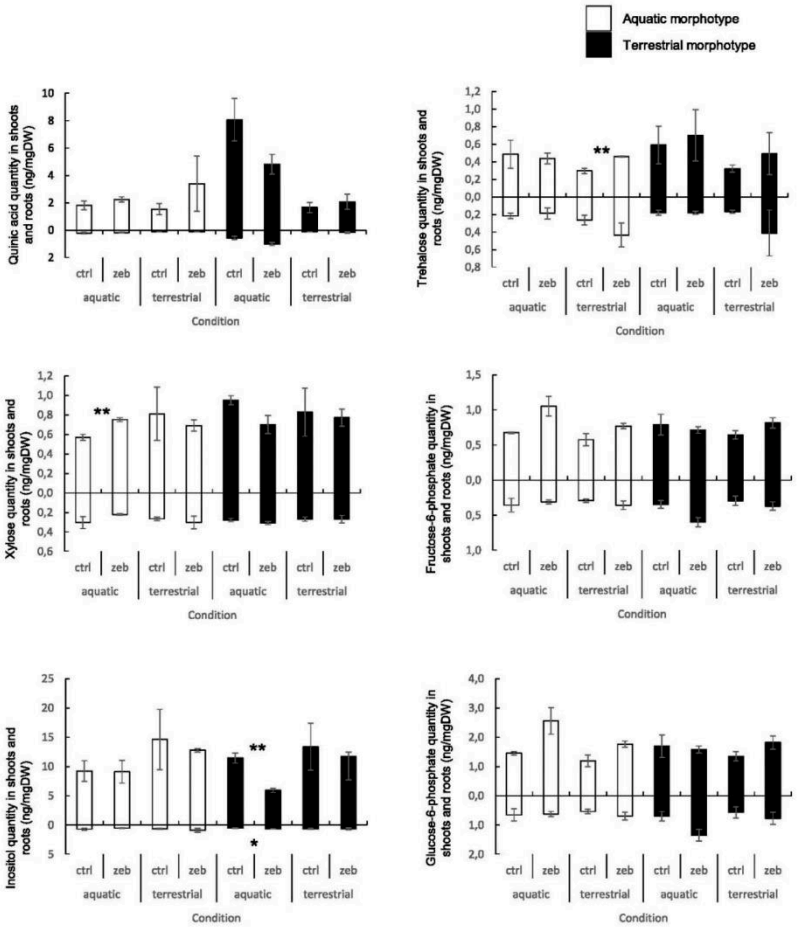


Fig.S2 Supplementary phytohormones measured (shoots and roots) in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t). Jasmonic acid and abscissic acid (in ng/mg of dry mass). Bars represent the mean value of three biological replicates with their standard errors. Stars correspond to means comparison by *t*-test between zeb and ctrl for a given morphotype and condition. Significance codes are: 0.001= "***"; 0.01= "**"; 0.05= "*"; absence of star means no significant difference.


Aquatic morphotype
Terrestrial morphotype
Aspartic acid quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
Citrulline quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
Glyceric acid quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
Malic acid quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
Glycerol-3-phosphate quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
Citric acid quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
ctrl
zeb
aquatic
terrestrial
Condition


Aquatic morphotype
Terrestrial morphotype
Quinic acid quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
Trehalose quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
Xylose quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
Fructose-6-phosphate quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
Inositol quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
Glucose-6-phosphate quantity in shoots and roots (ng/mgDW)
ctrl
zeb
aquatic
terrestrial
Condition
**
*

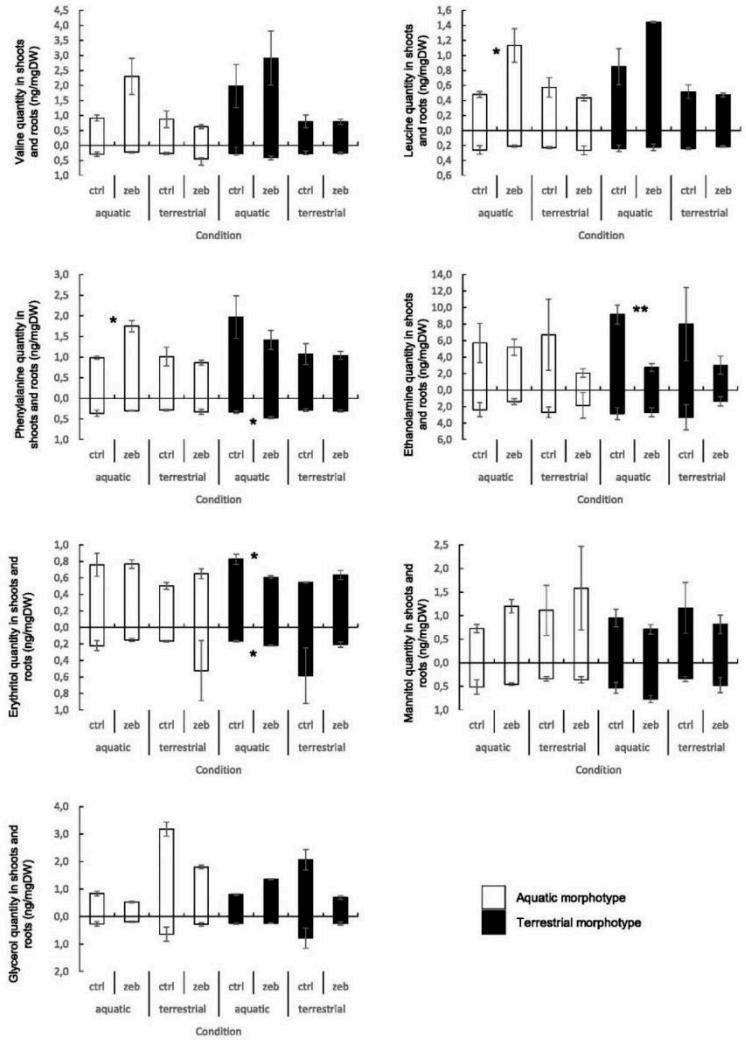


Fig.S3 Supplementary metabolites measured (shoots and roots) in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t). Metabolites quantities were expressed in nmol/mg of dry mass. Bars represent the mean value of three biological replicates with their standard errors. Stars correspond to means comparison by *t*-test between zeb and ctrl for a given morphotype and condition. Significance codes are: 0.001= "***"; 0.01= "**"; 0.05= "*"; absence of star means no significant difference.

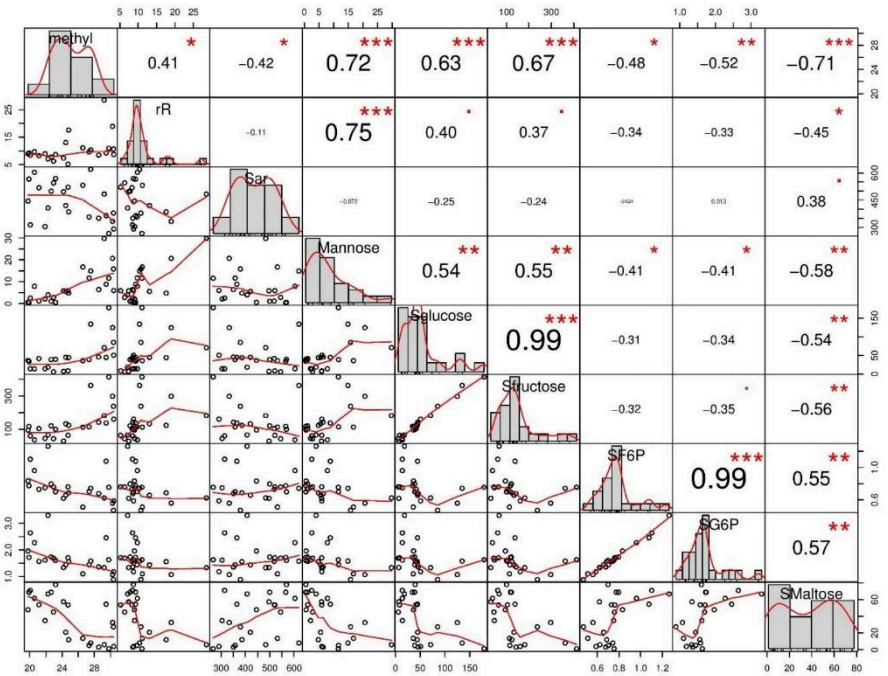


Fig.S4 Correlation matrix between morphological (ratio of root), phytohormones (salicylic acid in roots) and metabolites variables (mannose in root and other in shoot) and global DNA methylation percentages based on Pearson's test. Significance codes are: 0.001= "***"; 0.01= "**"; 0.05= "*"; absence of star means no significant difference.

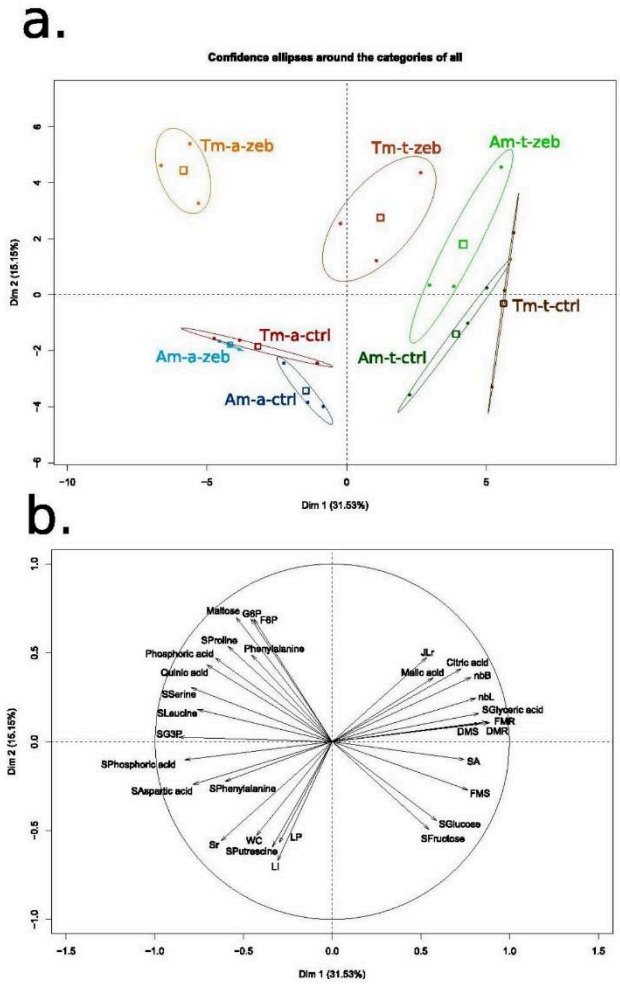


Fig.S5 Principal Component analysis (PCA) of global methylation percentages, morphological traits, phytohormones and metabolites (shoots and roots) in zebularine-treated or untreated aquatic and terrestrial morphotypes (Am and Tm) in both aquatic and terrestrial conditions (-a and -t). (a) Individuals factor map. Each data point represented one biological repeat. (b) Variables factor map. Morphological variables represented are number of leaves (nbL), length of internodes (LI), number of nodes (nbI), number of nodes with roots (nbNR), number of buds (nbB), fresh and dry mass of roots and shoots (FMS, FMR, DMS and DMR), shoots and roots ratio (FMS/DMS = Sr; FMR/DMR = Rr), water content (WC). Phytohormones represented are auxin (IAA), salicylic acid (SA) and leucine jasmonyl acid (JL) in shoots and in roots (IAAr, SAr, JLr). Metabolites are represented in stems with an S and others in roots (see Table S3). Global DNA methylation percentages are indicated by %mC.

3. Présentation synthétique de la publication Maury *et al.*, 2019

L'interaction entre la dynamique de la chromatine et les phytohormones qui ressort de nos travaux est un thème d'actualité. Nous avons particulièrement voulu travailler ce thème à travers une synthèse bibliographique portant sur le méristème et de la plasticité phénotypique. Ce travail a ensuite été valorisé sous la forme d'un article de revue (Maury *et al.*, (2019) dans Frontiers in Plant Science). Cet article replace succinctement le rôle des méristèmes dans le développement des plantes et présente les mécanismes suggérant un lien étroit entre balance hormonale et mécanismes épigénétiques, avant d'insister sur le rôle dans la plasticité. Enfin, nous avons proposé des perspectives pour l'étude de ces interactions entre phytohormones et épigénétique. Celles-ci concernent l'amélioration des méthodologies pour isoler et cultiver des cellules méristématiques à des stades de développement particulier, la possibilité d'étendre ces études à des espèces d'intérêt agronomique en exploitant et développant des nouvelles technologies, comme CRISPR-Cas9, pour décrypter les liens entre phytohormones et mécanismes épigénétiques. Bien que l'avancée des connaissances sur le modèle jussie ne soit pas suffisante pour discuter d'une mécanistique aussi élaborée, ce travail donne des pistes d'interprétation et des perspectives.

4. Publication : Maury et al 2019 (Frontiers in Plant Science)

frontiers in Plant Science

OPINION
published: 05 April 2019
doi: 10.3389/fpls.2019.00395

Phytohormone and Chromatin Crosstalk: The Missing Link For Developmental Plasticity?

Stéphane Maury[1], Mamadou Dia Sow[1], Anne-Laure Le Gac[2], Julien Genitoni[1,3], Clément Lafon-Placette[4] and Iva Mozgova[5,6†]*

[1] LBLGC, INRA, Université d'Orléans, EA1207 USC 1328, Orléans, France, [2] BIOSS Centre for Biological Signaling Studies, Institute for Biology III, University of Freiburg, Freiburg, Germany, [3] ESE, Ecology and Ecosystem Health, Agrocampus Ouest, INRA, Rennes, France, [4] Department of Botany, Charles University, Prague, Czechia, [5] Centre Algatech, Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Trebon, Czechia, [6] Faculty of Science, University of South Bohemia in Ceske Budejovice, Ceske Budejovice, Czechia

Keywords: DNA methylation, epigenetics, meristem, robustness, signaling

OPEN ACCESS

Edited by:
Jean-Benoit Charron, McGill University, Canada

Reviewed by:
Chizuko Yamamuro, Fujian Agriculture and Forestry University, China
Xun Yue, Shandong Agricultural University, China

****Correspondence:***
Stéphane Maury
stephane.maury@univ-orleans.fr

†Present Address:
Iva Mozgova, Biology Centre of the Czech Academy of Sciences, Ceske Budejovice, Czechia

Specialty section:
This article was submitted to Plant Cell Biology, a section of the journal Frontiers in Plant Science

Received: *24 October 2018*
Accepted: *14 March 2019*
Published: *05 April 2019*

Citation:
Maury S, Sow MD, Le Gac A-L, Genitoni J, Lafon-Placette C and Mozgova I (2019) Phytohormone and Chromatin Crosstalk: The Missing Link For Developmental Plasticity? Front. Plant Sci. 10:395. doi: 10.3389/fpls.2019.00395

Plants grow continuously, forming new meristem-derived organs and tissues throughout their post-embryonic life. As sessile organisms, plants need to constantly integrate and reflect environmental fluctuations in their growth and development, which can translate into high level of developmental plasticity in response to environmental changes (Gaillochet and Lohmann, 2015). Alternatively, variable environments can select for robustness, where organisms function across a wide range of conditions with little change in phenotype. Plant growth is then governed by complex interplay of phytohormone signaling, chromatin structure remodeling and gene expression reprogramming. How these regulatory levels are interconnected remains largely enigmatic, but mechanistic evidence of crosstalk between phytohormone signaling and chromatin organization is emerging.

Here we review (1) evidences of molecular mechanisms that mediate the crosstalk between phytohormone signaling, chromatin structure and gene expression (2) how this crosstalk may link to plant developmental plasticity and robustness and finally (3) why meristems may represent central places for this crosstalk allowing plasticity and environmental memory.

CROSSTALK MECHANISMS: A CHICKEN-AND-EGG SITUATION

Phytohormone and epigenetic regulation can interact on multiple levels (**Figure 1**): (1) phytohormone signaling directly affects expression or activity of key chromatin modifiers, (2) chromatin machinery target genes of the phytohormone metabolic/signaling pathways, (3) both players interact on genes involved in developmental or stress responses.

Several examples show that components of phytohormone signaling pathways directly control the activity of key chromatin modifiers such as POLYCOMB REPRESSIVE COMPLEX (PRC) 1 and 2 with histone-methyltransferase activity playing a major role in transcriptional regulation during development (Bratzel et al., 2010; Chen et al., 2010, 2016; Ikeuchi et al., 2015; Mozgová et al., 2017). For example, the brassinosteroid (BR) signaling TFs BRASSINAZOLE-RESISTANT 1 (BZR1) recruits the H3K27me3-demethylase EARLY FLOWERING (ELF) 6 to antagonize the H3K27me3-activity of PRC2, a chromatin modifier, at the flowering repressor *FLOWERING LOCUS C* (*FLC*), preventing precocious floral transition (Yu et al., 2008; Li et al., 2018). Additionally, chromatin complexes can be post-translationally modified by components of phytohormone signaling pathways that influence their activity. For example, abscisic acid (ABA) signaling induces SnRK-mediated phosphorylation of the chromatin remodeling ATPase BRAHMA (BRM), inhibiting its repressive activity at ABA-responsive genes (Peirats-Llobet et al., 2016). These examples demonstrate that activity of chromatin modifiers can be directed to specific loci or directly modulated by phytohormone signaling cascades.

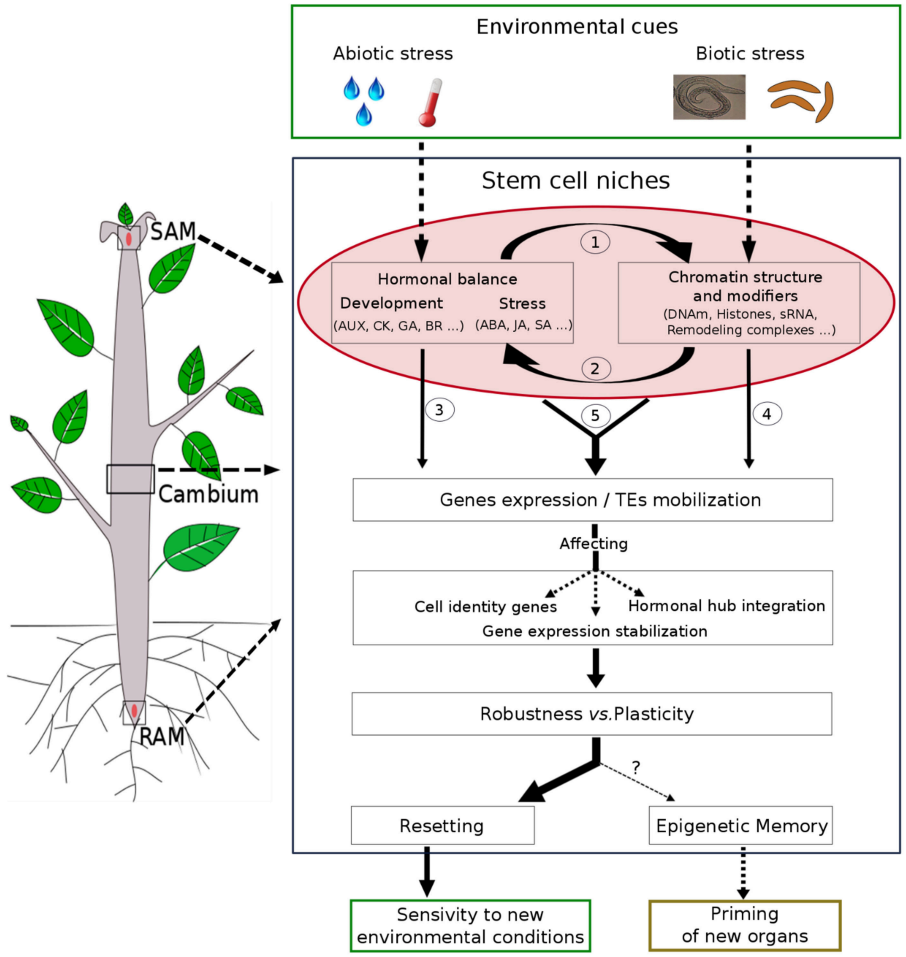


FIGURE 1 | Schematic model of phytohormones and chromatin crosstalk during plant developmental plasticity and robustness. Stem cell niches in SAM, RAM, or cambium are center of morphogenesis giving rise to the aerial and root systems or wood formation in perennials and plasticity in response to various environmental cues. Environmental signals are perceived directly or indirectly by meristems and could affect hormonal balance and/or chromatin structure in a complex crosstalk: (1) hormones can alter chromatin structure and modifiers or (2) chromatin can regulate hormones signaling/biosynthesis. These two mechanisms could then interact separately (3 and 4), jointly or successively (5) affecting genes expression and /or TEs mobilization. Thus, the hormone/chromatin crosstalk can participate in developmental choice (Robustness vs. Plasticity) by controlling cell gene identity in meristems, hormone balance integration, or chromatin stabilization of gene expression. While most of these changes are transient (resetting of hormonal and chromatin modifications) allowing the plant to be respond to new environmental conditions, chromatin states could be maintained through cell division allowing an epigenetic memory and a potential priming of new meristem-derived-organs.

Another possibility is that changes in chromatin structure control phytohormone biosynthesis, signaling and response. Variation in DNA methylation in response to water availability in poplar or among Arabidopsis epigenetic recombinant inbred lines (epiRILs) is associated with changes in jasmonic (JA), salicylic acid (SA) and ethylene responses (Latzel et al., 2012; Lafon-Placette et al., 2018). Similarly, rice plants with reduced H3K27me3 exhibit significant differences in the auxin indole-3-acetic acid (IAA), gibberellin (GA), ABA, JA, and SA content (Liu et al., 2016). Nevertheless, these effects may be pleiotropic and may reflect altered general physiological states. As more direct evidence, PRC2 activity in Arabidopsis seed coat is downregulated by fertilization-dependent auxin, and is required for repressing GA production prior to fertilization, mediating the crosstalk between two phytohormonal pathways (Figueiredo et al., 2015, 2016; Figueiredo and Köhler, 2018). PRC2 also represses auxin biosynthesis and signaling genes in the SAM and leaves of Arabidopsis (Lafos et al., 2011). Conversely, in the RAM, the expression of the auxin efflux carrier-encoding *PIN-FORMED* (*PIN*) genes is positively regulated by BRM establishing local auxin maxima and stimulating the expression of the RAM-specifying *PLETHORA* genes *PLT1* and *PLT2* (Yang et al., 2015). BRM also binds to GA-related genes to stimulate GA biosynthesis and signaling (Archacki et al., 2013).

Apart from biosynthesis and signaling, phytohormone-response genes are under direct control of chromatin modifiers. Initially described as involved in auxin homeostasis (Sorin et al., 2005), the ARGONAUTE protein AGO1, guided by small RNAs and associating with SWI/SNF complexes, was recently described to bind genes activated upon JA, auxin, and SA stimuli in

Arabidopsis (Liu C. et al., 2018). ABA-responsive genes in Arabidopsis are repressed by histone deacetylation (Perrella et al., 2013) through the action of MULTICOPY SUPRESSOR OF IRA (MSI) 1 recruiting the HISTONE DEACETYLASE (HDA)19 (Alexandre et al., 2009; Mehdi et al., 2016) and also by BRM-mediated chromatin remodeling (Han et al., 2012). Significantly, expression of 80% GA–responsive genes relies on the chromatin remodeler PICKLE (PKL) (Park et al., 2017). Consequently, plants with reduced MSI1, HDA19, or BRM levels are more sensitive to ABA, display ABA-dependent growth defects and higher tolerance to drought, and absence of PKL results in GA-reversible root swelling and embryonic lipid accumulation (Ogas et al., 1997) demonstrating the developmental importance of chromatin modifiers in phytohormone-mediated responses.

HORMONE SIGNALING AND CHROMATIN CROSSTALK CAN PARTICIPATE IN PLASTICITY AND ROBUSTNESS

Hormone signaling and chromatin crosstalk can participate in developmental paths by distinct ways: (1) control of cell identity genes in meristems, (2) chromatin-mediated stabilization of gene expression beyond the hormonal initial signal, (3) chromatin-governed integration of separate hormone signaling pathways.

Chromatin-modifying complexes target key phytohormone-regulated genes that specify meristem cell identity and whose ectopic expression can result in cell reprogramming and homeosis (Zuo et al., 2002; Galinha et al., 2007). For example, the SAM-organizing homeobox gene *WUSCHEL* (*WUS*) is regulated by cytokinin signaling, DNA methylation, H3K27me, or chromatin remodeling (Kwon, 2005; Dodsworth, 2009; Cao et al., 2015; Liu H. et al., 2018), and loss of DNA methylation in *WUS* promoter is connected to *in-vitro* shoot initiation induced by cytokinin (Li et al., 2011). Other stem cell niche-defining TFs such as *WOX4, WOX5*, *PLT1,* or *PLT2* are potential PRC2 targets (Oh et al., 2008; Lafos et al., 2011). Co-expression of these TFs can be triggered by environmental and hormone cues or ectopically induced in PRC2-depleted plants, resulting in cell reprogramming (Chanvivattana et al., 2004; Barrero et al., 2007; Ikeuchi et al., 2015; Mozgová et al., 2017). Increased or dispersed expression of cell identity-defining TFs and change and/or loss of cell identity also occurs in mutants of chromatin modifiers such as the repressive H2A-ubiquitinase complex PRC1 (Xu and Shen, 2008; Bratzel et al., 2010; Chen et al., 2010, 2016), histone deacetylases HDA6 and HAD19 (Tanaka et al., 2008; Pi et al., 2015), PKL (Ogas et al., 1999) or replication-dependent H3/H4 chaperone CHROMATIN ASSEMBLY COMPLEX (CAF)-1 (Kaya et al., 2001). Thus, chromatin structure appears to restrict expression of developmental genes to retain cell identities. Similarly, repression of ABA response by several chromatin modifiers (MSI1, HDA19, BRM) could act to prevent an ectopic stress response in favorable environmental conditions.

Chromatin structure may stabilize gene expression state beyond the duration of the environmental or phytohormone stimulus. An example is the cold-induced establishment of H3K27me3 at *FLC* during vernalization that is stable through mitosis, providing an in-cis memory system of *FLC* repression even after transfer to warmth (Berry et al., 2015; Hepworth and Dean, 2015). Persistent H3K4me2/3, H3/H4ac or local nucleosome depletion are found at genes primed for biotic or abiotic stress responses including priming by phytohormones or their analogs (Jaskiewicz et al., 2011; Lämke and Bäurle, 2017; Laura et al., 2018; Liu H. C. et al., 2018) demonstrating that also "accessible" chromatin structure contributes to mitotic memory (**Figure 1**).

Chromatin-modifying proteins may also serve as integrators defining the final outcome of interplay of various hormone signaling pathways. Phytohormone-induced change of chromatin structure may rely on multiple different chromatin modifiers as is exemplified by modulators of ABA signaling. A single chromatin modifier can also be implicated in responses to different hormones, as is exemplified by BRM (Sarnowska et al., 2016). Chromatin can thus provide a robust hub integrating different incoming cues while potentiating the persistence of the gene expression patterns through its stability during mitotic cell divisions.

MERISTEMS ARE CENTRAL PLACES FOR PHYTOHORMONE CHROMATIN CROSSTALK

The biological significance of the crosstalk in meristems is supported by (1) their central role in postembryonic morphogenesis, plasticity and memory, (2) their particularities for phytohomone signaling and chromatin remodeling, (3) first evidences reported for this crosstalk in SAM.

The meristems represent major sites of stem cell niches in plants (Scheres, 2007; Tucker and Laux, 2007; Aichinger et al., 2012). Apical meristems, together with the secondary meristem, the cambium, have the capacity to maintain and self-renew populations of undifferentiated cells, underlying continuous post-embryonic organ development modulated by environmental conditions (**Figure 1**; Gaillochet and Lohmann, 2015; Pavlovic and Radotic, 2017; Xiao et al., 2017). The SAM is also the place of epigenetic memory as reported for vernalization and some priming effects (Hepworth and Dean, 2015; Lämke and Bäurle, 2017).

Phytohormone and epigenetic pathways play overlapping/complementary roles in meristem functions and developmental plasticity or robustness, laying the basis for a biologically significant crosstalk. Importantly, meristems have been shown to be the place of epigenetic control for stem cell pluripotency, differentiation, and reprogramming (Cao et al., 2015; Gaillochet and Lohmann, 2015; Pi et al., 2015; Morao et al., 2016; Ojolo et al., 2018) whose epigenetic setup may differ from the surrounding tissues (Yadav et al., 2009; Baubec et al., 2014).

Major evidence for phytohormone-chromatin crosstalk was obtained using Arabidopsis mutants, or applying phytohormones or chemical inhibitors of chromatin modifiers in various developmental processes (Yamamuro et al., 2016; Campos-Rivero et al., 2017; Wong et al., 2017; Guo et al., 2018; Ojolo et al., 2018; Wakeel et al., 2018; Zheng et al., 2018).

Only a few reports highlight potential crosstalk directly in the meristems as exemplified by PRC2 repressing particular *PIN* genes (auxin transporters) in the SAM of Arabidopsis *clv3* mutants (Lafos et al., 2011). Recent studies in vernalized sugar beet (Hébrard et al., 2016) and in poplar under drought or cold exposure (Conde et al., 2017; Lafon-Placette et al., 2018; Le Gac et al., 2018) have recently shown that differentially expressed genes under DNA methylation control in SAM correspond to a limited developmental gene network mainly involved in growth and phytohormone pathways such as jasmonate activators and ethylene repressors. Indeed, Le Gac et al. (2018) show that hormone-related epigenome reprogramming in the SAM of poplar hybrids is stable for at least several months after the stress period in winter-dormant SAM providing evidence of an environmental epigenetic memory. Recently, this phenomenon was also described in the SAM of natural populations of black poplar under drought conditions (Sow et al., 2018a). Similarly, support for epigenetic memory of climatic conditions is found in Norway spruce trees grown from somatic embryos produced at different temperatures (Yakovlev et al., 2011, 2016). Considering the absence of post-embryonic organs, the SAM could play a major role in the transmission of the environmentally-established chromatin states during early development.

CONCLUSION AND FUTURE PERSPECTIVES

In conclusion, phytohormone action and chromatin modifiers seem to be tightly interacting but the extent to which they act jointly or independently remains unclear (Ojolo et al., 2018). However, the multi-layered control of local chromatin structure in response to hormonal cues may provide an important hub that integrates the incoming cues, conferring developmental robustness while retaining a sufficient potential for gene transcription change, stabilization and phenotypic plasticity (Lachowiec et al., 2016).

Current knowledge leads to the opinion that this crosstalk in meristems can integrate environmental cues for developmental outcome. Erasure of this signaling may allow continuous adjustment to new environmental conditions. Its maintenance through persistent chromatin states can however stimulate mitotic memory that could prime later organ formation. How the balance between erasure and memory is achieved remains enigmatic (**Figure 1**).

While the mechanistic events could be more easily deciphered in well-established model annuals such as Arabidopsis, it is important to establish perennial models where the impact of mitotic epigenetic memory is of importance in the context of climate change. In addition to SAM and RAM, cambium, whose activity is crucial for environmentally controlled wood formation, may be an appropriate and highly relevant model (Wang et al., 2016; Oles et al., 2017; **Figure 1**). Deciphering this crosstalk in the meristems requires improving single-cell methodologies to study the dynamics of chromatin structure in response to complex phytohormone-associated environmental and developmental responses and its memory. Exploiting epigenetic variation and the potential to derive primed plants from meristem regeneration or somatic embryos (Achour et al., 2017; Gallusci et al., 2017; Springer and Schmitz, 2017; Sow et al., 2018b) seems also promising.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

SM suggested and designed the opinion article. MDS and SM designed the **Figure 1**. IM and SM finalized and revised the article. All the authors checked and confirmed the final version of the manuscript. All the authors drafted the entire manuscript.

FUNDING

MDS and JG received Ph.D. grants from the Ministère de la Recherche et Enseignement Supérieur and INRA—Région Bretagne, respectively. This work was funded by the ANR France, within the project EPITREE (ANR-17-CE32-0009-01) to SM and by the Czech Science Foundation (GACR 16-08423Y) to IM.

ACKNOWLEDGMENTS

Authors thank Dr. Nicolas Bouché (INRA Versailles, France) for carefully reading the manuscript before submission. We apologize to all colleagues whose work was not cited due to length limitations.

REFERENCES

Achour, Z., Archipiano, M., Barneche, F., Baurens, C., Beckert, M., Ben, C., et al. (2017). "Epigenetics in plant breeding," in *Article de positionnement du Groupement d'intérêt scientifique Biotechnologies vertes et de l'Alliance nationale de recherche pour l'environnement*. Available online at: www.gisbiotechnologiesvertes.com/fr/publications/position-paper-epigenetics-in-plant-breeding (accessed February 13, 2017)

Aichinger, E., Kornet, N., Friedrich, T., and Laux, T. (2012). Plant stem cell niches. *Ann. Rev. Plant Biol.* 63, 615–636. doi: 10.1146/annurev-arplant-042811-105555

Alexandre, C., Möller-Steinbach, Y., Schönrock, N., Gruissem, W., and Hennig, L. (2009). Arabidopsis MSI1 is required for negative regulation of the response to drought stress. *Mol. Plant* 2, 675–687. doi: 10.1093/mp/ssp012

Archacki, R., Buszewicz, D., Sarnowski, T. J., Sarnowska, E., Rolicka, A. T., Tohge, T., et al. (2013). BRAHMA ATPase of the SWI/SNF chromatin remodeling complex acts as a positive regulator of gibberellin-mediated responses in Arabidopsis. *PLoS ONE* 8:e58588. doi: 10.1371/journal.pone.0058588

Barrero, J. M., Gonzalez-Bayon, R., del Pozo, J. C., Ponce, M. R., and Micol, J. L. (2007). INCURVATA2 encodes the catalytic subunit of DNA polymerase and interacts with genes involved in chromatin-mediated cellular memory in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19, 2822–2838. doi: 10.1105/tpc.107.054130

Baubec, T., Finke, A., Mittelsten Scheid, O., and Pecinka, A. (2014). Meristem-specific expression of epigenetic regulators safeguards transposon silencing in Arabidopsis. *EMBO Rep.* 15, 446–452. doi: 10.1002/embr.201337915

Berry, S., Hartley, M., Olsson, T. S. G., Dean, C., and Howard, M. (2015). Local chromatin environment of a Polycomb target gene instructs its own epigenetic inheritance. *ELife* 4:e07205. doi: 10.7554/eLife.07205

Bratzel, F., López-Torrejón, G., Koch, M., Del Pozo, J. C., and Calonje, M. (2010). Keeping cell identity in Arabidopsis requires PRC1 RING-finger homologs that catalyze H2A monoubiquitination. *Curr. Biol.* 20, 1853–1859. doi: 10.1016/j.cub.2010.09.046

Campos-Rivero, G., Osorio-Montalvo, P., Sánchez-Borges, R., Us-Camas, R., Duarte-Aké, F., and De-la-Pe-a, C. (2017). Plant hormone signaling in flowering: an epigenetic point of view. *J. Plant Physiol.* 214, 16–27. doi: 10.1016/j.jplph.2017.03.018

Cao, X., He, Z., Guo, L., and Liu, X. (2015). Epigenetic mechanisms are critical for the regulation of WUSCHEL expression in floral meristems: figure 1. *Plant Physiol.* 168, 1189–1196. doi: 10.1104/pp.15.00230

Chanvivattana, Y., Bishopp, A., Schubert, D., Stock, C., Moon, Y.-H., Sung, Z. R., et al. (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in Arabidopsis. *Development* 131, 5263–5276. doi: 10.1242/dev.01400

Chen, D., Molitor, A., Liu, C., and Shen, W.-H. (2010). The Arabidopsis PRC1-like ring-finger proteins are necessary for repression of embryonic traits during vegetative growth. *Cell Res.* 20, 1332–1344. doi: 10.1038/cr.2010.151

Chen, D., Molitor, A. M., Xu, L., and Shen, W.-H. (2016). Arabidopsis PRC1 core component AtRING1 regulates stem cell-determining carpel development mainly through repression of class I KNOX genes. *BMC Biol.* 14:112. doi: 10.1186/s12915-016-0336-4

Conde, D., Le Gac, A.-L., Perales, M., Dervinis, C., Kirst, M., Maury, S., et al. (2017). Chilling-responsive DEMETER-LIKE DNA demethylase mediates in poplar bud break: Role of active DNA demethylase in trees' bud break. *Plant Cell Environ.* 40, 2236–2249. doi: 10.1111/pce.13019

Dodsworth, S. (2009). A diverse and intricate signalling network regulates stem cell fate in the shoot apical meristem. *Dev. Biol.* 336, 1–9. doi: 10.1016/j.ydbio.2009.09.031

Figueiredo, D. D., Batista, R. A., Roszak, P. J., Hennig, L., and Köhler, C. (2016). Auxin production in the endosperm drives seed coat development in Arabidopsis. *ELife* 5:e20542. doi: 10.7554/eLife.20542

Figueiredo, D. D., Batista, R. A., Roszak, P. J., and Köhler, C. (2015). Auxin production couples endosperm development to fertilization. *Nat. Plants* 1:15184. doi: 10.1038/nplants.2015.184

Figueiredo, D. D., and Köhler, C. (2018). Auxin: a molecular trigger of seed development. *Genes Dev.* 32, 479–490. doi: 10.1101/gad.312546.118

Gaillochet, C., and Lohmann, J. U. (2015). The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. *Development* 142, 2237–2249. doi: 10.1242/dev.117614

Galinha, C., Hofhuis, H., Luijten, M., Willemsen, V., Blilou, I., Heidstra, R., et al. (2007). PLETHORA proteins as dose-dependent master regulators of Arabidopsis root development. *Nature* 449, 1053–1057. doi: 10.1038/nature06206

Gallusci, P., Dai, Z., Génard, M., Gauffretau, A., Leblanc-Fournier, N., Richard-Molard, C., et al. (2017). Epigenetics for plant improvement: current knowledge and modeling avenues. *Trends Plant Sci.* 22, 610–623. doi: 10.1016/j.tplants.2017.04.009

Guo, J.-E., Hu, Z., Yu, X., Li, A., Li, F., Wang, Y., et al. (2018). A histone deacetylase gene, SlHDA3, acts as a negative regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation. *Plant Cell Rep.* 37, 125–135. doi: 10.1007/s00299-017-2211-3

Han, S.-K., Sang, Y., Rodrigues, A., BIOL425 F2010, Wu, M.-F., Rodriguez, P. L., et al. (2012). The SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPase BRAHMA represses abscisic acid responses in the absence of the stress stimulus in Arabidopsis. *Plant Cell.* 24, 4892–4906. doi: 10.1105/tpc.112.105114

Hébrard, C., Peterson, D. G., Willems, G., Delaunay, A., Jesson, B., Lefèbvre, M., et al. (2016). Epigenomics and bolting tolerance in sugar beet genotypes. *J. Exp. Botany* 67, 207–225. doi: 10.1093/jxb/erv449

Hepworth, J., and Dean, C. (2015). Flowering Locus C's lessons: conserved chromatin switches underpinning developmental timing and adaptation. *Plant Physiol.* 168, 1237–1245. doi: 10.1104/pp.15.00496

Ikeuchi, M., Iwase, A., Rymen, B., Harashima, H., Shibata, M., Ohnuma, M., et al. (2015). PRC2 represses dedifferentiation of mature somatic cells in Arabidopsis. *Nat. Plants* 1:15089. doi: 10.1038/nplants.2015.89

Jaskiewicz, M., Conrath, U., and Peterhänsel, C. (2011). Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep.* 12, 50–55. doi: 10.1038/embor.2010.186

Kaya, H., Shibahara, K., Taoka, K., Iwabuchi, M., Stillman, B., and Araki, T. (2001). FASCIATA genes for chromatin assembly factor-1 in Arabidopsis maintain the cellular organization of apical meristems. *Cell* 104, 131–142. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00197-0

Kwon, C. S. (2005). WUSCHEL is a primary target for transcriptional regulation by SPLAYED in dynamic control of stem cell fate in Arabidopsis. *Genes Dev.* 19, 992–1003. doi: 10.1101/gad.1276305

Lachowiec, J., Queitsch, C., and Kliebenstein, D. J. (2016). Molecular mechanisms governing differential robustness of development and environmental responses in plants. *Ann. Botany* 117, 795–809. doi: 10.1093/aob/mcv151

Lafon-Placette, C., Le Gac, A.-L., Chauveau, D., Segura, V., Delaunay, A., Lesage-Descauses, M.-C., et al. (2018). Changes in the epigenome and transcriptome of the poplar shoot apical meristem in response to water availability affect preferentially hormone pathways. *J. Exp. Botany* 69, 537–551. doi: 10.1093/jxb/erx409

Lafos, M., Kroll, P., Hohenstatt, M. L., Thorpe, F. L., Clarenz, O., and Schubert, D. (2011). Dynamic regulation of H3K27 trimethylation during Arabidopsis differentiation. *PLoS Genet.* 7:e1002040. doi: 10.1371/journal.pgen.1002040

Lämke, J., and Bäurle, I. (2017). Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biol.* 18:124. doi: 10.1186/s13059-017-1263-6

Latzel, V., Zhang, Y., Karlsson Moritz, K., Fischer, M., and Bossdorf, O. (2012). Epigenetic variation in plant responses to defence hormones. *Ann. Botany* 110, 1423–1428. doi: 10.1093/aob/mcs088

Laura, B., Silvia, P., Francesca, F., Benedetta, S., and Carla, C. (2018). Epigenetic control of defense genes following MeJA-induced priming in rice (*O. sativa*). *J. Plant Physiol.* 228, 166–177. doi: 10.1016/j.jplph.2018.06.007

Le Gac, A.-L., Lafon-Placette, C., Chauveau, D., Segura, V., Delaunay, A., Fichot, R., et al. (2018). Winter-dormant shoot apical meristem in poplar trees shows environmental epigenetic memory. *J. Exp. Botany* 69, 4821–4837. doi: 10.1093/jxb/ery271

Li, Q.-F., Lu, J., Yu, J.-W., Zhang, C.-Q., He, J.-X., and Liu, Q.-Q. (2018). The brassinosteroid-regulated transcription factors BZR1/BES1 function as a coordinator in multisignal-regulated plant growth. *Biochim. Biophys. Acta Gene Regul. Mech.* 1861, 561–571. doi: 10.1016/j.bbagrm.2018.04.003

Li, W., Liu, H., Cheng, Z. J., Su, Y. H., Han, H. N., Zhang, Y., et al. (2011). DNA methylation and histone modifications regulate de novo shoot regeneration in Arabidopsis by modulating WUSCHEL expression and auxin signaling. *PLoS Genet.* 7:e1002243. doi: 10.1371/journal.pgen.1002243

Liu, C., Xin, Y., Xu, L., Cai, Z., Xue, Y., Liu, Y., et al. (2018). Arabidopsis ARGONAUTE 1 binds chromatin to promote gene transcription in response to hormones and stresses. *Dev. Cell* 44, 348–361.e7. doi: 10.1016/j.devcel.2017.12.002

Liu, H., Zhang, H., Dong, Y. X., Hao, Y. J., and Zhang, X. S. (2018). DNA METHYLTRANSFERASE1 -mediated shoot regeneration is regulated by cytokinin-induced cell cycle in Arabidopsis. *N. Phytol.* 217, 219–232. doi: 10.1111/nph.14814

Liu, H. C., Lämke, J., Lin, S., Hung, M.-J., Liu, K.-M., Charng, Y., and Bäurle, I. (2018). Distinct heat shock factors and chromatin modifications mediate the organ-autonomous transcriptional memory of heat stress. *Plant J.* 95, 401–413. doi: 10.1111/tpj.13958

Liu, X., Wei, X., Sheng, Z., Jiao, G., Tang, S., Luo, J., et al. (2016). Polycomb protein OsFIE2 affects plant height and grain yield in rice. *PLoS ONE* 11:e0164748. doi: 10.1371/journal.pone.0164748

Mehdi, S., Derkacheva, M., Ramström, M., Kralemann, L., Bergquist, J., and Hennig, L. (2016). The WD40 domain protein MSI1 functions in a HDAC complex to fine-tune ABA signaling. *Plant Cell* 28, 42–54. doi: 10.1105/tpc.15.00763

Morao, A. K., Bouyer, D., and Roudier, F. (2016). Emerging concepts in chromatin-level regulation of plant cell differentiation: timing, counting, sensing and maintaining. *Curr. Opin. Plant Biol.* 34, 27–34. doi: 10.1016/j.pbi.2016.07.010

Mozgová, I., Mu-oz-Viana, R., and Hennig, L. (2017). PRC2 represses hormone-induced somatic embryogenesis in vegetative tissue of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet.* 13:e1006562. doi: 10.1371/journal.pgen.1006562

Ogas, J., Cheng, J.-C., Sung, Z.R., and Somerville, C. (1997). Cellular differentiation regulated by gibberellin in the *Arabidopsis thaliana* pickle mutant. *Sciences* 277, 91–94. doi: 10.1126/science.277.5322.91

Ogas, J., Kaufmann, S., Henderson, J., and Somerville, C. (1999). PICKLE is a CHD3 chromatin-remodeling factor that regulates the transition from embryonic to vegetative development in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 13839–13844. doi: 10.1073/pnas.96.24.13839

Oh, S., Park, S., and van Nocker, S. (2008). Genic and global functions for Paf1C in chromatin modification and gene expression in Arabidopsis. *PLoS Genet.* 4:e1000077. doi: 10.1371/journal.pgen.1000077

Ojolo, S. P., Cao, S., Priyadarshani, S. V. G. N., Li, W., Yan, M., Aslam, M., et al. (2018). Regulation of plant growth and development: a review from a chromatin remodeling perspective. *Front. Plant Sci.* 9:1232. doi: 10.3389/fpls.2018.01232

Oles, V., Panchenko, A., and Smertenko, A. (2017). Modeling hormonal control of cambium proliferation. *PLoS ONE* 12:e0171927. doi: 10.1371/journal.pone.0171927

Park, J., Oh, D.-H., Dassanayake, M., Nguyen, K. T., Ogas, J., Choi, G., et al. (2017). Gibberellin signaling requires chromatin remodeler PICKLE to Promote vegetative growth and phase transitions. *Plant Physiol.* 173, 1463–1474. doi: 10.1104/pp.16.01471

Pavlovic, M., and Radotic, K. (2017). *Animal and Plant Stem Cells*, *Vol*. 234. Cham: Springer International Publishing XVII.

Peirats-Llobet, M., Han, S.-K., Gonzalez-Guzman, M., Jeong, C. W., Rodriguez, L., Belda-Palazon, B., et al. (2016). A direct link between abscisic acid sensing and the chromatin-remodeling ATPase BRAHMA via core ABA signaling pathway components. *Mol. Plant* 9, 136–147. doi: 10.1016/j.molp.2015.10.003

Perrella, G., Lopez-Vernaza, M. A., Carr, C., Sani, E., Gossele, V., Verduyn, C., et al. (2013). Histone deacetylase complex1 expression level titrates plant growth and abscisic acid sensitivity in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 3491–3505. doi: 10.1105/tpc.113.114835

Pi, L., Aichinger, E., van der Graaff, E., Llavata-Peris, C. I., Weijers, D., Hennig, L., et al. (2015). Organizer-derived WOX5 signal maintains root columella stem cells through chromatin-mediated repression of CDF4 expression. *Dev. Cell* 33, 576–588. doi: 10.1016/j.devcel.2015.04.024

Sarnowska, E., Gratkowska, D. M., Sacharowski, S. P., Cwiek, P., Tohge, T., Fernie, A. R., et al. (2016). The role of SWI/SNF chromatin remodeling complexes in hormone crosstalk. *Trends Plant Sci.* 21, 594–608. doi: 10.1016/j.tplants.2016.01.017

Scheres, B. (2007). Stem-cell niches: nursery rhymes across kingdoms. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 345–354. doi: 10.1038/nrm2164

Sorin, C., Bussell, J. D., Camus, I., Ljung, K., Kowalczyk, M., Geiss, G., et al. (2005). Auxin and light control of adventitious rooting in Arabidopsis require ARGONAUTE1. *Plant Cell* 17, 1343–1359. doi: 10.1105/tpc.105.031625

Sow, M. D., Allona, I., Ambroise, C., Conde, D., Fichot, R., Gribkova, S., et al. (2018b). "Epigenetics in forest trees," in *Advances in Botanical Research*. *Plant Epigenetics Coming of Age for Breeding Applications, Vol.* 88. éds P. Gallusci, E. Bucher, and M. Mirouze, 387–453. Academic Press, Elsevier. doi: 10.1016/bs.abr.2018.09.003

Sow, M. D., Segura, V., Chamaillard, S., Jorge, V., Delaunay, A., Lafon-Placette, C., et al. (2018a). Narrow-sense heritability and PST estimates of DNA methylation in three *Populus nigra* L. populations under contrasting water availability. *Tree Genet. Genomes* 14:78. doi: 10.1007/s11295-018-1293-6

Springer, N. M., and Schmitz, R. J. (2017). Exploiting induced and natural epigenetic variation for crop improvement. *Nat. Rev. Genet.* 18, 563–575. doi: 10.1038/nrg.2017.45

Tanaka, M., Kikuchi, A., and Kamada, H. (2008). The Arabidopsis Histone Deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant Physiol.* 146, 149–161. doi: 10.1104/pp.107.111674

Tucker, M. R., and Laux, T. (2007). Connecting the paths in plant stem cell regulation. *Trends Cell Biol.* 17, 403–410. doi: 10.1016/j.tcb.2007.06.002

Wakeel, A., Ali, I., Khan, A. R., Wu, M., Upreti, S., Liu, D., et al. (2018). Involvement of histone acetylation and deacetylation in regulating auxin responses and associated phenotypic changes in plants. *Plant Cell Rep.* 37, 51–59. doi: 10.1007/s00299-017-2205-1

Wang, Q., Ci, D., Li, T., Li, P., Song, Y., Chen, J., et al. (2016). The role of DNA methylation in xylogenesis in different tissues of poplar. *Front. Plant Sci.* 7:1003. doi: 10.3389/fpls.2016.01003

Wong, M. M., Chong, G. L., and Verslues, P. E. (2017). "Epigenetics and RNA processing: connections to drought, salt, and ABA?," in *Plant Stress Tolerance: Methods and Protocols*, ed R. Sunkar (New York, NY: Springer New York), 3–21.

Xiao, J., Jin, R., and Wagner, D. (2017). Developmental transitions: integrating environmental cues with hormonal signaling in the chromatin landscape in plants. *Genome Biol.* 18:88. doi: 10.1186/s13059-017-1228-9

Xu, L., and Shen, W.-H. (2008). Polycomb silencing of KNOX genes confines shoot stem cell niches in Arabidopsis. *Curr. Biol.* 18, 1966–1971. doi: 10.1016/j.cub.2008.11.019

Yadav, R. K., Girke, T., Pasala, S., Xie, M., and Reddy, G. V. (2009). Gene expression map of the Arabidopsis shoot apical meristem stem cell niche. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 4941–4946. doi: 10.1073/pnas.0900843106

Yakovlev, I. A., Asante, D. K. A., Fossdal, C. G., Junttila, O., and Johnsen, Ø. (2011). Differential gene expression related to an epigenetic memory affecting climatic adaptation in Norway spruce. *Plant Sci.* 180, 132–139. doi: 10.1016/j.plantsci.2010.07.004

Yakovlev, I. A., Carneros, E., Lee, Y., Olsen, J. E., and Fossdal, C. G. (2016). Transcriptional profiling of epigenetic regulators in somatic embryos during temperature induced formation of an epigenetic memory in Norway spruce. *Planta* 243, 1237–1249. doi: 10.1007/s00425-016-2484-8

Yamamuro, C., Zhu, J.-K., and Yang, Z. (2016). Epigenetic modifications and plant hormone action. *Mol. Plant* 9, 57–70. doi: 10.1016/j.molp.2015.10.008

Yang, S., Li, C., Zhao, L., Gao, S., Lu, J., Zhao, M., et al. (2015). The Arabidopsis SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPase BRAHMA targets directly to PINs and is required for root stem cell niche maintenance. *Plant Cell* 27, 1670–1680. doi: 10.1105/tpc.15.00091

Yu, X., Li, L., Li, L., Guo, M., Chory, J., and Yin, Y. (2008). Modulation of brassinosteroid-regulated gene expression by jumonji domain-containing proteins ELF6 and REF6 in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 7618–7623. doi: 10.1073/pnas.0802254105

Zheng, X., Hou, H., Zhang, H., Yue, M., Hu, Y., and Li, L. (2018). Histone acetylation is involved in GA-mediated 45S rDNA decondensation in maize aleurone layers. *Plant Cell Rep.* 37, 115–123. doi: 10.1007/s00299-017-2207-z

Zuo, J., Niu, Q.-W., Frugis, G., and Chua, N.-H. (2002). The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in Arabidopsis. *Plant J.* 30, 349–359. doi: 10.1046/j.1365-313X.2002.01289.x

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

Copyright © 2019 Maury, Sow, Le Gac, Genitoni, Lafon-Placette and Mozgova. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

IV. Discussion, limites et perspectives : vers la mise en place d'une stratégie épigénomique sur le modèle jussie

Ce chapitre avait pour objectifs :

(1) de faire le bilan des études épigénétiques portant sur les modèles invasifs et souligner l'intérêt de l'étude de *Ludwigia grandiflora* dans ce contexte. Cet objectif a été réalisé par le biais de la publication de revue Marin/Genitoni *et al.* (2019).

(2) de proposer une première approche expérimentale basée sur l'utilisation d'une drogue hypométhylante pour tester l'implication de la méthylation dans le changement de milieu chez la jussie. Un résultat fort de ce travail concerne l'analyse intégrative qui montre que le morphotype aquatique hypométhylé tendrait vers le morphotype terrestre témoin (Genitoni *et al*., resoumission).

Plusieurs questions ou limites de ces travaux se posent. Certaines ont déjà été abordées pour partie du moins dans les différents articles présentés dans ce chapitre. J'ai ainsi sélectionné 3 questions majeures qui sont discutées ci-après.

1. L'utilisation d'un agent pharmacologique permet-elle d'explorer le rôle de la méthylation de l'ADN dans l'adaptation de la jussie au milieu terrestre ?

L'utilisation d'une drogue, la zébularine ou la 5-azacytidine, pour perturber la méthylation de l'ADN a déjà été réalisée dans de nombreuses études (Baubec *et al.*, 2009 ; Bossdorf *et al.*, 2010 ; Richards *et al.*, 2010 ; Hudson *et al.*, 2011 ; Zhong *et al.*, 2013 ; Puy *et al.*, 2018 ; Herrera *et al.*, 2019). Cette méthode a fait ses preuves et permet de perturber la méthylation de l'ADN sur les tissus nouvellement formés et

d'évaluer les impacts phénotypiques de ce traitement. C'est une méthode peu coûteuse qui permet d'explorer une hypothèse épigénétique chez des espèces non-modèles (Alonso *et al.*, 2019). En outre, Puy *et al.* (2018) ont démontré l'efficacité de l'utilisation de la 5-azacytidine pour effacer des effets transgénérationels. En revanche, le temps de vie de ces molécules et leur caractère dangereux pour l'Homme obligent à prendre des précautions (Baubec *et al.*, 2009 ; Puy *et al.*, 2018).

Ludwigia grandiflora est une espèce aquatique polyploïde invasive qui colonise aujourd'hui le milieu terrestre. Son caractère non-modèle nous a conduits à adopter une démarche pharmacologique en utilisant la zébularine pour explorer l'hypothèse épigénétique comme source de flexibilité. Cela nous a permis d'observer les impacts phénotypiques (versus physiologiques) de l'hypométhylation sur les deux morphotypes en réponse au changement de milieu.

Nous sommes ici sur une approche corrélative et nos résultats ne peuvent être extrapolés. Car ils ne concernent que le pourcentage de méthylation dans les tiges et qu'une seule population de *L. grandiflora* a été étudiée. Il serait intéressant de confirmer ce résultat sur le pourcentage de méthylation dans les racines et d'étendre l'étude à d'autres populations de *L. grandiflora* présentant également un morphotype terrestre et un morphotype aquatique. En outre, l'absence de différence de pourcentage de méthylation de l'ADN entre morphotype et condition suggère que si les différences phénotypiques observées sont liées à la méthylation, elles sont dues à des régions différentiellement méthylées entre morphotypes. Pour conclure, l'approche pharmacologique est peu couteuse et efficace, car elle nous a permis d'explorer la piste d'une hypothèse épigénétique sur la jussie qui est une espèce non modèle. L'exploration du rôle de la méthylation par l'utilisation d'un agent chimique est une porte d'entrée pour l'étude de ces phénomènes et n'exclut pas l'utilisation de méthode à l'échelle (épi)génomique. C'est pourquoi nous avons cherché à aller plus loin en mettant au point une stratégie épigénomique.

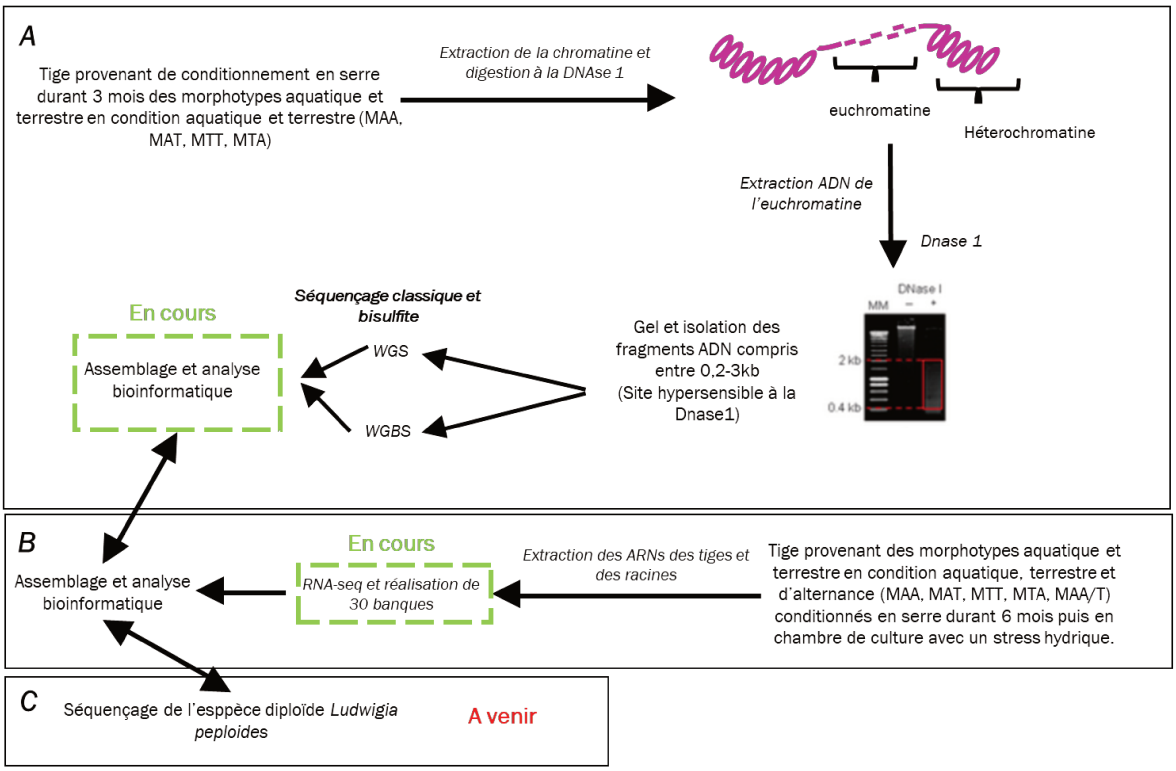


Figure II-9 : Schéma de la démarche technique des analyses « omics » de la jussie.

A. Description de l'approche épigénomique chez *Ludwigia grandiflora*, avec d'abord une extraction de la chromatine et d'une digestion à la DNase 1 suivie d'une isolation sur gel des fragments entre 0.2 et 3kb à l'aide d'un kit QIAEX. Deux types de séquençages sont réalisés, un classique (WGS) et l'autre bisulfite (WGBS) mettant en évidence les cytosines méthylées. B. Description de l'approche transcriptomique à travers l'extraction d'ARN et la réalisation un RNA-seq. C. Projet de séquençage de génome de l'espèce diploïde *Ludwigia peploides*.

2. Quelle est la stratégie épigénomique la mieux adaptée sur la jussie pour aller plus loin?

La complexité du génome de *L. grandiflora* (espèce décaploide, 2n=80) et le manque de ressources génomiques nous contraint, pour aller plus loin, à utiliser une approche épigénomique dédiée. Pour cela, nous avons fait le choix de la stratégie développée par Lafon Placette *et al.* (2013) et maitrisée au LBLGC de l'Université d'Orléans (S. Maury, co-encadrant de ma thèse). Cette stratégie consiste à isoler la fraction euchromatine sensible à la DNAse I, enzyme qui coupe l'ADN internucléosomique. Cette fraction euchromatine est intéressante, car potentiellement riche en séquences géniques, ces séquences représentent moins de 5% du génome. Cette stratégie conduit à une très forte réduction de complexité des génomes ce qui permet par la suite d'appliquer une analyse (épi)génomique classique de type Whole Genome (Bisulfite) Sequencing (WGS et WGBS) (Ziller *et al.*, 2015 ; van Gurp *et al.*, 2016 ; Suzuki *et al.*, 2018). Chez le peuplier, cette approche a permis d'isoler la fraction eurochomatine méthylée. Cette fraction ne représente que 1.9% du génome, mais contient des séquences appartenant à 74% des modèles de gènes de cette espèce (Lafon-Placette *et al.*, 2013). Cette forte réduction a permis d'étudier les caractéristiques de la méthylation de ces gènes euchromatiniens.

Notre objectif est d'appliquer cette stratégie sur les deux morphotypes dans les deux milieux (Figure II.9). On a ainsi prélevé les cinq premiers centimètres à partir de l'apex de six plantes élevées en serre et que l'on a regroupées dans un tube pour chacune des combinaisons morphotype x condition (Am-a, Am-t, Tm-a, Tm-t). Cela cinq fois pour produire des répétitions biologiques.

Ce matériel a subi le protocole détaillé en Figure II.9 et explicité ci-dessous. Pour cela, la chromatine de *L. grandiflora* a été extraite à partir de tiges feuillées selon les 3 méthodes décrites par Lafon-Placette et al (2013), Vimont et al (2018) et le kit (Plant Chromatin Extraction Kit (ab156906). La chromatine ainsi extraite a été digérée de façon ménagée par la DNAse I comme décrite par Lafon-Placette et al (2013) et Vimont et al (2018). L'ADN génomique a été ensuite extrait selon un protocole classique CTAB (Lafon-Placette *et al.*, 2013), dosé au Nanodrop et analysé par électrophorèse sur gel d'agarose.

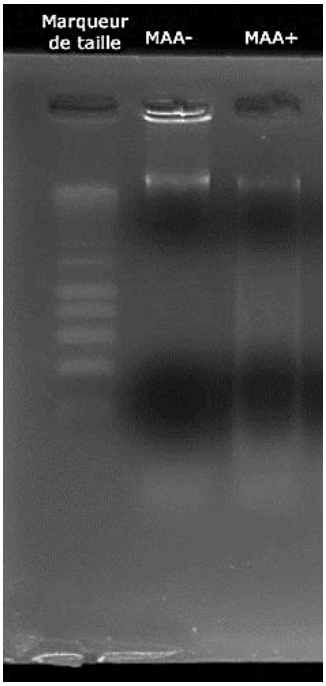


Figure II-10 : Gel d'agarose d'ADN obtenus avec et sans traitement à la DNase suite au protocole d'extraction de chromatine de Lafon Placette *et al.*, (2013) chez le morphotype aquatique en condition aquatique et terrestre (MAA et MAT).

« - » correspond à un traitement sans DNase, « + » correspond à un traitement avec DNase.

Tableau II-3. Quantification et qualification de l'ADN extrait à partir d'euchromatine chez le morphotype aquatique en condition aquatique et terrestre (MAA et MAT) avec et sans DNase.

« - » correspond à un traitement sans DNase, « + » correspond à un traitement avec DNase.

	Concentration d'ADN (ng/µL)	**260/A280**
MAA -	218,6	1,55
MAA +	222	1,59
MAT -	295,7	1,64
MAT +	168,7	1,51
MAA -	42,5	1,44
MAA +	7,4	0,88
MAT -	15,7	1,72
MAT +	3,1	0,84

L'extraction de la chromatine et sa digestion par la DNAse I ont fait l'objet de nombreux tests avec les protocoles différents et sur différents matériels biologiques (morphotypes, tiges feuillées ou racines). Ce travail que j'ai réalisé au LBLGC lors de ma seconde année de thèse (en 2018) a été poursuivi par Elise Delrue (stage de BTS 2e année, avril-juin 2019), Alain Delaunay (technicien, équipe ARCHE) et Mamadou Dia Sow (Doctorant, équipe ARCHE) sous l'encadrement de Stéphane Maury. La jussie est une plante pour laquelle l'extraction du matériel génomique s'est révélée très difficile. En effet, la résistance des parois cellulaires et certains composés (tanins, phénols, protéines) ont rendu la mise au point des protocoles d'extraction difficile. Après plus d'un an d'essais, avec l'aide de Danièle Vassaux, la chromatine a pu être extraite avec succès chez les morphotypes aquatique et terrestre élevés dans leur condition d'origine, mais aussi en condition croisée (Figure II.10 ; Tableau 3) avec le protocole utilisé par Lafon Placette *et al.* (2013). Ce dernier a donné de meilleurs rendements et qualité de la chromatine en termes de dégradation et digestibilité par la DNAse I. L'étape suivante a consisté à récupérer sur un gel d'agarose la fraction de l'ADN digéré comprise entre 200 et 3000 pb (kit QIAEX II, QIAGEN France) et de doser au Nanodrop pour vérifier les quantités obtenues afin de réaliser des banques et un séquençage de manière classique (WGS) et en bisulfite (WGBS) (Figure II.11). Ce travail a été réalisé en collaboration avec le Dr Jörg Tost (Laboratoire Épigénétique et Environnement, LEE, CNRGH CEA, Evry, FRANCE). En parallèle, les tailles des génomes de *L. grandiflora* et de *L. peploides* ont été estimées par cytométrie en flux pour déterminer la profondeur de séquençage nécessaire. Ainsi, les génomes de *L. grandiflora* et *L. péploides* présentent des tailles estimées de 800 Mb et 200 Mb respectivement (D. Barloy, résultats non publiés), ce qui a permis de fixer la profondeur de séquençage >50x. Chaque échantillon de jussie a ainsi été séquencé à trois reprises une première fois en WGBS (séquençage bisulfite kit NuGEN), une seconde fois en WGS en utilisant le même kit sans conversion bisulfite et une dernière fois avec un kit DNA-Nano-Illumina pour un séquençage WGS classique. Les séquences ont été obtenues fin juin 2019. Les analyses bio-informatiques sont prévues début 2020 avec l'arrivée dans l'équipe EPIX d'un post doctorant en bio-informatique. Un assemblage sera généré à partir des séquences obtenues par séquençage classique. Cet assemblage servira alors de base de comparaison pour les séquences générées par séquençage bisulfite et permettra de déterminer le méthylome de ces séquences pour les 4 échantillons biologiques.

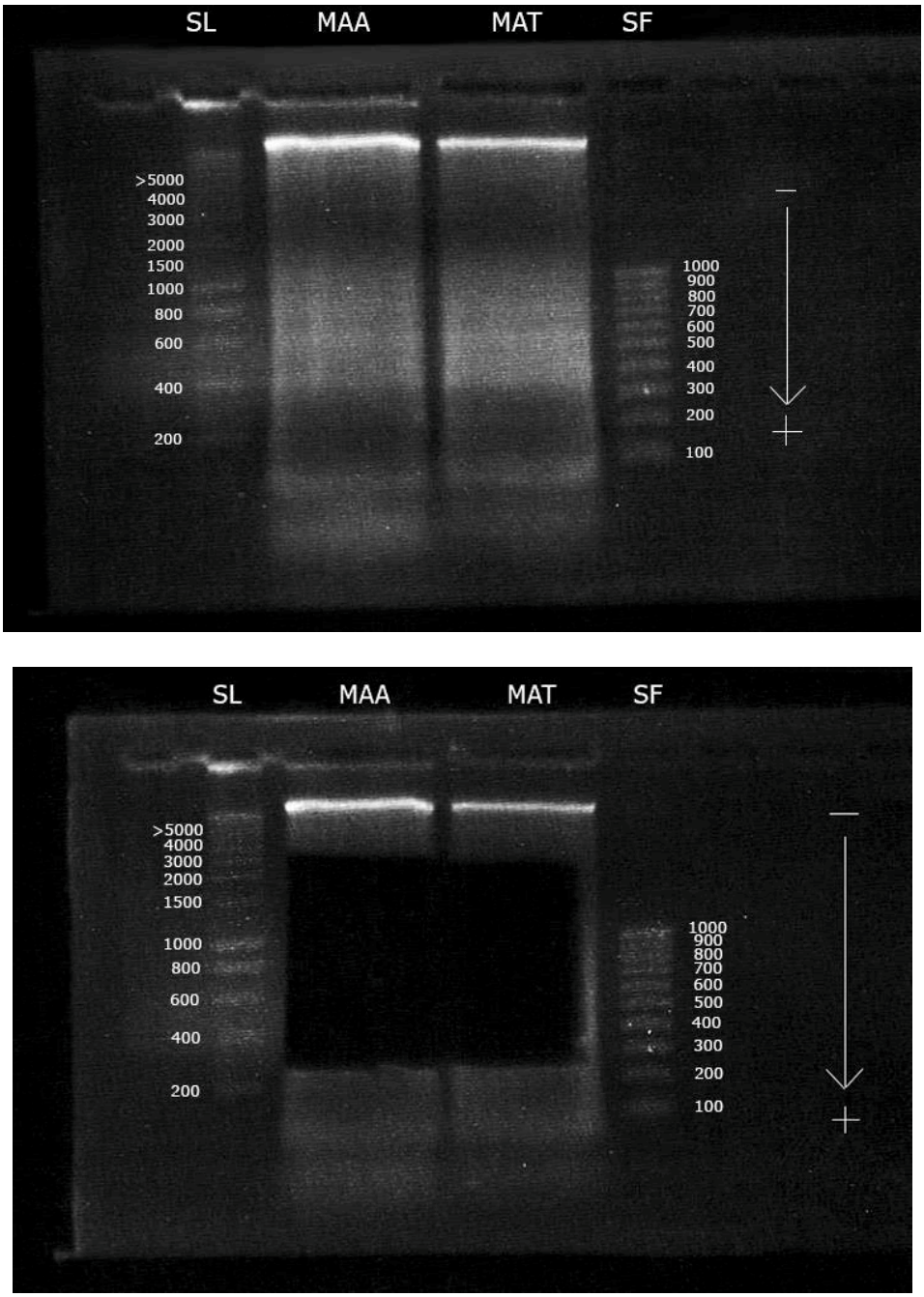


Figure II-11 : Gel avant et après découpe pour l'extraction et purification d'ADN du morphotype aquatique en condition aquatique et terrestre (MAA et MAT).

Le kit QIAEX a été utilisé. Le gel est découpé entre 200 et 3000 pb. Les deux marqueurs de taille SF et SL sont utilisés afin de couper plus précisément le gel. L'ADN récupéré est ensuite dosé au nanodrop et envoyé à séquencer.

Nous faisons l'hypothèse d'une différence dans la méthylation de l'ADN sur certaines régions entre les deux morphotypes, mais également en réponse aux changements de milieu. Une étude bio-informatique permettra de connaitre les familles de gènes différentiellement méthylées, dans par exemple la voie des phytohormones ou de réponses aux stress.

Une exploitation optimale des données de séquençage du méthylome nécessiterait l'obtention d'un génome de référence. L'existence en France d'une espèce diploïde, nous a conduits à envisager le séquençage du génome de *L. peploides* (2n=2x=16). Nous avons également initié chez *L. grandiflora,* la réalisation d'un transcriptome de référence. Ce transcriptome de référence sera obtenu à partir des transcrits issus du cycle 6 de nos expériences d'alternance (voir discussion). Ce transcriptome permettra d'explorer les liens entre transcrits et les profils de méthylation selon le morphotype et la condition. Une des difficultés pour l'élaboration d'un transcriptome de référence, et plus généralement pour l'analyse bio-informatique chez une espèce polyploïde, est le nombre élevé de variants d'un même gène. Ce nombre de copies plus ou moins proche complique l'assemblage (De Carvalho *et al.*, 2013). L'obtention conjointe de ces données « omiques » est indispensable pour la poursuite des études épigénétiques chez la jussie.

L'implication de la méthylation dans l'adaptation rapide des organismes dépend également de sa capacité à être transmise à la descendance. Ici, la jussie se multiplie essentiellement par voie végétative, mais certaines populations sont capables de reproduction sexuée. Ainsi, des expériences sont menées dans l'équipe et visent à comparer le phénotype de plantes issues de germination ou de boutures de différentes populations de jussie en réponse aux changements de milieux (Thèse L. Portillo). Il serait donc intéressant de s'attarder sur les différences épigénétiques et le caractère transmissible des modifications épigénétiques en réponse aux changements de milieux chez la jussie.

D'autres mécanismes épigénétiques interviennent dans le développement et la réponse des organismes aux conditions environnementales. On peut citer, les variants histones ou leurs modifications post-traductionnelles, les ARNs non codants, ou encore la dynamique des éléments transposables. Le contrôle des éléments transposables est assuré, entre autre chose, par des marques épigénétiques comme la méthylation de l'ADN (Galindo-González *et al.*, 2018). Les éléments transposables sont particulièrement intéressants dans le cas de la jussie, car ils sont impliqués dans de nombreux processus

liés à la polyploïdie, la spéciation (Parisod *et al.*, 2009; Serrato-Capuchina and Matute, 2018), et en réponse à l'environnement (Schrader *et al.* 2014 ; Stapley *et al.* 2015 ; Specchia and Pinna 2017 ; Marin *et al.*, 2019). Ainsi ces auteurs font l'hypothèse d'un rôle des éléments transposables dans l'adaptation rapide des espèces invasives, des résultats chez la drosophile et les fourmis vont dans ce sens (Schrader *et al.*, 2014). Ainsi l'obtention d'un génome de référence, d'un transcriptome de référence et d'épigénomes ouvrira la porte à l'exploration d'hypothèses vis-à-vis des mécanismes d'adaptation rapide de la jussie au milieu terrestre.

Pour conclure, compte tenu des ressources génomiques à notre disposition pour l'étude de *L. grandiflora*, nous avons fait le choix d'une approche épigénomique centrée sur la méthylation de l'ADN. Cette stratégie repose sur les travaux de Lafon Placette *et al.*, 2013 et a visé à faire le séquençage de manière classique ou bisulfite d'une portion réduite du génome, des morphotypes aquatique et terrestre de *Ludwigia grandiflora.*

Chapitre III :

Discussion générale, conclusion générale, et perspectives

Les travaux de ce manuscrit s'inscrivent dans la problématique de la colonisation des prairies humides par l'espèce aquatique invasive, *Ludwigia grandiflora*. La jussie est un modèle d'étude dans l'équipe EPIX (UMR 0985 Écologie et Santé des Écosystèmes, Rennes) depuis plusieurs années avec les travaux de Jacques Haury et plus récemment ceux de Dominique Barloy. Un des volets importants de l'étude de la jussie vise à comprendre les mécanismes d'acclimatation au milieu terrestre et de son potentiel adaptatif. Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés à une caractérisation physiologique et épigénétique comme des sources de flexibilité. Cette dernière approche s'inscrit dans le cadre d'une collaboration entre D. Barloy et S. Maury (Équipe ARCHE, Université Orléans) qui travaille en épigénétique chez le peuplier.

L'objectif de mon travail était dans un premier temps (i) de caractériser les deux morphotypes aquatique et terrestre de *Ludwigia grandiflora* en réponse au changement de milieu et de (ii) quantifier leur plasticité phénotypique respective. Ces travaux ont fait l'objet du chapitre 1 de ce manuscrit. Dans un deuxième temps (iii), nous avons exploré l'hypothèse d'une source de flexibilité épigénétique dans la réponse au changement de milieu. L'hypothèse épigénétique s'est focalisée sur la méthylation de l'ADN qui est la marque épigénétique la mieux étudiée. Cette approche a été détaillée dans le chapitre II.

Les conclusions majeures de ce travail sont :

(1) La jussie adapte son développement et son métabolisme au milieu dans lequel elle croit. Cela se traduit au niveau de son développement par des biomasses aériennes et racinaires supérieures en milieu terrestre et par des contenus en eau dans les racines et les tiges supérieurs en milieu aquatique. Au niveau de son métabolisme, *L. grandiflora* mobilise les voies liées à la respiration et à la glycolyse en milieu terrestre et les voies liées à la glycolyse et à la fermentation en milieu aquatique.

(2) Nous avons confirmé dans nos conditions expérimentales l'existence de 2 morphotypes présentant des caractéristiques morphologiques et métabolomiques propres. Cependant le morphotype terrestre présente des valeurs de traits supérieurs au morphotype aquatique quel que soit le milieu dans lequel il se développe. Ceci questionne ses capacités d'adaptation et de nuisances futures.

(3) L'hypothèse d'une implication de l'épigénétique dans l'acclimatation de la jussie au milieu terrestre est renforcée par nos travaux et abordée dans nos perspectives.

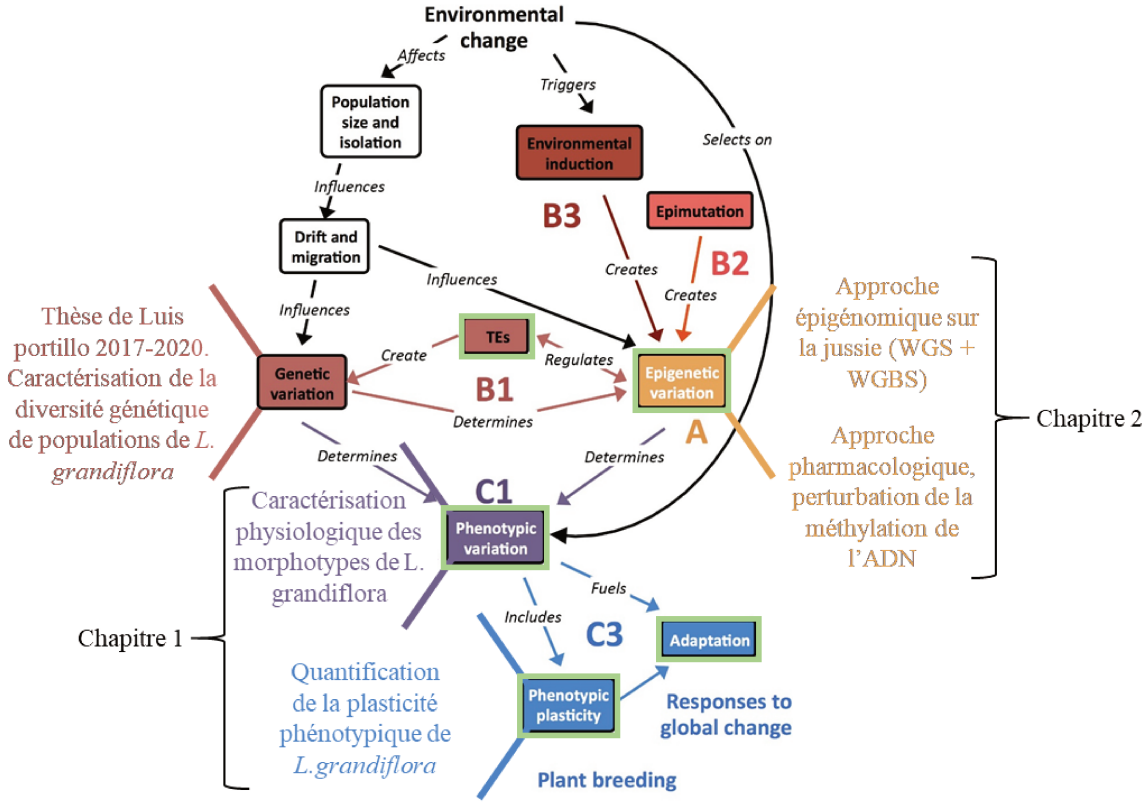


Figure III-1 : Apport de la thèse sur l'espèce invasive *L. grandiflora* à propos des interactions entre les variations génétique et épigénétique et leur rôle sur le phénotype d'après (Richards *et al.*, 2017).

Les approches en jaune correspondent aux apports de connaissance sur l'épigénétique (Chapitre 2). Les approches en violet et bleu traitent de la caractérisation physiologique de la jussie et la quantification de la plasticité phénotypique (Chapitre 1) L'approche en rouge met en avant les travaux de Luis Portillo, au laboratoire (2017-2020). Les contours verts entourent les concepts clés dans l'approche de l'adaptation de la jussie au milieu terrestre durant ma thèse. Les éléments transposables ont notamment été abordés dans la publication Marin/Genitoni *et al.* (2019).

La recherche en épigénétique écologique et évolutive porte sur (A) les modèles de variation épigénétique naturelle, (B) les origines et les moteurs de cette variation et (C) ses conséquences phénotypiques, écologiques et évolutives. Le texte à l'extérieur des cases en couleur indique les contributions supplémentaires et les effets en aval de ces sources de variation. Ici, les « changements environnementaux » comprennent la réduction et la fragmentation de l'habitat, qui sont les principales causes des déclins de la taille de la population, et peuvent entraîner la sélection des variations phénotypiques au sein des populations.

(A) Quelles sont l'étendue et la structure de la variation épigénétique chez les populations naturelles ? (B1) Quelle est l'interaction entre la variation génétique et la variation épigénétique ? (B2) À quelle fréquence les épimutations spontanées se produisent-elles et dans quelle mesure sont-elles stables ? (B3) Dans quelle mesure les changements environnementaux peuvent-ils induire des changements épigénétiques héréditaires? (C1) Quelle est l'importance relative de la variation génétique c. épigénétique dans la détermination des phénotypes ? (C2) Quelle est l'importance de la variation épigénétique pour les interactions biotiques, la biodiversité et la structure et le fonctionnement des communautés et des écosystèmes ? (C3) La variation épigénétique joue-t-elle un rôle dans l'adaptation et l'évolution des populations?

Le rôle de l'alternance des niveaux d'eau subie par le morphotype terrestre dans cette acclimatation semble également être une piste intéressante à explorer.

Les apports/limites de ces travaux sont discutés ci-après avant d'aborder leurs perspectives majeures. J'ai choisi de détailler quatre questions biologiques et de recherches. Ainsi, je me suis questionné sur : (i) les stratégies d'étude futures de l'adaptation de la jussie au milieu terrestre (ii) sur les liens entre génétique et épigénétique et leur rôle dans l'adaptation (iii) sur l'apport de l'étude des invasions biologiques dans l'étude des mécanismes épigénétiques et enfin (iiii) sur l'apport de la recherche fondamentale dans les sciences de l'invasion.

I. Synthèse des résultats et discussion sur les apports des travaux de thèse

Au début de cette thèse, je disposais d'une littérature grise sur la jussie riche d'un point de vue de la gestion et des données de terrain. En outre, le projet de recherche de Dominique Barloy démarré en 2012 a permis d'accueillir Morgane Gillard (2013), Kevin Billet (2015) et moi-même (2014) lors de stages de Master 2 permettant d'entamer des recherches fondamentales sur le sujet. Puis, plus récemment, Luis Portillo (2017-2020) et moi-même (2016-2019) avons poursuivi ces recherches en thèse. Hormis, ces travaux et ceux de Dandelot (Dandelot, 2004 ; Dandelot *et al.*, 2008), Thouvenot, (2012), Gillard (Gillard *et al.*, 2017a ; Gillard *et al.*, 2017b ; Gillard *et al.*, 2017c) sur *Ludwigia grandiflora* et quelques autres sur des espèces proches comme *Ludwigia arcuata*, aucune caractérisation physiologique (morphologie et métabolisme) de *Ludwigia grandiflora* n'avait été réalisée. À travers les chapitres 1 et 2, j'ai caractérisé les deux morphotypes de *Ludwigia grandiflora* en réponse aux changements de milieu, à des niveaux morphologiques, métaboliques, mais également au niveau épigénétique par une approche globale. J'ai résumé mon travail de thèse en exploitant la vision intégrative proposée par Richards *et al.* (2017) positionnant les interactions génétique, épigénétique sur le phénotype et l'adaptation (Figure III.1).

Dans le chapitre 1, cette caractérisation a permis de montrer des différences de réponses physiologiques entre les deux morphotypes aquatique et terrestre de la jussie (Billet *et al.*, 2018).

Ainsi, le morphotype terrestre présente des variables morphologiques plus importantes que le morphotype aquatique. En condition terrestre, la jussie présente une biomasse importante, notamment au niveau racinaire alors qu'en condition aquatique ce sont les contenus en eau des tissus racinaires et aériens qui sont favorablement affectés. Par ailleurs, la jussie est capable d'ajuster son métabolisme et la biosynthèse de phytohormones, via la production d'acides aminés en milieu aquatique et de sucres, d'acide abscissique et d'acide salicylique en condition terrestre (Billet *et al.*, 2018 ; Genitoni *et al.*, en préparation, Genitoni *et al.*, en révision). Sur l'ensemble des expérimentations menées durant cette thèse, le développement de la jussie ne semble pas particulièrement perturbé par le changement de condition, voire avantagé en milieu terrestre. Ces résultats témoignent de la tolérance de la jussie aussi bien à la submersion qu'à la dessiccation. Ainsi bien qu'essentiellement aquatique, *Ludwigia grandiflora* a montré, dans nos conditions expérimentales, une capacité à percevoir le changement de milieu (aquatique versus terrestre) et à adapter son développement et son métabolisme au milieu terrestre. La nature amphibie de cette espèce ainsi que l'identification de 2 évènements de passage de milieu terrestre au milieu aquatique dans son histoire évolutive peuvent pour partie expliquer cette aptitude (Bedoya & Madriñán, 2015). Cependant, l'existence en France de populations de *Ludwigia grandiflora* uniquement aquatique (données non publiées, projet FEDER Centre Val de Loire) suggère également une origine génétique à cette capacité d'acclimatation.

Nous avons quantifié la plasticité phénotypique des deux morphotypes en condition aquatique et en condition terrestre via l'utilisation de l'indice de plasticité RDPI proposé par Valladares *et al.* (2006). La plasticité phénotypique est reconnue comme un facteur permettant l'acclimatation voire l'adaptation chez les plantes et notamment dans le contexte des invasions biologiques (Sexton *et al.*, 2002 ; Daehler, 2003 ; Davidson *et al.*, 2011). Nous avons montré que le morphotype aquatique présentait une plasticité phénotypique plus importante que celle du morphotype terrestre, mais il se caractérisait par des valeurs de traits plus faibles. Pour expliquer cette évolution de la plasticité phénotypique entre les morphotypes aquatique et terrestre, nous proposons l'hypothèse que cette plasticité phénotypique varie durant le processus d'invasion et qu'elle joue un rôle important lors de la transition dans un nouvel environnement comme cela est suggéré par Lande (2015).

Le fait que la plasticité phénotypique du morphotype terrestre est moindre que celle du morphotype aquatique peut être associé à une assimilation génétique liée au changement de milieu et qui sera discutée ci-dessous (point 3).

Dans le chapitre 2, nous avons utilisé une approche pharmacologique *via* l'utilisation d'une drogue hypométhylante pour tester l'hypothèse d'un rôle de la méthylation de l'ADN dans la réponse au changement de milieu chez la jussie (Projet Innovant INRA département EFPA). Cette stratégie, déjà utilisée chez d'autres espèces comme *Arabidopsis thaliana* (Baubec *et al.*, 2009), a montré son efficacité sur la jussie. L'hypométhylation a été accompagnée par des changements morphologiques et physiologiques qui miment ceux observés lors de la transition du milieu aquatique au milieu terrestre par la jussie. Cependant, nous n'avons pas trouvé de différences pour le pourcentage de méthylation globale entre morphotypes et conditionnements sans hypométhylation (Genitoni *et al.*, en révision). Ces résultats suggèrent que la transition d'un morphotype aquatique vers un morphotype terrestre pourrait impliquer en partie des mécanismes épigénétiques, pas à l'échelle globale de la méthylation mais plus probablement au niveau de certaines séquences. Pour aller plus loin sur cet aspect, nous avons mis au point une stratégie épigénomique innovante basée sur les travaux de Lafon-Placette *et al.* (2013) et réalisée pour la première fois chez la jussie (2 morphotypes dans les 2 conditions environnementales). Pour ce faire, nous avons purifié la chromatine et isolé la fraction non-condensée (grâce à la DNAseI) qui est riche en gènes (Lafon-Placette *et al.*, 2013). Ensuite, nous avons réalisé un séquençage avec ou sans bisulfite (WGS et WGBS) permettant de générer des ressources (épi)génomiques (collaboration J. Tost, CEA, Evry). L'analyse bioinformatique prochaine de ces données (Postdoc A-L. Le Gac, 2020-2021) permettra d'explorer le rôle de la méthylation au niveau génique dans la réponse au changement de milieu chez les deux morphotypes de jussie.

Les limites et perspectives directes de ces travaux ont déjà été présentées à la fin de chaque chapitre. J'ai choisi de développer ici des perspectives plus larges mettant en relief les points clés dans les stratégies pour l'étude de la jussie au milieu terrestre et la recherche sur les liens entre génétique, épigénétique et l'influence de ces sources de flexibilité dans l'étude des invasions biologiques. Puis je me suis intéressé à l'intérêt du modèle invasif dans l'étude des mécanismes épigénétiques et enfin l'apport de la recherche dans les invasions biologiques.

II. Perspectives aux travaux de thèse sur le modèle jussie

1. Quelles stratégies développer pour l'étude de l'adaptation de la jussie au milieu terrestre ?

La jussie est une espèce exotique envahissante non modèle pour laquelle nous ne disposions pas au début de ma thèse de ressources génomiques. Elles sont en cours d'obtention, mais ne sont toujours pas disponibles. Pour explorer plus en amont les mécanismes d'adaptation au sens large, permettant à une espèce de s'adapter à un nouvel environnement, il faut considérer plusieurs approches complémentaires que sont les expérimentations en laboratoire et celles en condition naturelle. La première vise à contrôler au maximum l'environnement et le matériel biologique utilisé afin de distinguer les effets potentiels sur le phénotype. C'est ce que nous avons réalisé durant cette thèse. En revanche, l'extrapolation des résultats du laboratoire au milieu naturel doit être prudente, car les réponses observées peuvent être différentes en condition naturelle (Annunziata *et al.*, 2017). La première raison est qu'en condition naturelle une multitude de facteurs environnementaux interviennent et parmi eux, la combinaison des différents stress que peut subir un organisme. Enfin, il existe des interactions entre l'environnement, la génétique et l'épigénétique qui ne peuvent être contrôlées en milieu naturel (He & Li, 2018). Cependant, la cohérence des caractéristiques des morphotypes aquatique et terrestre identifiés en milieu naturel (Haury et al, 2014) et nos données de laboratoire nous confortent dans l'idée que nos expérimentations en conditions contrôlées reflètent pour partie ce qui se passe en milieu naturel.

L'étude en laboratoire est néanmoins indispensable et permet de s'intéresser à des questions spécifiques, comme la recherche des capacités des espèces invasives (*invasiveness*) impliquant la plasticité phénotypique. La caractérisation des réponses physiologiques de la jussie au milieu terrestre et aquatique a renseigné sur sa plasticité phénotypique. Cependant ces résultats ont été obtenus sur la population de Mazerolles ce qui ne permet pas d'extrapoler sur le potentiel invasif et l'adaptation de

Ludwigia grandiflora. La comparaison de différentes populations de *Ludwigia grandiflora* invasives avec des populations natives de l'aire d'origine renseignerait sur les hypothèses de préadaptation ou d'adaptation locales (Kleunen *et al.*, 2010 ; Schlaepfer *et al.*, 2010 ; Elst *et al.*, 2016 ; Oduor *et al.*, 2016). Cependant, la législation européenne sur les espèces invasives rend difficile l'importation de populations de *Ludwigia grandiflora* de son aire d'origine (Argentine). Pour pallier cette contrainte législative, nous disposons en France d'un panel de populations de *L. grandiflora* présentant uniquement des formes aquatiques et des populations où formes terrestre et aquatique cohabitent. La comparaison du comportement de populations aquatiques et des populations aquatiques versus terrestres face à des stress d'immersion et de submersion pourrait permettre d'explorer si la jussie est préadaptée ou pas au changement de milieu.

Enfin, faire le lien entre les traits phénotypiques observés et leurs valeurs sélectives (fitness) nous renseignerait sur les capacités d'adaptation de la jussie. Cependant, la quantification de la valeur sélective n'est pas une chose aisée chez les plantes comme la jussie, en raison des modes de multiplication différents (végétatif et reproductif) et de facteurs à prendre en compte (Younginger *et al.*, 2017). En effet, la dispersion du pollen, des graines et des boutures rend difficile de suivre leur survie. Par ailleurs, l'estimation de la valeur sélective dépend autant du nombre de propagules générées que de leur succès.

Il me parait essentiel pour explorer plus en amont ces questions de :

- Élargir la caractérisation physiologique et l'évaluation de la plasticité phénotypique à d'autres populations aquatiques et aquatiques *versus* terrestres en France. Cette approche permettra de dépasser le cas d'étude du marais de Mazerolles et d'évaluer les capacités d'acclimatation de la jussie au sens large. L'étude des populations natives offrirait un apport important pour la compréhension de l'adaptation de la jussie mais la législation sur l'importation d'espèces invasives est contraignante.
- Vérifier si les données obtenues en laboratoire peuvent être validées en condition naturelle. Un premier pas vers cette validation serait la conduite d'expérimentations en conditions semi-contrôlées de type *common garden* ou *reciprocal transplant*. Ces expérimentations consistent à ramener des populations dans un environnement commun en condition contrôlée ou à modifier les conditions environnementales entre plusieurs populations.

2. Comment estimer le rôle des sources de flexibilité génétique et épigénétique dans l'adaptation de la jussie au milieu terrestre ?

Comme exposé en introduction de ce manuscrit, l'adaptation au sens large utilise probablement différentes sources de flexibilité. Parmi ces sources, l'épigénétique est une thématique récente en pleine expansion, en particulier chez les espèces invasives (Marin, Genitoni et al, 2019). En effet, l'épigénétique, *via* notamment la méthylation de l'ADN, joue un rôle dans l'expression du phénotype en interaction avec l'environnement (Baulcombe & Dean, 2014 ; Kooke *et al.*, 2015). Il existe une multitude d'approches permettant d'étudier les sources de flexibilité épigénétique et génétique qui ont été détaillées dans la partie introductive de ce manuscrit.

La majorité des approches est corrélative et vise à mettre en parallèle l'effet de l'environnement sur les mécanismes épi/génétiques et sur le phénotype. L'étude des mécanismes génétiques et épigénétiques concerne en majorité des espèces modèles comme *Arabidopsis thaliana,* et les expérimentations sont réalisées en conditions contrôlées. Les données acquises sur *A. thaliana* ne sont pas forcément transposables aux autres plantes. En effet, comme le soulignent Richards *et al.* (2017), le génome d'*A. thaliana* est petit comparativement à celui d'espèces comme le riz ou encore le maïs et très faiblement méthylé, avec environ 5.3% de séquences méthylées contre 16% pour le riz et 27% pour le maïs. Ces données sont corrélées avec le faible nombre de séquences répétées identifiées chez *A. thaliana*, environ de 5% contre 16% pour le riz et 66% pour le maïs (Alonso *et al.*, 2015). Compte tenu du caractère polyploïde de *Ludwigia grandiflora,* et de la taille de son génome estimée à 800 Mb (D. Barloy, résultats non publiés), soit près de 6.5 fois le génome d'*A.thaliana*, on peut supposer qu'elle possède un nombre de séquences répétées important comme observé chez le blé (>80%) (Paux *et al.*, 2006).

Thiebaut *et al.* (2019) font la synthèse des travaux menés sur le rôle des mécanismes épigénétiques dans l'adaptation chez des espèces non modèles. La majorité de ces études repose sur l'évaluation des diversités génétique et épigénétique chez différentes populations naturelles *via* l'utilisation de la technique MSAP (Methyl-Sensitive Amplified Polymorphism) par exemple chez le

peuplier (Vanden Broeck *et al.*, 2018), chez une orchidée du genre Dactylorhiza (Paun *et al.*, 2010) ou encore chez le houx (Herrera & Bazaga, 2013).

Les variations génétique et épigénétique sont affectées à plus ou moins long terme par les contraintes environnementales et interagissent entre elles par le biais des éléments transposables (Figure III.1). Ces variations impactent l'expression des gènes et *in fine* le phénotype. Ces impacts sur le phénotype peuvent inclure une certaine plasticité phénotypique (qui peut être adaptative) et directement être soumis à la sélection naturelle et ainsi participer à l'adaptation (Richards *et al.*, 2017).

Pour comprendre l'adaptation rapide de la jussie au milieu terrestre, l'identification des composantes génétique et épigénétique doit être approfondie. Cette perspective a été évoquée dans ce manuscrit avec l'obtention des premières ressources génomiques (WBS et WGBS) sur la jussie. En outre, le séquençage des ARN (RNA-seq) est en cours au sein de la plateforme Montpellier GenomiX (MGX). Les ARN extraits des tiges et des racines des deux morphotypes terrestre et aquatique ayant subi 6 cycles d'alternance (voir discussion chapitre 1) vont ainsi être séquencés. Ces résultats permettront d'obtenir un premier transcriptome de référence de *Ludwigia grandiflora*. Une première comparaison entre les différents transcriptomes obtenus (Am-t, Am-a, Am-a/t, Tm-t et Tm-a) offrira un aperçu des gènes différentiellement exprimés entre morphotypes et conditions. Ces résultats seront associés aux données phénotypiques et surtout épigénétiques. Les transcrits intéressants dans la réponse au stress pourront alors être validés *via* une approche de gènes candidats. L'obtention des données génomiques et épigénomiques permettra à terme d'explorer les gènes sous contrôle épigénétique impliqués dans l'adaptation de la jussie au milieu terrestre. Par ailleurs, *Ludwigia grandiflora* est une espèce polyploïde ce qui complique l'analyse et l'assemblage d'un génome de référence. C'est pourquoi le séquençage d'une espèce proche diploïde, comme *Ludwigia peploïdes*, est un des enjeux majeurs pour étudier plus en amont les questions d'acclimatation et d'adaptation chez les jussies.

L'aspect transmissible des marques épigénétiques est une étape clé pour déterminer l'importance de ces mécanismes dans l'adaptation. Ainsi, à l'instar de ce qui a été fait chez *A. thaliana*, des expériences de sélection sur plusieurs générations pourraient être menées (Schmid *et al.*, 2018). Ainsi, la caractérisation des marques épigénétiques chez la jussie pourrait être réalisée par comparaison

des réponses de différentes populations à des stress d'immersion et d'émersion au cours de différents cycles de multiplication végétative. Par ailleurs, *L. grandiflora,* se reproduisant également par voie sexuée, il serait possible, à travers l'observation de différentes générations issues de la reproduction sexuée de renseigner la transmission des marques épigénétiques à la descendance. Il existe également d'autres mécanismes épigénétiques pouvant intervenir dans l'adaptation, comme stipulé en discussion de chapitre II, avec la dynamique des éléments transposables. L'obtention de ressources génomiques est indispensable pour s'intéresser à ces mécanismes qui pourrait avoir un intérêt particulier dans le cas des invasions biologiques (Schrader *et al.*, 2014 ; Stapley *et al.*, 2015).

L'exploration des diversités génétique et épigénétique en conditions naturelles peut être un moyen d'explorer le rôle de ces composantes dans l'adaptation de la jussie au milieu terrestre. Cette composante n'a pas été abordée durant ma thèse, mais Luis Portillo (2017-2020) travaille sur la diversité génétique de différentes populations de jussie terrestre et aquatique le long de la Loire. L'objectif de ce travail est de mieux comprendre la structuration des populations et de relier ces dernières à leur distribution spatiale et en lien avec la biologie de la plante, la reproduction notamment.

Pour résumer, les deux principales perspectives à long terme pour l'étude de l'adaptation de la jussie au milieu terrestre sont :

- Élargir l'étude de la plasticité phénotypique et son rôle dans le potentiel invasif à d'autres populations de *Ludwigia grandiflora* (aquatique versus terrestre et aquatique)
- Obtenir des données génomiques et épigénomiques en conditions contrôlées et naturelles.

3. Les espèces invasives représentent-elles des modèles pertinents pour l'étude des mécanismes épigénétiques ?

Une large bibliographie est disponible sur l'étude des invasions biologiques et notamment leurs conséquences et les moyens de lutte (Zedler *et al.*, 2004 ; Pyšek & Richardson, 2010). La plasticité phénotypique est encore largement débattue dans le contexte des invasions biologiques (Davidson *et al.*, 2011 ; Palacio-López & Gianoli, 2011). Comme nous l'avons montré précédemment, des liens existent entre plasticité phénotypique et épigénétique (Baulcombe & Dean, 2014; Kooke *et al.*,

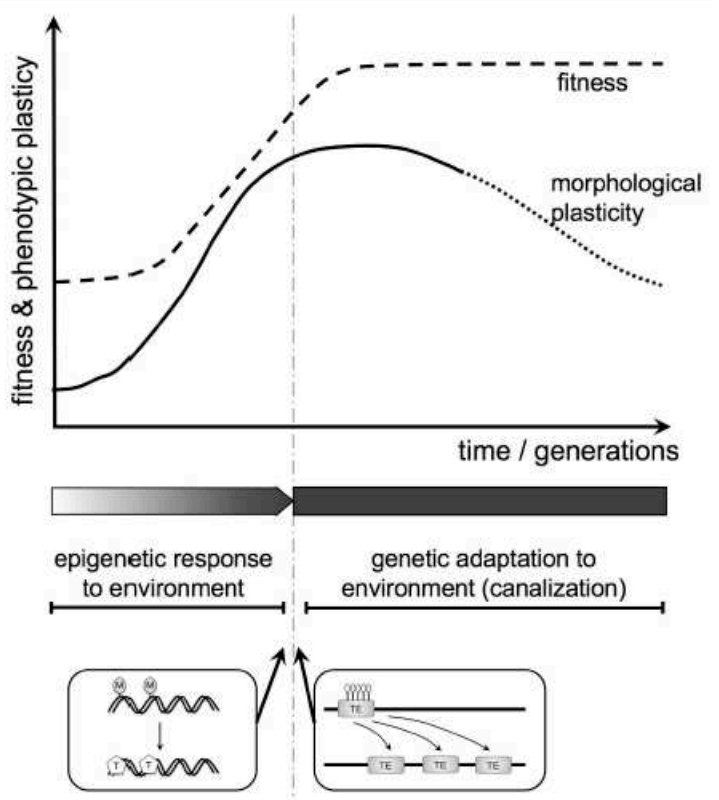


Figure III-2 : Effet Baldwin chez l'évolution (morphologique) des plantes (Bräutigam & Cronk, 2018).

Les auteurs ont intégré l'épigénome, la plasticité phénotypique et l'assimilation génétique dans un cadre évolutif théorique pour la morphologie et la fonction des plantes. Les changements induits par l'environnement dans l'épigénome influence la morphologie. Si les traits modifiés augmentent la valeur sélective, ces changements vont se répandre. Par la suite, ces modifications plastiques peuvent être remplacées par un changement génétique. Deux exemples de mécanismes moléculaires potentiels résultant d'une transition du changement épigénétique au changement génétique sont présentés ci-dessous le diagramme. Ils comprennent la génération de SNP par la déamination de la 5-méthylcytosine (M) en thymine (T) et l'activation de la transposition en cas de perte de marques hétérochromatiques (méthylation de l'ADN, modification d'histone; ici les bâtonnets blancs indiquent la méthylation de l'ADN).

2015). Les sciences de l'invasion pourraient bénéficier des clés de compréhension fournies par l'épigénétique et ainsi mieux appréhender les capacités d'adaptation rapide des espèces invasives.

Ces dernières sont des expériences grandeur nature de colonisation d'un nouveau milieu par un organisme. Cela met en jeu toutes les composantes de l'adaptation décrites par Yona *et al.* (2015) (Figure 13 de l'introduction générale). Ainsi, nous avons montré que la jussie, en réponse au changement de milieu, mobilise des réponses physiologiques à court terme, impliquant probablement des mécanismes épigénétiques (Genitoni *et al.* en préparation). L'environnement, *via* des facteurs biotiques et abiotiques, joue sur la variation épigénétique et sur la balance hormonale ce qui modifie l'expression des gènes et l'activité des éléments transposables. Dans l'article de Maury *et al.* (2019), nous proposons l'existence d'un lien étroit entre balance hormonale et mécanismes épigénétiques dans le contrôle du développement et de l'expression de la plasticité phénotypique des méristèmes chez les plantes. Ces modifications épigénétiques engendrent des changements phénotypiques qui peuvent être ou non réversibles. Une part de ces modifications épigénétiques peut participer à la mémoire d'un stress à moyen terme. Si ces mécanismes influencent la valeur sélective, on peut supposer un rôle de l'épigénétique dans l'adaptation au sens large. Bräutigam & Cronk, (2018)s'intéressent dans une synthèse bibliographique au rôle de la méthylation de l'ADN dans l'évolution chez les plantes. Ils repositionnent l'épigénétique au sein de l'effet Baldwin qui correspond à une réponse plastique d'un organisme lors de son arrivée dans un nouvel environnement sans changement génétique (Figure III.2). Dans le contexte des invasions biologiques, une plante invasive arrive dans un environnement nouveau. Ces nouvelles conditions vont engendrer des modifications épigénétiques qui peuvent modifier le phénotype et *in fine* améliorer la plasticité phénotypique et la valeur sélective d'un individu (Figure III.2). Puis, ces modifications épigénétiques peuvent être assimilées génétiquement. Ainsi, Bräutigam & Cronk, (2018) proposent deux mécanismes expliquant la transition d'un changement épigénétique vers un changement génétique. Le premier inclut la génération de polymorphisme nucléotidique de type SNP par des déaminations spontanées des cytosines méthylées (M) en thymine (T). Le second mécanisme correspond à l'activation d'éléments transposables qui vont s'insérer dans le génome en réponse aux changements épigénétiques.

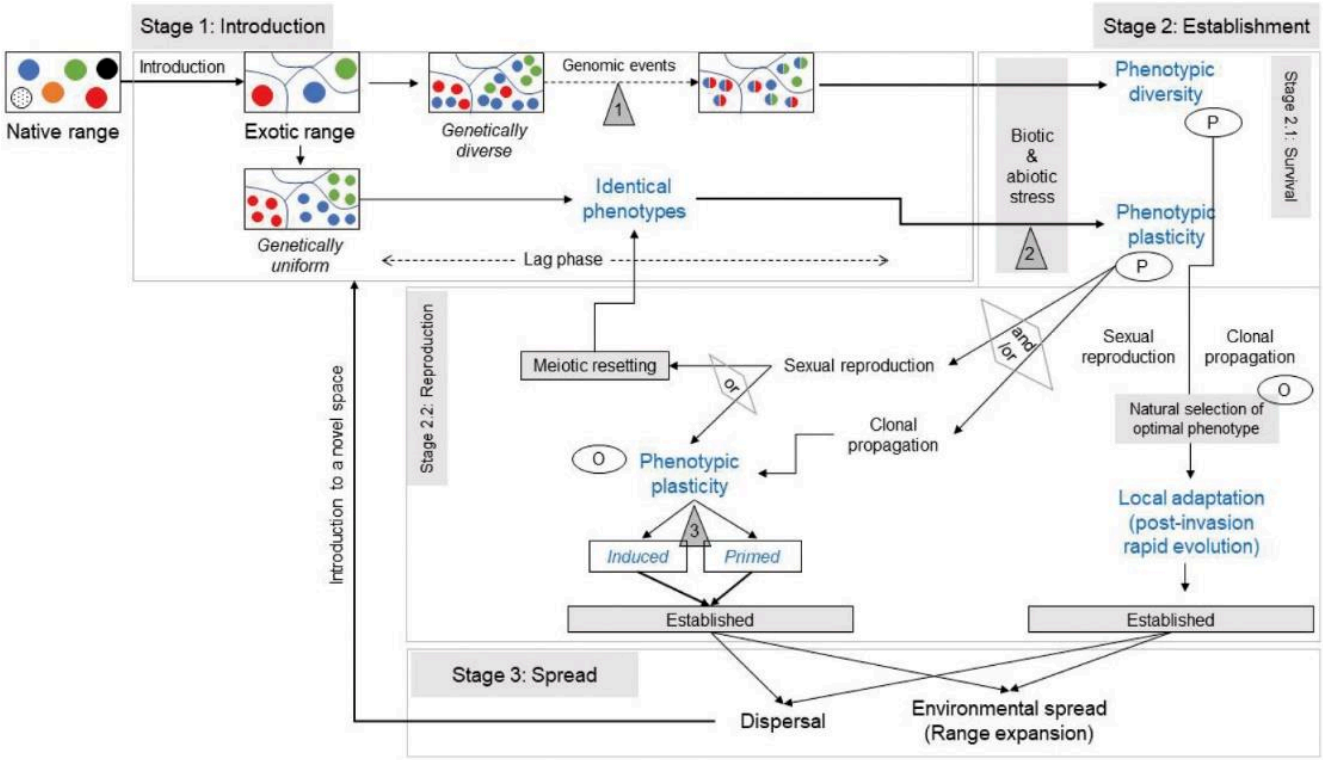


Figure III-3 : Cadre conceptuel pour la différenciation de la base génétique et épigénétique pour les variations phénotypiques à trois étapes du processus d'invasion (introduction, établissement, expansion) (Banerjee *et al.*, 2019).

La différenciation génétique entre les populations introduites peut provoquer une variation phénotypique qui conduit à l'adaptation locale et à une évolution rapide de l'invasion grâce à la sélection de caractères et à la sélection naturelle du phénotype optimal. Les variations phénotypiques liées à des variations épigénétiques sont plus fréquentes dans les populations génétiquement similaires. Trois sites où les mécanismes épigénétiques peuvent influencer le succès de l'invasion ont été marqués par des triangles : 1) en cas d'association génétique entre différents génotypes présents dans une région, 2) des modifications épigénétiques induites par le stress biotique et abiotique chez des populations similaires, et 3) la transmission de l'information épigénétique des parents (P) à la progéniture (O) rendant la progéniture capable de faire face à des types similaires d'environnement parental.

Nous avons pu montrer l'intérêt scientifique et écologique de s'attarder sur les espèces invasives et sur les mécanismes épigénétiques intervenant dans le processus d'invasion (Marin/Genitoni *et al.*, 2019). Banerjee *et al.* (2019), dans une revue récente, expliquent l'intérêt de la composante épigénétique dans le processus d'invasion (Figure III.3). Ces auteurs proposent un schéma du processus d'invasion en trois étapes où les mécanismes épigénétiques peuvent jouer un rôle important dans le succès de l'invasion : d'abord, lors d'hybridations possibles entre des génotypes différents durant l'établissement ; ensuite *via* des modifications épigénétiques induites par l'environnement (contraintes biotiques et abiotiques) et enfin par la transmission de marques épigénétiques entre les parents et leur descendance. Deux rôles ont notamment été proposés pour expliquer la place des modifications épigénétiques dans l'évolution des populations naturelles. D'une part, comme la variation génétique, la variation épigénétique peut produire des phénotypes possédant des valeurs sélectives différentes qui seront sélectionnées. D'autre part, les marques épigénétiques peuvent être transmises à la descendance et améliorer la valeur sélective de cette dernière *via* l'expression de plusieurs épiallèles (Banerjee *et al.*, 2019). Quelques études se sont intéressées aux liens entre variations épigénétiques et phénotypes chez des espèces invasives comme la renouée du Japon (Richards *et al.*, 2012) et *Alternanthera philoxeroides* (Gao *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2019).

Pourtant les plantes invasives restent peu étudiées à un niveau fondamental. En effet, nous ne disposons pas, pour la majeure partie de ces espèces, de ressources génomiques. Ceci rend l'exploration des mécanismes épigénétiques superficiels et l'utilisation de mutants difficilement envisageable pour des raisons techniques. Par ailleurs, afin d'explorer les composantes épigénétiques chez les espèces invasives, il faut pouvoir distinguer la variation génétique de la variation épigénétique. C'est pourquoi travailler sur des populations clonales, comme la jussie, est un atout. Les stratégies les plus usitées dans le cas des espèces invasives sont celles abordant les questions de diversité épigénétique ou des approches corrélatives avec des technologies peu coûteuses (MSAP et utilisation d'agent hypométhylant) (Gao *et al.*, 2010 ; Richards *et al.*, 2012 ; Spens & Douhovnikoff, 2016) (Figure III.4). Dans l'étude de l'adaptation de la jussie au milieu terrestre, nous avons adopté certaines des approches et des méthodes détaillées dans la figure III.4 comme l'utilisation d'un agent hypométhylant. Si les méthodes basées sur

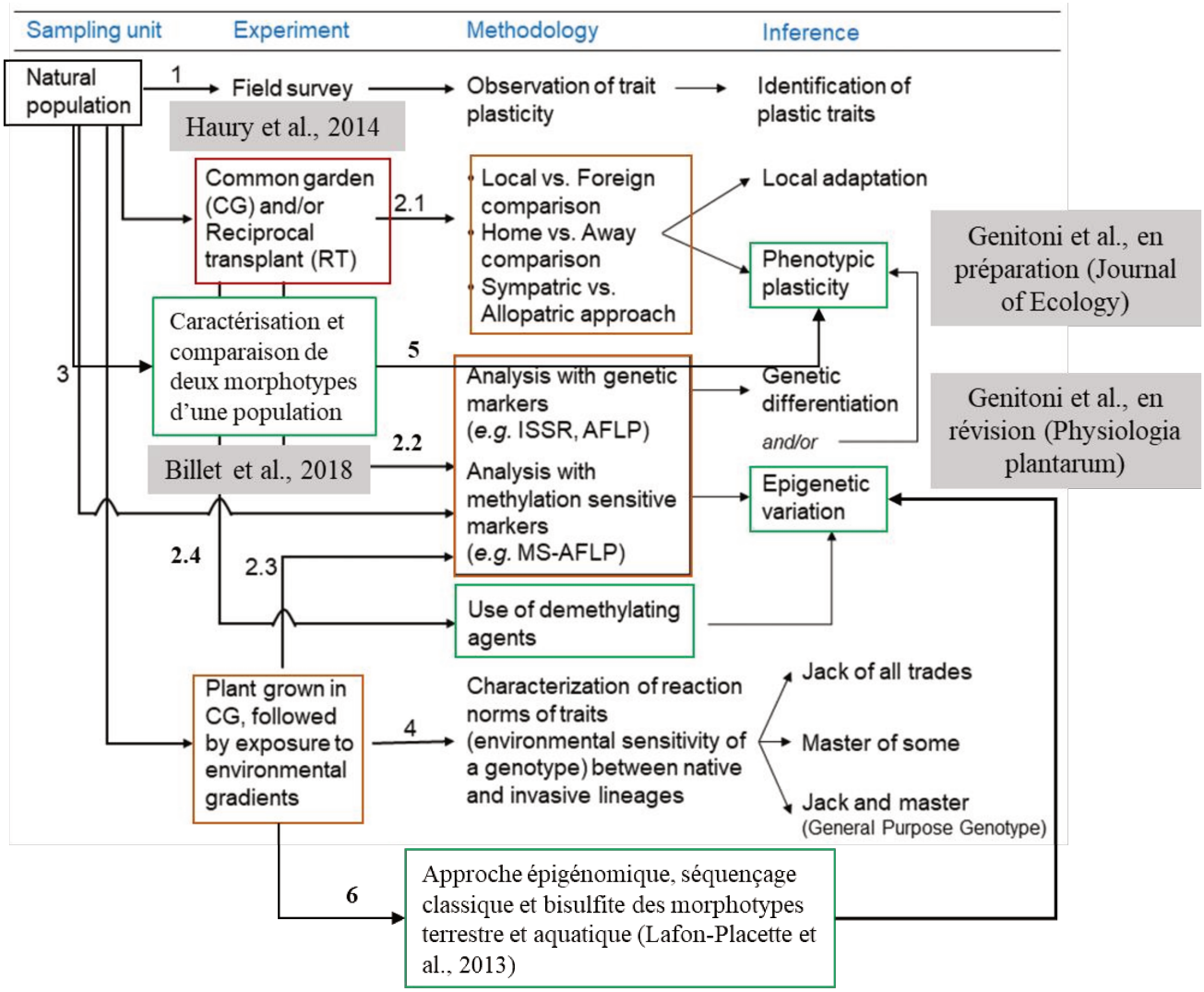


Figure III-4 : Cadre expérimental pour différencier la régulation génétique et épigénétique de la plasticité phénotypique adapté pour *Ludwigia grandiflora* d'après la figure de Banerjee *et al.* (2019).

Les encadrés verts indiquent les approches qui ont été utilisées chez *Ludwigia grandiflora* dans le cadre de ma thèse. Les encadrés orange montrent des perspectives envisageables pour la jussie. En grisé, on retrouve notamment les références concernant la jussie.

Bien qu'une étude sur le terrain des populations naturelles puisse identifier les caractères plastiques (1), les expériences de transplantation réciproque comparant les performances des populations locales et étrangères peuvent donner un aperçu de l'adaptation locale, la plasticité phénotypique et la différenciation génétique (2.1). Les plantes cultivées dans le cadre d'expériences de jardin commun peuvent être soumises à une analyse au moyen de marqueurs génétiques et sensibles à la méthylation (2.2) ou elles peuvent être exposées à des contraintes environnementales (2.3) identifier les variations génétiques et épigénétiques régulant la plasticité des caractères. L'utilisation d'agents déméthylants (2.4) peut également fournir des preuves indirectes de l'héritage épigénétique transgénérationnel. Les échantillons de populations naturelles peuvent aussi être analysés avec ces marqueurs (3). La caractérisation des normes de réactions de plantes (comparaison entre native et invasive) élevées en jardin commun en réponse à des gradients d'environnements (4) peut mettre en évidence les écarts entre le maintien de performances élevées dans une gamme de conditions (robustesse ou Jack of all trades) et la maximisation de la valeur sélective dans un environnement (opportuniste ou master of some) ou les deux (robuste avec des performances élevées, hypothèse Jack and Master). Caractérisation et comparaison physiologique de deux morphotypes aquatique et terrestre de la jussie (5) Les nouvelles méthodes de séquençages (WGS et WGBS) permettent d'envisager le transfert de ces techniques chez des espèces non-modèles (6).

la technique MSAP sont possibles pour la jussie, nous avons fait le choix de développer une approche épigénomique plus résolutive, basée sur les travaux de Lafon-Placette *et al.* (2013).

Néanmoins, la diminution drastique des coûts de séquençage (Suzuki *et al.*, 2018) ainsi que le développement de nouvelles méthodes comme l'epiRADseq (Schield *et al.*, 2016) chez des espèces non modèles sont encourageants pour les études futures (van Gurp *et al.*, 2016 ; Schield *et al.*, 2016 ; Barros-Silva *et al.*, 2018). Ainsi, un transfert de méthodologies et d'approches développées chez les espèces modèles vers les espèces invasives pourrait permettre de mieux comprendre les invasions tout en offrant des opportunités pour l'étude des processus adaptatifs.

Pour conclure, les espèces invasives peuvent représenter de bons modèles pour l'étude des mécanismes épigénétiques car ils représentent des expériences grandeur nature et offrent l'opportunité d'aborder des questions évolutives dans un contexte écologique. Par ailleurs, des processus évolutifs (dérive génétique, goulet d'étranglement, hybridation, sélection naturelle) influencent le succès des invasions biologiques et mettent en jeu une composante épigénétique qu'il faut décrypter.

Néanmoins, l'étude des mécanismes épigénétiques chez les espèces invasives reste limitée par :

- Le manque de ressources génomiques disponibles sur ces espèces
- L'impossibilité d'utiliser certaines méthodes comme la mise en place de mutants ou de création de lignées epiRILs.

4. Quels sont les apports de la recherche à la gestion des invasions biologiques?

Durant ma thèse, j'ai pu, à plusieurs reprises, expliquer mes recherches à des personnes non scientifiques. Deux interrogations revenaient souvent et ont conditionné ma réflexion sur le sujet des invasions biologiques. La première faisait référence à l'apport de la recherche fondamentale dans la gestion de ces espèces. La seconde s'attardait sur le point délicat des mots utilisés pour caractériser les espèces invasives et sur une vision politique de la science. Ce deuxième point peut paraitre anecdotique et très éloigné des problématiques de recherche scientifique. Pourtant, il est important pour mettre en perspective le travail de recherche scientifique et le rôle des chercheurs dans la société.

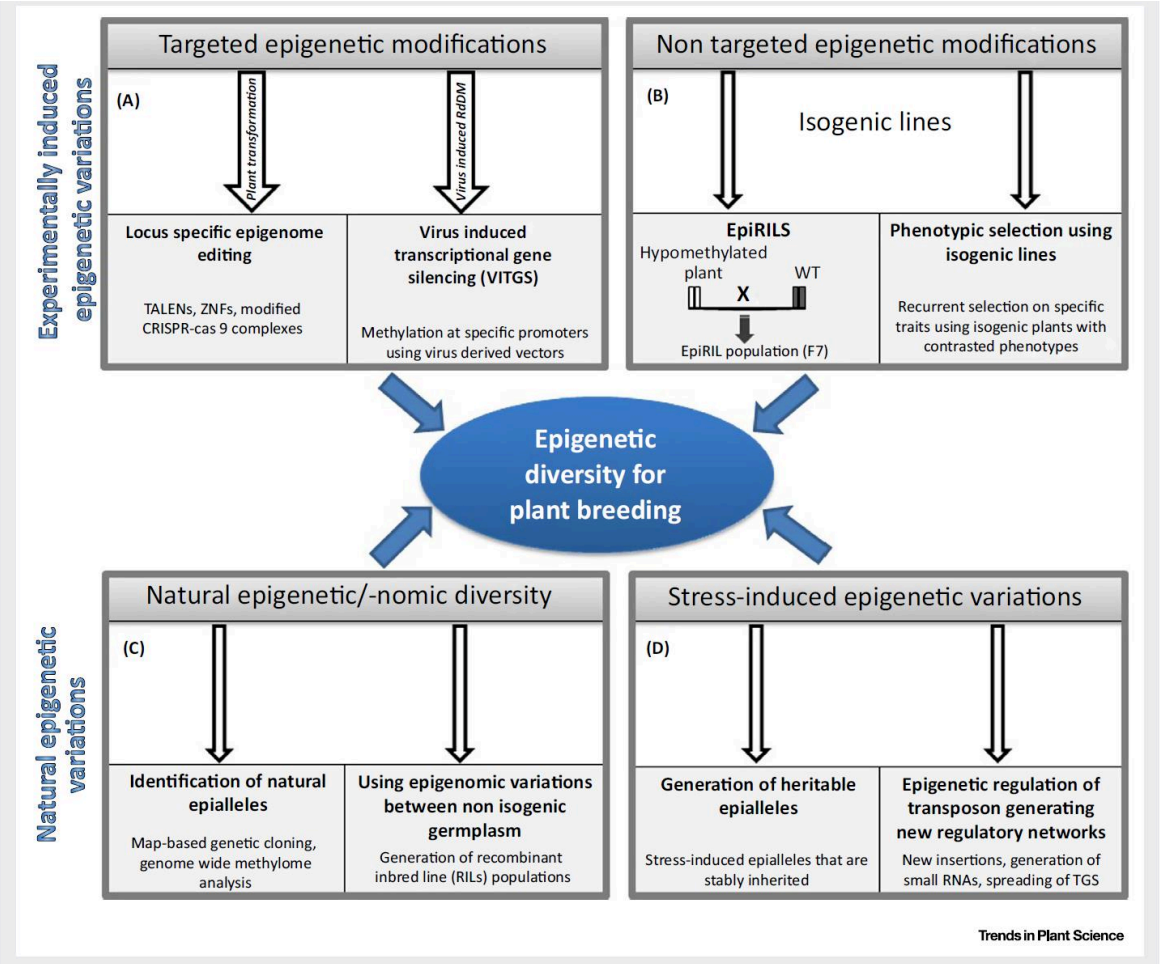


Figure III-5 : Source de diversité épigénétique pour l'amélioration des plantes (Gallusci *et al.*, 2017).

A et B. Variations épigénétiques induites expérimentalement ciblées ou non ciblées. C et D. Variations épigénétiques naturelles ou induites par un stress.

L'échange entre Ricciardi & Ryan, (2018) et Sagoff, (2018) illustre ces questions de vocabulaire et de perception des invasions biologiques dans la société. Les premiers accusent, entre autres, Sagoff de négationnisme vis-à-vis des espèces invasives « denalism » c'est-à-dire de mettre en doute les recherches concernant l'impact négatif des espèces invasives sur les écosystèmes. Le second répond sur la vision anthropomorphique et négative que l'on a de ces espèces. Les interrogations ne sont pas nouvelles et Simberloff, (2003) remet en perspective les invasions biologiques vis-à-vis des idées « politiques » de « racisme vert ».

La recherche sur la question de l'adaptation des espèces à de nouvelles conditions environnementales apporte des connaissances et techniques notamment pour l'amélioration des espèces cultivées (Gallusci *et al.*, 2017 ; Springer & Schmitz, 2017 ; Sow *et al.*, 2018). En effet, dans un contexte de changement climatique, il est important de comprendre les sources de flexibilité qui permet à une espèce de s'acclimater et s'adapter à de nouvelles conditions. Dans ce cadre, la génomique et l'épigénomique offrent des réponses permettant, d'une part de prédire l'impact de ces changements et d'ajuster les méthodes de cultures, et d'autre part, d'améliorer génétiquement et épigénétiquement les espèces cultivées. En effet, via la méthode de CRISPR-Cas9, le génome d'espèces cultivées comme le maïs, le riz, le soja et bien d'autres ont été modifiés dans un but d'amélioration génétique (Khan *et al.*, 2018). Cependant, des modifications épigénétiques avantageuses générées par la méthode CRISPR-Cas9 manquent encore chez les plantes (Noman *et al.*, 2016). Gallusci *et al.* (2017) synthétisent notamment les sources de diversité épigénétiques disponibles pour l'amélioration des plantes. Ils distinguent l'utilisation de diversité épigénétique naturelle ou expérimentalement induite (Figure III.5). Parmi les méthodes expérimentales, ils citent les modifications épigénétiques ciblées (Figure III.5A). Ces dernières consistent à ajouter ou retirer des marques épigénétiques via l'utilisation de nucléases à doigt de zinc (ZNFs), de nucléases effectrices de type activateur de transcription (TALENs), de la méthode CRIPR-cas9 ou encore grâce à l'utilisation de virus vecteurs d'ARN modifiant la méthylation. L'autre méthode est d'engendrer des modifications épigénétiques non ciblées via l'utilisation de lignées epiRILS (Figure III.5B), comme cela a été réalisé chez *A.thaliana* par le croisement de lignées de mutants *met1* ou *ddm1* avec des lignées isogéniques de types sauvages. L'utilisation de variations

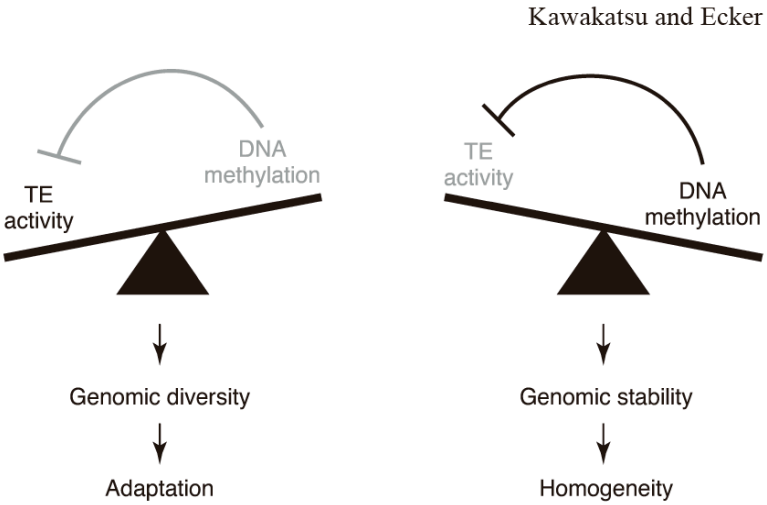


Figure III-6 : La balance entre le niveau global de méthylation de l'ADN et l'activité des éléments transposables (Kawakatsu & Ecker, 2019).

Cette balance influence probablement la diversité génétique au sein d'une population.

épigénétiques naturelles dans l'amélioration génétique des plantes repose sur l'identification d'épiallèles naturels, ce qui suppose de lier des variations épigénétiques à des traits phénotypiques et de pouvoir générer des lignées recombinantes (Figure III.5C). Enfin, l'application d'un stress peut induire des épiallèles intéressants pour l'amélioration, via notamment l'insertion d'éléments transposables dans le génome (Figure III.5D). Si ces modifications sont héritables, elles peuvent avoir un intérêt pour l'amélioration des plantes (Gallusci *et al.*, 2017 ; Springer & Schmitz, 2017). Ainsi, Thieme & Bucher (2018) suggèrent que les éléments transposables, qui sont sous contrôle épigénétique, pourraient être utilisés dans l'amélioration des plantes. Par ailleurs, Kawakatsu & Ecker, (2019) reviennent sur le rôle de la méthylation de l'ADN chez les plantes, dans le système d'incompatibilité, dans la maturation du fruit, dans la régulation des gènes, etc. Ils proposent un schéma hypothétique mettant en avant le rôle de la balance entre la méthylation de l'ADN et la régulation des éléments transposables. Ainsi, une faible méthylation de l'ADN permettrait une activité plus importante des TEs ce qui pourrait être un moteur de diversité génétique et donc d'adaptation. Au contraire, une méthylation de l'ADN forte réprime les TEs et permet une stabilité de génome (Figure III.6).

L'apport de la recherche peut sembler moins évident pour les espèces invasives. Pourtant, la recherche peut permettre de mieux comprendre les espèces invasives et de mieux prédire leur développement ainsi que les vecteurs favorables à l'invasion proposant ainsi des moyens de prévention et de luttes. Darling, (2015) propose des applications de la recherche dans la gestion des espèces invasives aquatiques. Parmi ces dernières, cet auteur cite, les outils génomiques (ADNe) permettant de détecter et identifier des espèces invasives cryptiques, de reconstruire l'histoire de l'invasion, et de comprendre la dynamique des populations invasives (McCartney *et al.*, 2019). La recherche peut apporter *via* le développement de techniques et des approches pour l'étude des espèces invasives. En outre, l'étude des capacités d'invasions des espèces, et de la sensibilité des écosystèmes permet de mieux prédire le succès d'invasion et dirige les priorités et stratégies de gestions de ces espèces. L'équipe EPIX, par le biais de Jacques Haury, dispose de relations solides avec les gestionnaires des espaces naturels impactés par la jussie. Dans ce cadre, la recherche permet, d'une part, de mettre en place des stratégies de suivi, d'évaluation des impacts et de gestion. Dans un second temps, les recherches sur la jussie offriront la possibilité d'une meilleure compréhension de l'histoire de l'invasion de la jussie, de

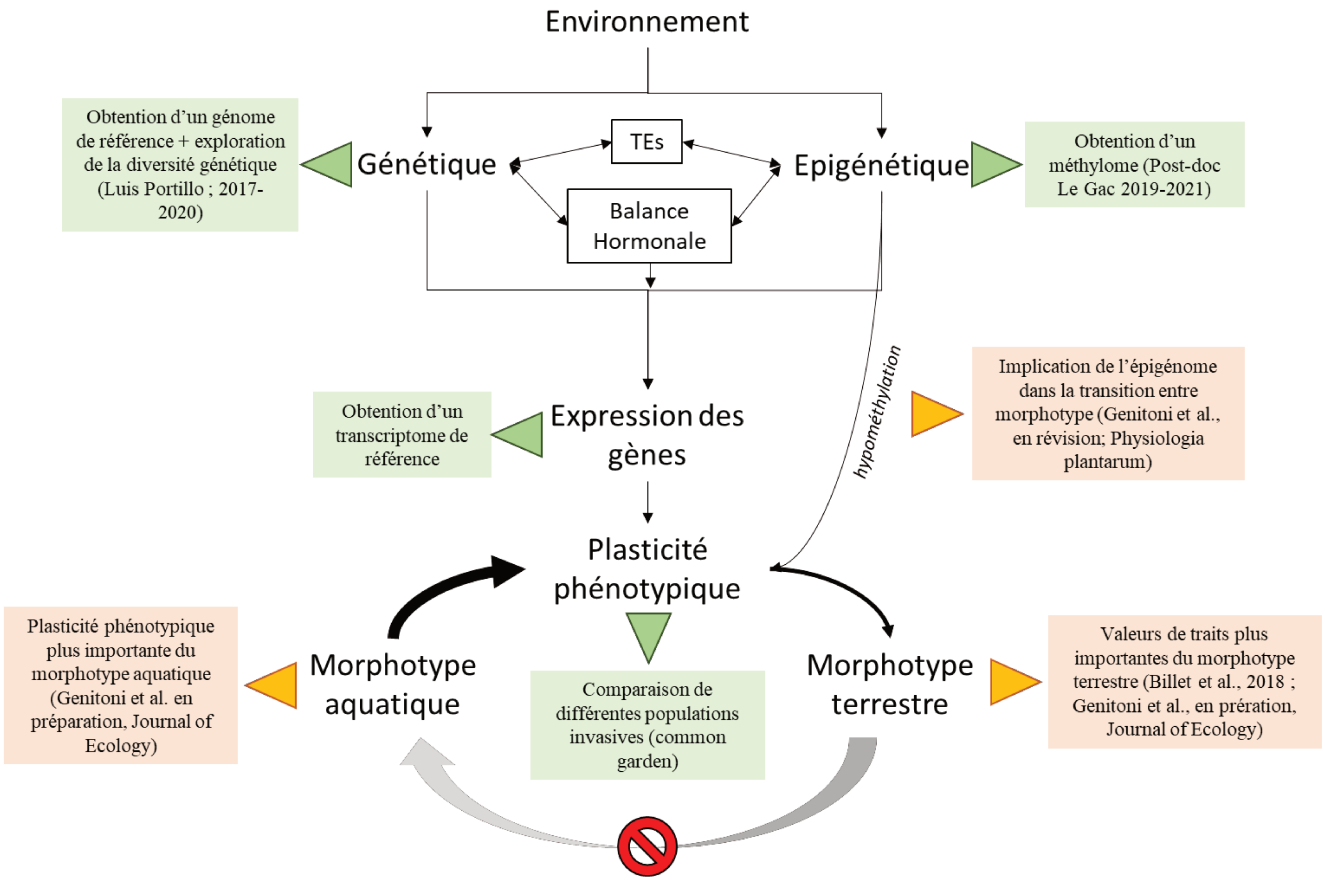


Figure III-7 : Résultats et perspectives de l'étude de l'acclimatation de *L.grandiflora* au milieu terrestre.

La transition d'un morphotype aquatique vers un morphotype terrestre implique une certaine plasticité phénotypique contrôlée par des mécanismes génétiques et épigénétique. Les résultats majeurs de ma thèse sont présentés par des flèches orange et les perspectives par des flèches vertes.

sa biologie, de ses capacités d'adaptation. Cela participera à la définition des priorités de gestion. Ainsi, les résultats de ma thèse questionnent les capacités d'adaptation rapide de la jussie et de sa tolérance à se développer dans des milieux variés. Les performances du morphotype terrestre en laboratoire lors d'un retour en condition aquatique interrogent quant à son potentiel invasif plus important que le morphotype aquatique (Figure III.7). C'est pourquoi, la recherche sur cette thématique doit être poursuivie et qu'une priorité de gestion doit être effectuée sur les formes terrestres de jussie.

Références bibliographiques

-A-

Aitken SN, Yeaman S, Holliday JA, Wang T, Curtis-McLane S (2008) Adaptation, migration or extirpation: climate change outcomes for tree populations: Climate change outcomes for tree populations. Evolutionary Applications **1**: 95–111

Akimoto K, Katakami H, Kim H-J, Ogawa E, Sano CM, Wada Y, Sano H (2007) Epigenetic Inheritance in Rice Plants. Ann Bot **100**: 205–217

Allis CD, Jenuwein T (2016) The molecular hallmarks of epigenetic control. Nature Reviews Genetics **17**: 487–500

Alonso C, Pérez R, Bazaga P, Herrera CM (2015) Global DNA cytosine methylation as an evolving trait: phylogenetic signal and correlated evolution with genome size in angiosperms. Front Genet. doi: 10.3389/fgene.2015.00004

Alonso C, Ramos-Cruz D, Becker C (2019) The role of plant epigenetics in biotic interactions. New Phytologist **221**: 731–737

Alpert P, Bone E, Holzapfel C (2000) Invasiveness, invasibility and the role of environmental stress in the spread of non-native plants. Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics **3**: 52–66

Alsdurf J, Anderson C, Siemens DH (2016) Epigenetics of drought-induced trans-generational plasticity: consequences for range limit development. AoB PLANTS. doi: 10.1093/aobpla/plv146

Angulo E, Luque GM, Gregory SD, Wenzel JW, Bessa-Gomes C, Berec L, Courchamp F (2018) Review: Allee effects in social species. Journal of Animal Ecology **87**: 47–58

Anjum SA, Ashraf U, Tanveer M, Khan I, Hussain S, Shahzad B, Zohaib A, Abbas F, Saleem MF, Ali I, et al (2017) Drought Induced Changes in Growth, Osmolyte Accumulation and Antioxidant Metabolism of Three Maize Hybrids. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2017.00069

Annunziata MG, Apelt F, Carillo P, Krause U, Feil R, Mengin V, Lauxmann MA, Köhl K, Nikoloski Z, Stitt M, et al (2017) Getting back to nature: a reality check for experiments in controlled environments. J Exp Bot **68**: 4463–4477

Arnold PA, Kruuk LEB, Nicotra AB (2019) How to analyse plant phenotypic plasticity in response to a changing climate. New Phytologist **222**: 1235–1241

Ashraf M, Foolad MR (2007) Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance. Environmental and Experimental Botany **59**: 206–216

Atkin OK, Macherel D (2009) The crucial role of plant mitochondria in orchestrating drought tolerance. Ann Bot **103**: 581–597

-B-

Baier M, Bittner A, Prescher A, Buer J van (2019) Preparing plants for improved cold tolerance by priming. Plant, Cell & Environment **42**: 782–800

Bailey-Serres J, Fukao T, Gibbs DJ, Holdsworth MJ, Lee SC, Licausi F, Perata P, Voesenek LACJ, van Dongen JT (2012) Making sense of low oxygen sensing. Trends in Plant Science **17**: 129–138

Banerjee AK, Guo W, Huang Y (2019) Genetic and epigenetic regulation of phenotypic variation in invasive plants – linking research trends towards a unified framework. NeoBiota **49**: 77–103

Banti V, Giuntoli B, Gonzali S, Loreti E, Magneschi L, Novi G, Paparelli E, Parlanti S, Pucciariello C, Santaniello A, et al (2013) Low Oxygen Response Mechanisms in Green Organisms. Int J Mol Sci **14**: 4734–4761

Bao-Ming Chen, Hui-Xuan Liao, Wei-Bin Chen, Hui-Jie Wei, Shao-Lin Peng (2017) Role of allelopathy in plant invasion and control of invasive plants. AJ **41**: 155–166

Barros-Silva D, Marques CJ, Henrique R, Jerónimo C (2018) Profiling DNA Methylation Based on Next-Generation Sequencing Approaches: New Insights and Clinical Applications. Genes (Basel). doi: 10.3390/genes9090429

Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA, Dean C (2004) Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. Nature **427**: 164–167

Basu S, Ramegowda V, Kumar A, Pereira A (2016) Plant adaptation to drought stress. F1000Res. doi: 10.12688/f1000research.7678.1

Baubec T, Pecinka A, Rozhon W, Mittelsten Scheid O (2009) Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine. The Plant Journal **57**: 542–554

Baulcombe DC, Dean C (2014) Epigenetic Regulation in Plant Responses to the Environment. Cold Spring Harb Perspect Biol. doi: 10.1101/cshperspect.a019471

Bedoya AM, Madriñán S (2015) Evolution of the aquatic habit in Ludwigia (Onagraceae): Morpho-anatomical adaptive strategies in the Neotropics. Aquatic Botany **120**: 352–362

Beldade P, Mateus ARA, Keller RA (2011) Evolution and molecular mechanisms of adaptive developmental plasticity: ADAPTIVE DEVELOPMENTAL PLASTICITY. Molecular Ecology **20**: 1347–1363

Bellard C, Thuiller W, Leroy B, Genovesi P, Bakkenes M, Courchamp F (2013) Will climate change promote future invasions? Global Change Biology **19**: 3740–3748

Bielach A, Hrtyan M, Tognetti VB (2017) Plants under Stress: Involvement of Auxin and Cytokinin. Int J Mol Sci. doi: 10.3390/ijms18071427

Bilichak A, Ilnystkyy Y, Hollunder J, Kovalchuk I (2012) The Progeny of Arabidopsis thaliana Plants Exposed to Salt Exhibit Changes in DNA Methylation, Histone Modifications and Gene Expression. PLOS ONE **7**: e30515

Billet K, Genitoni J, Bozec M, Renault D, Barloy D (2018) Aquatic and terrestrial morphotypes of the aquatic invasive plant, *Ludwigia grandiflora* , show distinct morphological and metabolomic responses. Ecology and Evolution **8**: 2568–2579

Boiché A, Lemoine DG, Barrat-Segretain M-H, Thiébaut G (2011) Resistance to herbivory of two populations of Elodeacanadensis Michaux and Elodea nuttallii Planchon St. John. Plant Ecol **212**: 1723–1731

Bonamour Suzanne, Chevin Luis-Miguel, Charmantier Anne, Teplitsky Céline (2019) Phenotypic plasticity in response to climate change: the importance of cue variation. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **374**: 20180178

Bornette G, Puijalon S (2011) Response of aquatic plants to abiotic factors: a review. Aquat Sci **73**: 1–14

Bossdorf O, Arcuri D, Richards CL, Pigliucci M (2010) Experimental alteration of DNA methylation affects the phenotypic plasticity of ecologically relevant traits in Arabidopsis thaliana. Evolutionary Ecology **24**: 541–553

Bowne JB, Erwin TA, Juttner J, Schnurbusch T, Langridge P, Bacic A, Roessner U (2012) Drought Responses of Leaf Tissues from Wheat Cultivars of Differing Drought Tolerance at the Metabolite Level. Molecular Plant **5**: 418–429

Boyko A, Blevins T, Yao Y, Golubov A, Bilichak A, Ilnytskyy Y, Hollander J, Jr FM, Kovalchuk I (2010) Transgenerational Adaptation of Arabidopsis to Stress Requires DNA Methylation and the Function of Dicer-Like Proteins. PLOS ONE **5**: e9514

Bradley BA, Oppenheimer M, Wilcove DS (2009) Climate change and plant invasions: restoration opportunities ahead? Global Change Biology **15**: 1511–1521

Bräutigam K, Cronk Q (2018) DNA Methylation and the Evolution of Developmental Complexity in Plants. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2018.01447

Bräutigam K, Vining KJ, Lafon-Placette C, Fossdal CG, Mirouze M, Marcos JG, Fluch S, Fraga MF, Guevara MÁ, Abarca D, et al (2013) Epigenetic regulation of adaptive responses of forest tree species to the environment. Ecology and Evolution **3**: 399–415

Brown B, Mitchell R (2001) Competition for pollination: Effects of pollen of an invasive plant on seed set of a native congener. Oecologia **129**: 43–49

Bucher E, Reinders J, Mirouze M (2012) Epigenetic control of transposon transcription and mobility in Arabidopsis. Curr Opin Plant Biol **15**: 503–510

Burn JE, Bagnall DJ, Metzger JD, Dennis ES, Peacock WJ (1993) DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering. PNAS **90**: 287–291

-C-

Cadotte MW, Murray BR, Lovett-Doust J (2006) Ecological Patterns and Biological Invasions: Using Regional Species Inventories in Macroecology. Biol Invasions **8**: 809–821

Campos-Rivero G, Osorio-Montalvo P, Sánchez-Borges R, Us-Camas R, Duarte-Aké F, De-la-Peña C (2017) Plant hormone signaling in flowering: An epigenetic point of view. Journal of Plant Physiology **214**: 16–27

Cazzolla Gatti R (2016) Freshwater biodiversity: a review of local and global threats. International Journal of Environmental Studies **73**: 1–18

Ceballos G, Ehrlich PR, Dirzo R (2017) Biological annihilation via the ongoing sixth mass extinction signaled by vertebrate population losses and declines. PNAS **114**: E6089–E6096

Chang C-I, Kuo C-C, Chang J-Y, Kuo Y-H (2004) Three New Oleanane-Type Triterpenes from Ludwigia octovalvis with Cytotoxic Activity against Two Human Cancer Cell Lines. Journal of natural products **67**: 91–3

Chauvel B, Martinez Q (2013) Allergie à l'ambroisie : quels moyens pour empêcher l'invasion ? Revue Française d'Allergologie **53**: 229–234

Chevin L-M, Hoffmann AA (2017) Evolution of phenotypic plasticity in extreme environments. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences **372**: 20160138

Chevin L-M, Lande R, Mace GM (2010) Adaptation, Plasticity, and Extinction in a Changing Environment: Towards a Predictive Theory. PLOS Biology **8**: e1000357

Chittka L, Schürkens S (2001) Successful invasion of a floral market. Nature **411**: 653–653

Choi C-S, Sano H (2007) Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. Mol Genet Genomics **277**: 589–600

Chown SL, Slabber S, McGeoch MA, Janion C, Leinaas HP (2007) Phenotypic plasticity mediates climate change responses among invasive and indigenous arthropods. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **274**: 2531–2537

Clarke AL, Pacin T (2002) Domestic cat "colonies" in natural areas: A growing exotic species threat. Natural Areas Journal **22**: 154–159

Comai L (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. Nat Rev Genet **6**: 836–846

Comas LH, Becker SR, Cruz VMV, Byrne PF, Dierig DA (2013) Root traits contributing to plant productivity under drought. Frontiers in Plant Science. doi: 10.3389/fpls.2013.00442

Conde D, Le Gac A-L, Perales M, Dervinis C, Kirst M, Maury S, González-Melendi P, Allona I (2017) Chilling-responsive DEMETER-LIKE DNA demethylase mediates in poplar bud break: Role of active DNA demethylase in trees' bud break. Plant, Cell & Environment **40**: 2236–2249

Crisp PA, Ganguly D, Eichten SR, Borevitz JO, Pogson BJ (2016) Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. Science Advances **2**: e1501340–e1501340

Crowley SL, Hinchliffe S, McDonald RA (2017) Conflict in invasive species management. Frontiers in Ecology and the Environment **15**: 133–141

Cubas P, Vincent C, Coen E (1999) An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. Nature **401**: 157–161

Cui X, Cao X (2014) Epigenetic regulation and functional exaptation of transposable elements in higher plants. Current Opinion in Plant Biology **21**: 83–88

-D-

Daehler CC (2003) Performance Comparisons of Co-Occurring Native and Alien Invasive Plants: Implications for Conservation and Restoration. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **34**: 183–211

Dandelot S (2004) Les Ludwigia spp. invasives du Sud de la France: historique, biosystématique, biologie et écologie. These de doctorat de l'Université de Aix-Marseille 207:

Dandelot S, Robles C, Pech N, Cazaubon A, Verlaque R (2008) Allelopathic potential of two invasive alien Ludwigia spp. Aquatic Botany **88**: 311–316

Dandelot S, Verlaque R, Dutartre A, Cazaubon A (2005) Ecological, Dynamic and Taxonomic Problems Due to Ludwigia (Onagraceae) in France. Hydrobiologia **551**: 131–136

Darling JA (2015) Genetic studies of aquatic biological invasions: closing the gap between research and management. Biol Invasions **17**: 951–971

Davidson AM, Jennions M, Nicotra AB (2011) Do invasive species show higher phenotypic plasticity than native species and, if so, is it adaptive? A meta-analysis: Invasive species have higher phenotypic plasticity. Ecology Letters **14**: 419–431

Davies KW, Sheley RL (2007) A Conceptual Framework for Preventing the Spatial Dispersal of Invasive Plants. Weed sci **55**: 178–184

Davis MB, Shaw RG (2001) Range shifts and adaptive responses to Quaternary climate change. Science **292**: 673–679

Dawood T, Yang X, Visser EJW, Te Beek TAH, Kensche PR, Cristescu SM, Lee S, Floková K, Nguyen D, Mariani C, et al (2016) A Co-Opted Hormonal Cascade Activates Dormant Adventitious Root Primordia upon Flooding in Solanum dulcamara. Plant Physiol **170**: 2351–2364

De Carvalho JF, Poulain J, Da Silva C, Wincker P, Michon-Coudouel S, Dheilly A, Naquin D, Boutte J, Salmon A, Ainouche M (2013) Transcriptome de novo assembly from next-generation sequencing and comparative analyses in the hexaploid salt marsh species Spartina maritima and Spartina alterniflora (Poaceae). Heredity **110**: 181–193

Deeba F, Pandey AK, Ranjan S, Mishra A, Singh R, Sharma YK, Shirke PA, Pandey V (2012) Physiological and proteomic responses of cotton (Gossypium herbaceum L.) to drought stress. Plant Physiol Biochem **53**: 6–18

Del Valle J, Buide ML, Whittall J, Narbona E (2018) Phenotypic plasticity in light-induced flavonoids varies among tissues in Silene littorea (Caryophyllaceae). Environmental and Experimental Botany. doi: 10.1016/j.envexpbot.2018.05.014

Delbart E, Mahy G, Monty A (2013) Effectiveness of techniques used to control the development of five invasive amphibious plant species: Crassula helmsii, Hydrocotyle ranunculoides, *Ludwigia grandiflora*, Ludwigia peploides and Myriophyllum aquaticum. A review. Biotechnology, Agronomy and Society and Environment **17**: 87–102

DeWitt TJ, Scheiner SM (2004) Phenotypic Plasticity: Functional and Conceptual Approaches. Oxford University Press

Dewitt TJ, Sih A, Wilson DS (1998) Costs and limits of phenotypic plasticity. Trends Ecol Evol (Amst) **13**: 77–81

Dingemanse NJ, Kazem AJN, Réale D, Wright J (2010) Behavioural reaction norms: animal personality meets individual plasticity. Trends Ecol Evol (Amst) **25**: 81–89

DiTomaso JM (2000) Invasive weeds in rangelands: Species, impacts, and management. wees **48**: 255–265

Douhovnikoff V, Dodd RS (2015) Epigenetics: a potential mechanism for clonal plant success. Plant Ecology **216**: 227–233

Dowen RH, Pelizzola M, Schmitz RJ, Lister R, Dowen JM, Nery JR, Dixon JE, Ecker JR (2012) Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. Proc Natl Acad Sci USA **109**: E2183-2191

Duncan EJ, Gluckman PD, Dearden PK (2014) Epigenetics, plasticity, and evolution: How do we link epigenetic change to phenotype?: EPIGENETICS, PLASTICITY, AND EVOLUTION. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution **322**: 208–220

-E-

Early R, Bradley BA, Dukes JS, Lawler JJ, Olden JD, Blumenthal DM, Gonzalez P, Grosholz ED, Ibañez I, Miller LP, et al (2016) Global threats from invasive alien species in the twenty-first century and national response capacities. Nature Communications **7**: 12485

Ehrenfeld JG (2010) Ecosystem Consequences of Biological Invasions. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **41**: 59–80

Eichten SR, Schmitz RJ, Springer NM (2014) Epigenetics: Beyond Chromatin Modifications and Complex Genetic Regulation. Plant Physiology **165**: 933–947

Elst EM, Acharya KP, Dar PA, Reshi ZA, Tufto J, Nijs I, Graae BJ (2016) Pre-adaptation or genetic shift after introduction in the invasive species Impatiens glandulifera? Acta Oecologica **70**: 60–66

Estévez RA, Anderson CB, Pizarro JC, Burgman MA (2015) Clarifying values, risk perceptions, and attitudes to resolve or avoid social conflicts in invasive species management. Conservation Biology **29**: 19–30

Estoup A, Ravigné V, Hufbauer R, Vitalis R, Gautier M, Facon B (2016) Is There a Genetic Paradox of Biological Invasion? Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **47**: 51–72

-F-

Feeley KJ, Rehm EM, Machovina B (2012) perspective: The responses of tropical forest species to global climate change: acclimate, adapt, migrate, or go extinct? Frontiers of Biogeography. doi: 10.21425/F5FBG12621

Felsenfeld G (2014) A Brief History of Epigenetics. Cold Spring Harb Perspect Biol. doi: 10.1101/cshperspect.a018200

Feng S, Jacobsen SE, Reik W (2010) Epigenetic Reprogramming in Plant and Animal Development. Science **330**: 622–627

Ferdous J, Hussain SS, Shi B-J (2015) Role of microRNAs in plant drought tolerance. Plant Biotechnology Journal **13**: 293–305

Finnegan EJ, Kovac KA, Jaligot E, Sheldon CC, Peacock WJ, Dennis ES (2005) The downregulation of FLOWERING LOCUS C (FLC) expression in plants with low levels of DNA methylation and by vernalization occurs by distinct mechanisms. The Plant Journal **44**: 420–432

Food RRP (Phyllis W Harmful Non-Indigenous Species in the United States. 397

Forero-Medina G, Terborgh J, Socolar SJ, Pimm SL (2011) Elevational Ranges of Birds on a Tropical Montane Gradient Lag behind Warming Temperatures. PLOS ONE **6**: e28535

Franks SJ, Weber JJ, Aitken SN (2014) Evolutionary and plastic responses to climate change in terrestrial plant populations. Evolutionary Applications **7**: 123–139

Fondation pour la recherche sur la biodiversité FRB (2016) Réponses et adaptations aux changements globaux: quels enjeux pour la recherche sur la biodiversité ?

Fukao T, Barrera-Figueroa BE, Juntawong P, Peña-Castro JM (2019) Submergence and Waterlogging Stress in Plants: A Review Highlighting Research Opportunities and Understudied Aspects. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2019.00340

-G-

Gaertner M, Den Breeyen A, Hui C, Richardson DM (2009) Impacts of alien plant invasions on species richness in Mediterranean-type ecosystems: a meta-analysis. Progress in Physical Geography: Earth and Environment **33**: 319–338

Gaillochet C, Lohmann JU (2015) The never-ending story: from pluripotency to plant developmental plasticity. Development **142**: 2237–2249

Galindo-González L, Sarmiento F, Quimbaya MA (2018) Shaping Plant Adaptability, Genome Structure and Gene Expression through Transposable Element Epigenetic Control: Focus on Methylation. Agronomy **8**: 180

Gallardo B, Clavero M, Sánchez MI, Vilà M (2016) Global ecological impacts of invasive species in aquatic ecosystems. Global Change Biology **22**: 151–163

Gallusci P, Dai Z, Génard M, Gauffretau A, Leblanc-Fournier N, Richard-Molard C, Vile D, Brunel-Muguet S (2017) Epigenetics for Plant Improvement: Current Knowledge and Modeling Avenues. Trends in Plant Science **22**: 610–623

Gao L, Geng Y, Li B, Chen J, Yang J (2010) Genome-wide DNA methylation alterations of Alternanthera philoxeroides in natural and manipulated habitats: implications for epigenetic regulation of rapid responses to environmental fluctuation and phenotypic variation: Environmental epigenetics of A. philoxeroides. Plant, Cell & Environment **33**: 1820–1827

Gao L, Geng Y, Yang H, Hu Y, Yang J (2015) Gene Expression Reaction Norms Unravel the Molecular and Cellular Processes Underpinning the Plastic Phenotypes of Alternanthera Philoxeroides in Contrasting Hydrological Conditions. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2015.00991

Garcia-Aguilar M, Michaud C, Leblanc O, Grimanelli D (2010) Inactivation of a DNA Methylation Pathway in Maize Reproductive Organs Results in Apomixis-Like Phenotypes. The Plant Cell **22**: 3249–3267

Garg R, Narayana Chevala V, Shankar R, Jain M (2015) Divergent DNA methylation patterns associated with gene expression in rice cultivars with contrasting drought and salinity stress response. Scientific Reports **5**: 14922

Garssen AG, Baattrup-Pedersen A, Voesenek LACJ, Verhoeven JTA, Soons MB (2015) Riparian plant community responses to increased flooding: a meta-analysis. Global Change Biology **21**: 2881–2890

Gasch P, Fundinger M, Müller JT, Lee T, Bailey-Serres J, Mustroph A (2016) Redundant ERF-VII Transcription Factors Bind to an Evolutionarily Conserved cis-Motif to Regulate Hypoxia-Responsive Gene Expression in Arabidopsis. Plant Cell **28**: 160–180

Genton B (2005) Intérêt d'une approche évolutive pour l'étude des invasions biologiques. L'invasion d'Ambrosia artemisiifolia dans la vallée du Rhône. thesis. Paris, ENGR

Ghalambor CK, McKAY JK, Carroll SP, Reznick DN (2007) Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. Functional Ecology **21**: 394–407

Gibert P (2012) Plasticité phénotypique et réponses adaptatives aux changements environnementaux chez les insectes. thesis

Gillard M, Grewell BJ, Deleu C, Thiébaut G (2017a) Climate warming and water primroses: Germination responses of populations from two invaded ranges. Aquatic Botany **136**: 155–163

Gillard M, Grewell BJ, Deleu C, Thiébaut G (2017b) Climate warming and water primroses: Germination responses of populations from two invaded ranges. Aquatic Botany **136**: 155–163

Gillard M, Grewell BJ, Futrell CJ, Deleu C, Thiébaut G (2017c) Germination and Seedling Growth of Water Primroses: A Cross Experiment between Two Invaded Ranges with Contrasting Climates. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2017.01677

Gillard M, Thiébaut G, Deleu C, Leroy B (2017d) Present and future distribution of three aquatic plants taxa across the world: decrease in native and increase in invasive ranges. Biol Invasions **19**: 2159–2170

Godoy O, Valladares F, Castro-Díez P (2011) Multispecies comparison reveals that invasive and native plants differ in their traits but not in their plasticity: Phenotypic plasticity and invasiveness. Functional Ecology **25**: 1248–1259

Gómez P, Murúa M, Martín JS, Goncalves E, Bustamante RO (2019) Maintaining close canopy cover prevents the invasion of Pinus radiata: Basic ecology to manage native forest invasibility. PLOS ONE **14**: e0210849

Gómez-Díaz E, Jordà M, Peinado MA, Rivero A (2012) Epigenetics of Host–Pathogen Interactions: The Road Ahead and the Road Behind. PLoS Pathogens **8**: e1003007

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

Griesser M, Weingart G, Schoedl-Hummel K, Neumann N, Becker M, Varmuza K, Liebner F, Schuhmacher R, Forneck A (2015) Severe drought stress is affecting selected primary metabolites, polyphenols, and volatile metabolites in grapevine leaves (Vitis vinifera cv. Pinot noir). Plant Physiology and Biochemistry **88**: 17–26

Gully K, Celton J-M, Degrave A, Pelletier S, Brisset M-N, Bucher E (2019) Biotic Stress-Induced Priming and De-Priming of Transcriptional Memory in Arabidopsis and Apple. Epigenomes **3**: 3

Guo J-E, Hu Z, Yu X, Li A, Li F, Wang Y, Tian S, Chen G (2018) A histone deacetylase gene, SlHDA3, acts as a negative regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation. Plant Cell Reports **37**: 125–135

van Gurp TP, Wagemaker NCAM, Wouters B, Vergeer P, Ouborg JNJ, Verhoeven KJF (2016) epiGBS: reference-free reduced representation bisulfite sequencing. Nature Methods **13**: 322–324

-H-

Hao G-P, Zhang X-H, Wang Y-Q, Wu Z-Y, Huang C-L (2009) Nucleotide Variation in the NCED3 Region of Arabidopsis thaliana and its Association Study with Abscisic Acid Content under Drought Stress. Journal of Integrative Plant Biology **51**: 175–183

Haury J, Damien J-P (2014) De nouvelles mauvaises herbes en zones humides: les formes terrestres des Jussies invasives sur prairies. 7

Haury J, Druel A, Cabral T, Paulet Y, Bozec M, Coudreuse J (2014) Which adaptations of some invasive Ludwigia spp. (Rosidae, Onagraceae) populations occur in contrasting hydrological conditions in Western France? Hydrobiologia **737**: 45–56

Haury J, Noël F, Bozec M, Coudreuse J, Guil J, Marrel G, Maisonneuve JL, Damien JP (2011) Importance of *Ludwigia grandiflora* as invasive weed on meadows and pastures in Western France.

Havel JE, Kovalenko KE, Thomaz SM, Amalfitano S, Kats LB (2015) Aquatic invasive species: challenges for the future. Hydrobiologia **750**: 147–170

He L, Bakker ES, Alirangues Nunez MM, Hilt S (2019) Combined effects of shading and clipping on the invasive alien macrophyte Elodea nuttallii. Aquatic Botany **154**: 24–27

He Y, Li Z (2018) Epigenetic Environmental Memories in Plants: Establishment, Maintenance, and Reprogramming. Trends in Genetics **34**: 856–866

Heard E, Martienssen RA (2014) Transgenerational Epigenetic Inheritance: Myths and Mechanisms. Cell **157**: 95–109

Hébrard C, Peterson DG, Willems G, Delaunay A, Jesson B, Lefèbvre M, Barnes S, Maury S (2016a) Epigenomics and bolting tolerance in sugar beet genotypes. Journal of Experimental Botany **67**: 207–225

Hébrard C, Peterson DG, Willems G, Delaunay A, Jesson B, Lefèbvre M, Barnes S, Maury S (2016b) Epigenomics and bolting tolerance in sugar beet genotypes. Journal of Experimental Botany **67**: 207–225

Hébrard C, Trap-Gentil M-V, Lafon-Placette C, Delaunay A, Joseph C, Lefèbvre M, Barnes S, Maury S (2013) Identification of differentially methylated regions during vernalization revealed a role for RNA methyltransferases in bolting. Journal of Experimental Botany **64**: 651–663

Helv B, Verlaque R, Aboucaya A, alain.fridlender alain. fridlende. (2002) Les xenophytes envahissants en France: Ecologie, types biologiques et Polyploidie. doi: 10.5169/seals-74019

Henderson IR, Jacobsen SE (2007) Epigenetic inheritance in plants. Nature **447**: 418–424

Hendry AP (2016) Key Questions on the Role of Phenotypic Plasticity in Eco-Evolutionary Dynamics. J Hered **107**: 25–41

Herrera CM, Bazaga P (2013a) Epigenetic correlates of plant phenotypic plasticity: DNA methylation differs between prickly and nonprickly leaves in heterophyllous Ilex aquifolium (Aquifoliaceae) trees. Bot J Linn Soc **171**: 441–452

Herrera CM, Bazaga P (2013b) Epigenetic correlates of plant phenotypic plasticity: DNA methylation differs between prickly and nonprickly leaves in heterophyllous *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae) trees: Heterophylly and DNA Methylation. Botanical Journal of the Linnean Society **171**: 441–452

Herrera CM, Medrano M, Pérez R, Bazaga P, Alonso C (2019) Within-plant heterogeneity in fecundity and herbivory induced by localized DNA hypomethylation in the perennial herb Helleborus foetidus. American Journal of Botany **106**: 798–806

Hudson K, Luo S, Hagemann N, Preuss D (2011) Changes in Global Gene Expression in Response to Chemical and Genetic Perturbation of Chromatin Structure. PLOS ONE **6**: e20587

Huey RB, Gilchrist GW, Hendry AP (2005) Using Invasive Species to Study Evolution. 26

Hung Y-H, Liu F, Zhang X-Q, Xiao W, Hsieh T-F (2018) Chapter Five - Sexual and Non-sexual Reproduction: Inheritance and Stability of Epigenetic Variations and Consequences for Breeding Application. *In* M Mirouze, E Bucher, P Gallusci, eds, Advances in Botanical Research. Academic Press, pp 117–163

Hussner A (2012) Alien aquatic plant species in European countries. Weed Research **52**: 297–306

Hussner A (2009) Growth and photosynthesis of four invasive aquatic plant species in Europe. Weed Research **49**: 506–515

Hussner A (2010) Growth response and root system development of the invasive Ludwigia grandifl ora and Ludwigia peploides to nutrient availability and water level. Fundamental and Applied Limnology / Archiv für Hydrobiologie **177**: 189–196

-I-

Ikeda Y, Nishimura T (2015) The Role of DNA Methylation in Transposable Element Silencing and Genomic Imprinting. *In* O Pontes, H Jin, eds, Nuclear Functions in Plant Transcription, Signaling and Development. Springer New York, New York, NY, pp 13–29

Itabashi E, Osabe K, Fujimoto R, Kakizaki T (2018) Epigenetic regulation of agronomical traits in Brassicaceae. Plant Cell Rep **37**: 87–101

Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001) Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in Arabidopsis. Plant J **27**: 325–333

-J-

Johnson TB, Coghill RD (1925) RESEARCHES ON PYRIMIDINES. C111. THE DISCOVERY OF 5-METHYL-CYTOSINE IN TUBERCULINIC ACID, THE NUCLEIC ACID OF THE TUBERCLE BACILLUS [1]. J Am Chem Soc **47**: 2838–2844

Jones PA (2012) Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. Nat Rev Genet **13**: 484–492

Jong M de, Leyser O (2012) Developmental Plasticity in Plants. Cold Spring Harb Symp Quant Biol **77**: 63–73

Jullien PE, Kinoshita T, Ohad N, Berger F (2006) Maintenance of DNA Methylation during the Arabidopsis Life Cycle Is Essential for Parental Imprinting. Plant Cell **18**: 1360–1372

-K-

Kawakatsu T, Ecker J (2019) Diversity and dynamics of DNA methylation: epigenomic resources and tools for crop breeding. Breeding Science. doi: 10.1270/jsbbs.19005

Kawakatsu T, Huang S-SC, Jupe F, Sasaki E, Schmitz RJ, Urich MA, Castanon R, Nery JR, Barragan C, He Y, et al (2016) Epigenomic Diversity in a Global Collection of Arabidopsis thaliana Accessions. Cell **166**: 492–505

Keane RM, Crawley MJ (2002) Exotic plant invasions and the enemy release hypothesis. Trends in Ecology & Evolution **17**: 164–170

Kercher SM, Zedler JB (2004) Flood tolerance in wetland angiosperms: a comparison of invasive and noninvasive species. Aquatic Botany **80**: 89–102

Khan MHU, Khan SU, Muhammad A, Hu L, Yang Y, Fan C (2018) Induced mutation and epigenetics modification in plants for crop improvement by targeting CRISPR/Cas9 technology. Journal of Cellular Physiology **233**: 4578–4594

Kieber JJ, Schaller GE (2018) Cytokinin signaling in plant development. Development **145**: dev149344

Kiefer JC (2007) Epigenetics in development. Dev Dyn **236**: 1144–1156

Kingsolver J, Pfennig D, Servedio M (2002) Migration, local adaptation and the evolution of plasticity. Trends in Ecology & Evolution **17**: 540–541

Kinoshita T, Miura A, Choi Y, Kinoshita Y, Cao X, Jacobsen SE, Fischer RL, Kakutani T (2004) One-way control of FWA imprinting in Arabidopsis endosperm by DNA methylation. Science **303**: 521–523

van Kleunen M, Dawson W, Essl F, Pergl J, Winter M, Weber E, Kreft H, Weigelt P, Kartesz J, Nishino M, et al (2015) Global exchange and accumulation of non-native plants. Nature **525**: 100–103

Kleunen MV, Weber E, Fischer M (2010) A meta-analysis of trait differences between invasive and non-invasive plant species. Ecology Letters **13**: 235–245

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 Online **27**: 337–348

Kouzarides T (2007) Chromatin Modifications and Their Function. Cell **128**: 693–705

Krasensky J, Jonak C (2012) Drought, salt, and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks. J Exp Bot **63**: 1593–1608

Kremer A, Ronce O, Robledo-Arnuncio JJ, Guillaume F, Bohrer G, Nathan R, Bridle JR, Gomulkiewicz R, Klein EK, Ritland K, et al (2012) Long-distance gene flow and adaptation of forest trees to rapid climate change. Ecology Letters **15**: 378–392

Kuwabara A, Ikegami K, Koshiba T, Nagata T (2003) Effects of ethylene and abscisic acid upon heterophylly in Ludwigia arcuata (Onagraceae). Planta **217**: 880–887

-L-

Lafon-Placette C, Faivre-Rampant P, Delaunay A, Street N, Brignolas F, Maury S (2013) Methylome of DNase I sensitive chromatin in *Populus trichocarpa* shoot apical meristematic cells: a simplified approach revealing characteristics of gene-body DNA methylation in open chromatin state. New Phytologist **197**: 416–430

Lafon-Placette C, Le Gac A-L, Chauveau D, Segura V, Delaunay A, Lesage-Descauses M-C, Hummel I, Cohen D, Jesson B, Le Thiec D, et al (2018) Changes in the epigenome and transcriptome of the poplar shoot apical meristem in response to water availability affect preferentially hormone pathways. J Exp Bot **69**: 537–551

Lake JC, Leishman MR (2004) Invasion success of exotic plants in natural ecosystems: the role of disturbance, plant attributes and freedom from herbivores. Biological Conservation **117**: 215–226

Lamarque LJ, Porté AJ, Eymeric C, Lasnier J-B, Lortie CJ, Delzon S (2013) A Test for Pre-Adapted Phenotypic Plasticity in the Invasive Tree Acer negundo L. PLoS ONE **8**: e74239

Lambert E, Dutartre A, Coudreuse J, Haury J (2010) Relationships between the biomass production of invasive Ludwigia species and physical properties of habitats in France. Hydrobiologia **656**: 173–186

Lämke J, Bäurle I (2017) Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. Genome Biology. doi: 10.1186/s13059-017-1263-6

Lande R (2015) Evolution of phenotypic plasticity in colonizing species. Molecular Ecology **24**: 2038–2045

Lang-Mladek C, Popova O, Kiok K, Berlinger M, Rakic B, Aufsatz W, Jonak C, Hauser M-T, Luschnig C (2010) Transgenerational Inheritance and Resetting of Stress-Induced Loss of Epigenetic Gene Silencing in Arabidopsis. Mol Plant **3**: 594–602

Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. Nature Reviews Genetics **11**: 204–220

Laxa M, Liebthal M, Telman W, Chibani K, Dietz K-J (2019) The Role of the Plant Antioxidant System in Drought Tolerance. Antioxidants (Basel). doi: 10.3390/antiox8040094

Le Gac A-L, Lafon-Placette C, Chauveau D, Segura V, Delaunay A, Fichot R, Marron N, Le Jan I, Berthelot A, Bodineau G, et al (2018) Winter-dormant shoot apical meristem in poplar trees shows environmental epigenetic memory. Journal of Experimental Botany **69**: 4821–4837

Lebedeva MA, Tvorogova VE, Tikhodeyev ON (2017) Epigenetic mechanisms and their role in plant development. Russ J Genet **53**: 1057–1071

Lefèvre F, Fady B, Jean F, Davi H, Pichot C, Oddou-Muratorio S (2015) Les processus biologiques de réponse des arbres et forêts au changement climatique : adaptation et plasticité phénotypique. Innovations Agronomiques (47), 63-79. (2015)

Li J, Du L, Guan W, Yu F-H, van Kleunen M (2016) Latitudinal and longitudinal clines of phenotypic plasticity in the invasive herb Solidago canadensis in China. Oecologia **182**: 755–764

Li Y, Kumar S, Qian W (2018) Active DNA demethylation: mechanism and role in plant development. Plant Cell Rep **37**: 77–85

Li Z, Yu D, Xu J (2011) Adaptation to water level variation: Responses of a floating-leaved macrophyte Nymphoides peltata to terrestrial habitats. Annales de Limnologie - International Journal of Limnology **47**: 97–102

Liao C, Peng R, Luo Y, Zhou X, Wu X, Fang C, Chen J, Li B (2008) Altered ecosystem carbon and nitrogen cycles by plant invasion: a meta-analysis. New Phytologist **177**: 706–714

Liebl AL, Schrey AW, Richards CL, Martin LB (2013) Patterns of DNA Methylation Throughout a Range Expansion of an Introduced Songbird. Integrative and Comparative Biology **53**: 351–358

Liu H, Stiling P (2006) Testing the enemy release hypothesis: a review and meta-analysis. Biol Invasions **8**: 1535–1545

Liu Z, Kumari S, Zhang L, Zheng Y, Ware D (2012) Characterization of miRNAs in Response to Short-Term Waterlogging in Three Inbred Lines of Zea mays. PLoS One. doi: 10.1371/journal.pone.0039786

Lockwood JL, Cassey P, Blackburn T (2005) The role of propagule pressure in explaining species invasions. Trends Ecol Evol (Amst) **20**: 223–228

Lodge DM (1993) Biological invasions: Lessons for ecology. Trends in Ecology & Evolution **8**: 133–137

Loreti E, van Veen H, Perata P (2016) Plant responses to flooding stress. Current Opinion in Plant Biology **33**: 64–71

Lu Y, Rong T, Cao M (2008) Analysis of DNA methylation in different maize tissues. Journal of Genetics and Genomics **35**: 41–48

Luo F-L, Matsubara S, Chen Y, Wei G-W, Dong B-C, Zhang M-X, Yu F-H (2018) Consecutive submergence and de-submergence both impede growth of a riparian plant during water level fluctuations with different frequencies. Environmental and Experimental Botany **155**: 641–649

Luo W, Song F, Xie Y (2008) Trade-off between tolerance to drought and tolerance to flooding in three wetland plants. Wetlands **28**: 866–873

-M-

Marin P, Genitoni J, Barloy D, Maury S, Gibert P, Ghalambor CK, Vieira C (2019) Biological invasion: The influence of the hidden side of the (epi)genome. Funct Ecol. doi: 10.1111/1365-2435.13317

Martin-StPaul N, Delzon S, Cochard H (2017) Plant resistance to drought depends on timely stomatal closure. Ecology Letters **20**: 1437–1447

Matzek V (2012) Trait Values, Not Trait Plasticity, Best Explain Invasive Species' Performance in a Changing Environment. PLoS ONE **7**: e48821

Mauch-Mani B, Baccelli I, Luna E, Flors V (2017) Defense Priming: An Adaptive Part of Induced Resistance. Annual Review of Plant Biology **68**: 485–512

Maury S, Sow MD, Le Gac A-L, Genitoni J, Lafon-Placette C, Mozgova I (2019) Phytohormone and chromatin Crosstalk: The Missing Link For Developmental Plasticity? Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2019.00395

McCartney MA, Mallez S, Gohl DM (2019) Genome projects in invasion biology. Conserv Genet **20**: 1201–1222

Mcgregor MA, Bayne DR, Steeger JG, Webber EC, Reutebuch E (1996) The Potential for Biological Control of Water Primrose (Ludwigia grandiflora) by the Water Primrose Flea Beetle (Lysathia ludoviciana) in the Southeastern United States. J Aquat Plant Manage 3

Meerts P, Dassonville N, Vanderhoeven S, Chapuis-Lardy L, Koutika L-S, Jaquemart (2004) Les plantes exotiques envahissantes et leurs impacts. De Boeck Universités

Meijer K, Schilthuizen M, Beukeboom L, Smit C (2016) A review and meta-analysis of the enemy release hypothesis in plant–herbivorous insect systems. PeerJ **4**: e2778

Mendonça AM das C, Lira JMS, Melo NC de, Rodrigues M, Barbosa JPRAD, Mendonça AM das C, Lira JMS, Melo NC de, Rodrigues M, Barbosa JPRAD (2019) Phenotypic Plasticity of Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) Landrum Under Different Light Conditions. Floresta e Ambiente. doi: 10.1590/2179-8087.037618

Menozzi M-J (2007) Gestion des plantes envahissantes : limites techniques et innovations socio-techniques appliquées au cas des jussies. 15

Merilä J, Hendry AP (2014) Climate change, adaptation, and phenotypic plasticity: the problem and the evidence. Evolutionary Applications **7**: 1–14

Messer PW, Ellner SP, Hairston NG (2016) Can Population Genetics Adapt to Rapid Evolution? Trends in Genetics **32**: 408–418

Meyer P (2015) Epigenetic variation and environmental change: Fig. 1. Journal of Experimental Botany **66**: 3541–3548

Monty A, Mahy G (2009) Evolution des traits d'histoire de vie lors des invasions végétales. Biotechnologie, Agronomie, Société et Environnement 13:

Morris MRJ (2014) Plasticity-Mediated Persistence in New and Changing Environments. International Journal of Evolutionary Biology **2014**: 1–18

Mundim FM, Pringle EG (2018) Whole-Plant Metabolic Allocation Under Water Stress. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2018.00852

Murren CJ, Auld JR, Callahan H, Ghalambor CK, Handelsman CA, Heskel MA, Kingsolver JG, Maclean HJ, Masel J, Maughan H, et al (2015) Constraints on the evolution of phenotypic plasticity: limits and costs of phenotype and plasticity. Heredity **115**: 293–301

-N-

Nakayama H, Sinha NR, Kimura S (2017) How Do Plants and Phytohormones Accomplish Heterophylly, Leaf Phenotypic Plasticity, in Response to Environmental Cues. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2017.01717

Nehring S, Kolthoff D (2011) The invasive water primrose *Ludwigia grandiflora* (Michaux) Greuter & Burdet (Spermatophyta: Onagraceae) in Germany: First record and ecological risk assessment. AI **6**: 83–89

Nicotra AB, Atkin OK, Bonser SP, Davidson AM, Finnegan EJ, Mathesius U, Poot P, Purugganan MD, Richards CL, Valladares F, et al (2010) Plant phenotypic plasticity in a changing climate. Trends in Plant Science **15**: 684–692

Niederhuth CE, Bewick AJ, Ji L, Alabady MS, Kim KD, Li Q, Rohr NA, Rambani A, Burke JM, Udall JA, et al (2016) Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms. Genome Biology **17**: 194

Niederhuth CE, Schmitz RJ (2017) Putting DNA methylation in context: from genomes to gene expression in plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms **1860**: 149–156

Nogales M, Vidal E, Medina FM, Bonnaud E, Tershy BR, Campbell KJ, Zavaleta ES (2013) Feral Cats and Biodiversity Conservation: The Urgent Prioritization of Island Management. BioScience **63**: 804–810

Noman A, Aqeel M, He S (2016) CRISPR-Cas9: Tool for Qualitative and Quantitative Plant Genome Editing. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2016.01740

Norgaard KM (2007) The Politics of Invasive Weed Management: Gender, Race, and Risk Perception in Rural California*. Rural Sociology **72**: 450–477

-O-

Oduor AMO, Leimu R, van Kleunen M (2016) Invasive plant species are locally adapted just as frequently and at least as strongly as native plant species. Journal of Ecology **104**: 957–968

Ojolo SP, Cao S, Priyadarshani SVGN, Li W, Yan M, Aslam M, Zhao H, Qin Y (2018) Regulation of Plant Growth and Development: A Review From a Chromatin Remodeling Perspective. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2018.01232

Osakabe Y, Osakabe K, Shinozaki K, Tran L-SP (2014) Response of plants to water stress. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2014.00086

Ossowski S, Schneeberger K, Lucas-Lledo JI, Warthmann N, Clark RM, Shaw RG, Weigel D, Lynch M (2010) The Rate and Molecular Spectrum of Spontaneous Mutations in Arabidopsis thaliana. Science **327**: 92–94

Ou X, Zhang Y, Xu C, Lin X, Zang Q, Zhuang T, Jiang L, Wettstein D von, Liu B (2012) Transgenerational Inheritance of Modified DNA Methylation Patterns and Enhanced Tolerance Induced by Heavy Metal Stress in Rice (Oryza sativa L.). PLOS ONE **7**: e41143

-P-

Pajoro A, Severing E, Angenent GC, Immink RGH (2017) Histone H3 lysine 36 methylation affects temperature-induced alternative splicing and flowering in plants. Genome Biology. doi: 10.1186/s13059-017-1235-x

Palacio-López K, Gianoli E (2011) Invasive plants do not display greater phenotypic plasticity than their native or non-invasive counterparts: a meta-analysis. Oikos **120**: 1393–1401

Palmer AR (2012) Developmental Plasticity and the Origin of Novel Forms: Unveiling Cryptic Genetic Variation Via"Use and Disuse." Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution **318**: 466–479

Pandit MK, Tan HTW, Bisht MS (2006) Polyploidy in invasive plant species of Singapore. Bot J Linn Soc **151**: 395–403

Parisod C, Salmon A, Zerjal T, Tenaillon M, Grandbastien M-A, Ainouche M (2009) Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in Spartina. New Phytologist **184**: 1003–1015

Paun O, Bateman RM, Fay MF, Hedrén M, Civeyrel L, Chase MW (2010) Stable Epigenetic Effects Impact Adaptation in Allopolyploid Orchids (Dactylorhiza: Orchidaceae). Mol Biol Evol **27**: 2465–2473

Paux E, Roger D, Badaeva E, Gay G, Bernard M, Sourdille P, Feuillet C (2006) Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. The Plant Journal **48**: 463–474

Pearson DE, Ortega YK, Villarreal D, Lekberg Y, Cock MC, Eren Ö, Hierro JL (2018) The fluctuating resource hypothesis explains invasibility, but not exotic advantage following disturbance. Ecology **99**: 1296–1305

Pejchar L, Mooney HA (2009) Invasive species, ecosystem services and human well-being. Trends in Ecology & Evolution **24**: 497–504

Peleg Z, Reguera M, Tumimbang E, Walia H, Blumwald E (2011) Cytokinin-mediated source/sink modifications improve drought tolerance and increase grain yield in rice under water-stress. Plant Biotechnol J **9**: 747–758

Pfennig DW, Wund MA, Snell-Rood EC, Cruickshank T, Schlichting CD, Moczek AP (2010) Phenotypic plasticity's impacts on diversification and speciation. Trends in Ecology & Evolution **25**: 459–467

Piersma T, Drent J (2003) Phenotypic flexibility and the evolution of organismal design. Trends in Ecology & Evolution **18**: 228–233

Pigliucci M (2006) Phenotypic plasticity and evolution by genetic assimilation. Journal of Experimental Biology **209**: 2362–2367

Pigliucci M, Pigliucci P of E and ED of BM (2001) Phenotypic Plasticity: Beyond Nature and Nurture. JHU Press

Pikaard CS, Mittelsten Scheid O (2014) Epigenetic Regulation in Plants. Cold Spring Harb Perspect Biol. doi: 10.1101/cshperspect.a019315

Pimentel D, McNair S, Janecka J, Wightman J, Simmonds C, O'Connell C, Wong E, Russel L, Zern J, Aquino T, et al (2001) Economic and environmental threats of alien plant, animal, and microbe invasions. 20

Pitelka LF, Group PMW (1997) Plant Migration and Climate Change: A more realistic portrait of plant migration is essential to predicting biological responses to global warming in a world drastically altered by human activity. American Scientist **85**: 464–473

Pompeiano A, Huarancca Reyes T, Moles TM, Guglielminetti L, Scartazza A (2019) Photosynthetic and Growth Responses of Arundo donax L. Plantlets Under Different Oxygen Deficiency Stresses and Reoxygenation. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2019.00408

Prentis PJ, Wilson JRU, Dormontt EE, Richardson DM, Lowe AJ (2008) Adaptive evolution in invasive species. Trends in Plant Science **13**: 288–294

Price TD, Qvarnström A, Irwin DE (2003) The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. Proceedings of the Royal Society of London Series B: Biological Sciences **270**: 1433–1440

Puy J, Dvořáková H, Carmona CP, Bello F de, Hiiesalu I, Latzel V (2018) Improved demethylation in ecological epigenetic experiments: Testing a simple and harmless foliar demethylation application. Methods in Ecology and Evolution **9**: 744–753

Pyšek P, Richardson D (2010) Invasive Species, Environmental Change and Management, and Health. Annual Review of Environment and Resources. doi: 10.1146/annurev-environ-033009-095548

Pyšek P, Richardson D (2007) Traits Associated with Invasiveness in Alien Plants: Where Do we Stand? Ecol Stu. pp 97–125

-Q-

Quadrana L, Colot V (2016) Plant Transgenerational Epigenetics. Annual Review of Genetics **50**: 467–491

-R-

Rejmánek M (2000) Invasive plants: approaches and predictions. Austral Ecology **25**: 497–506

Rejmanek M, Pitcairn M (2002) When is eradication of exotic pest plants a realistic goal? Turning the Tide: The Eradication of Invasive Species. pp 249–253

Rejmanek M, Richardson DM (1996) What Attributes Make Some Plant Species More Invasive? Ecology **77**: 1655–1661

Rey O, Danchin E, Mirouze M, Loot C, Blanchet S (2016) Adaptation to Global Change: A Transposable Element–Epigenetics Perspective. Trends in Ecology & Evolution **31**: 514–526

Ricciardi A, Blackburn TM, Carlton JT, Dick JTA, Hulme PE, Iacarella JC, Jeschke JM, Liebhold AM, Lockwood JL, MacIsaac HJ, et al (2017) Invasion Science: A Horizon Scan of Emerging Challenges and Opportunities. Trends in Ecology & Evolution **32**: 464–474

Ricciardi A, Ryan R (2018) Invasive species denialism revisited: response to Sagoff. Biol Invasions **20**: 2731–2738

Richards CL, Alonso C, Becker C, Bossdorf O, Bucher E, Colomé-Tatché M, Durka W, Engelhardt J, Gaspar B, Gogol-Döring A, et al (2017) Ecological plant epigenetics: Evidence from model and non-model species, and the way forward. Ecol Lett **20**: 1576–1590

Richards CL, Bossdorf O, Muth NZ, Gurevitch J, Pigliucci M (2006) Jack of all trades, master of some? On the role of phenotypic plasticity in plant invasions. Ecology Letters **9**: 981–993

Richards CL, Bossdorf O, Pigliucci M (2010) What Role Does Heritable Epigenetic Variation Play in Phenotypic Evolution? BioScience **60**: 232–237

Richards CL, Schrey AW, Pigliucci M (2012) Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation. Ecology Letters **15**: 1016–1025

Ris N (2003) Hétérogénéité spatiale, plasticité phénotypique et trade-off environnementaux : rôle de l'espèce hôte et de la température dans la différenciation génétique des populations du parasitoïde Leptopilina heterotoma (Hymenoptera). thesis. Lyon 1

Rodrigues JA, Zilberman D (2015) Evolution and function of genomic imprinting in plants. Genes Dev **29**: 2517–2531

Rogers K, Chen X (2013) Biogenesis, turnover, and mode of action of plant microRNAs. Plant Cell **25**: 2383–2399

Ronce O (2007) How Does It Feel to Be Like a Rolling Stone? Ten Questions About Dispersal Evolution. Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics **38**: 231–253

Ronce O, Boyen C, Caillon S, Charmantier A, Olivier Cheptou P, Chuine I, Cormier Salem M, Cuypers L, Davi H, Devaux C, et al (2015) Réponses et adaptations aux changements globaux : quels enjeux pour la recherche sur la biodiversité ? Prospective de recherche.

Ronemus MJ, Galbiati M, Ticknor C, Chen J, Dellaporta SL (1996) Demethylation-induced developmental pleiotropy in Arabidopsis. Science **273**: 654–657

Roques A, Rousselet J, Avcı M, Avtzis DN, Basso A, Battisti A, Ben Jamaa ML, Bensidi A, Berardi L, Berretima W, et al (2015) Climate Warming and Past and Present Distribution of the Processionary Moths (Thaumetopoea spp.) in Europe, Asia Minor and North Africa. *In* A Roques, ed, Processionary Moths and Climate Change : An Update. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 81–161

Roudier F, Teixeira FK, Colot V (2009) Chromatin indexing in Arabidopsis: an epigenomic tale of tails and more. Trends in Genetics **25**: 511–517

Ruaux B (2008) Les plantes envahissantes des corridors fluviaux : traits biologiques, impacts de Ludwigia péploides et L.grandiflora en Loire moyenne et implications pour la gestion. thesis. Tours

Ruaux B, Greulich S, Haury J, Berton J-P (2009) Sexual reproduction of two alien invasive Ludwigia (Onagraceae) on the middle Loire River, France. Aquatic Botany **90**: 143–148

-S-

Sagoff M (2018) Invasive species denialism: a reply to Ricciardi and Ryan. Biol Invasions **20**: 2723–2729

Sasidharan R, Hartman S, Liu Z, Martopawiro S, Sajeev N, Veen H van, Yeung E, Voesenek LACJ (2018) Signal Dynamics and Interactions during Flooding Stress. Plant Physiology **176**: 1106–1117

Schield DR, Walsh MR, Card DC, Andrew AL, Adams RH, Castoe TA (2016) EpiRADseq: scalable analysis of genomewide patterns of methylation using next-generation sequencing. Methods in Ecology and Evolution **7**: 60–69

Schlaepfer DR, Glättli M, Fischer M, Kleunen M van (2010) A multi-species experiment in their native range indicates pre-adaptation of invasive alien plant species. New Phytologist **185**: 1087–1099

Schmid MW, Heichinger C, Coman Schmid D, Guthörl D, Gagliardini V, Bruggmann R, Aluri S, Aquino C, Schmid B, Turnbull LA, et al (2018) Contribution of epigenetic variation to adaptation in Arabidopsis. Nature Communications. doi: 10.1038/s41467-018-06932-5

Schmidt JP, Drake JM (2011) Why Are Some Plant Genera More Invasive Than Others? PLOS ONE **6**: e18654

Schrader L, Kim JW, Ence D, Zimin A, Klein A, Wyschetzki K, Weichselgartner T, Kemena C, Stökl J, Schultner E, et al (2014) Transposable element islands facilitate adaptation to novel environments in an invasive species. Nature Communications **5**: 5495

Schübeler D (2015) Function and information content of DNA methylation. Nature **517**: 321–6

Seebens H, Essl F, Dawson W, Fuentes N, Moser D, Pergl J, Pyšek P, van Kleunen M, Weber E, Winter M, et al (2015) Global trade will accelerate plant invasions in emerging economies under climate change. Global Change Biology **21**: 4128–4140

Serrato-Capuchina A, Matute DR (2018) The Role of Transposable Elements in Speciation. Genes (Basel). doi: 10.3390/genes9050254

Sexton JP, MCKay JK, Sala A (2002) Plasticity and genetic diversity may allow saltcedar to invade cold climates in North America. Ecological Applications **12**: 9

Seymour DK, Becker C (2017) The causes and consequences of DNA methylome variation in plants. Current Opinion in Plant Biology **36**: 56–63

Shaar-Moshe L, Hayouka R, Roessner U, Peleg Z (2019) Phenotypic and metabolic plasticity shapes life-history strategies under combinations of abiotic stresses. Plant Direct **3**: e00113

Shi W, Chen X, Gao L, Xu C-Y, Ou X, Bossdorf O, Yang J, Geng Y (2019) Transient Stability of Epigenetic Population Differentiation in a Clonal Invader. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2018.01851

Shrestha R, Gómez-Ariza J, Brambilla V, Fornara F (2014) Molecular control of seasonal flowering in rice, arabidopsis and temperate cereals. Ann Bot **114**: 1445–1458

Simberloff D (2003) Confronting introduced species: a form of xenophobia? Biological Invasions **5**: 179–192

Simonet G (2009) Le concept d'adaptation : polysémie interdisciplinaire et implication pour les changements climatiques, Abstract. Natures Sciences Sociétés **17**: 392–401

Soltis PS, Soltis DE (2000) The role of genetic and genomic attributes in the success of polyploids. PNAS **97**: 7051–7057

Song J, Angel A, Howard M, Dean C (2012a) Vernalization - a cold-induced epigenetic switch. J Cell Sci **125**: 3723–3731

Song Y, Ji D, Li S, Wang P, Li Q, Xiang F (2012b) The Dynamic Changes of DNA Methylation and Histone Modifications of Salt Responsive Transcription Factor Genes in Soybean. PLOS ONE **7**: e41274

Sow MD, Allona I, Ambroise C, Conde D, Fichot R, Gribkova S, Jorge V, Le-Provost G, Pâques L, Plomion C, et al (2018a) Epigenetics in Forest Trees: State of the Art and Potential Implications for Breeding and Management in a Context of Climate Change. Advances in Botanical Research. doi: 10.1016/bs.abr.2018.09.003

Sow MD, Segura V, Chamaillard S, Jorge V, Delaunay A, Lafon-Placette C, Fichot R, Faivre-Rampant P, Villar M, Brignolas F, et al (2018b) Narrow-sense heritability and PST estimates of DNA methylation in three Populus nigra L. populations under contrasting water availability. Tree Genetics & Genomes **14**: 78

Specchia V, Pinna M (2017) The Potential Link between Mobile DNA and the Invasiveness of the Species. OPEN ACCESS **13**: 5

Spens AE, Douhovnikoff V (2016) Epigenetic variation within Phragmites australis among lineages, genotypes, and ramets. Biological Invasions **18**: 2457–2462

Springer NM, Schmitz RJ (2017) Exploiting induced and natural epigenetic variation for crop improvement. Nature Reviews Genetics **18**: 563–575

Stapley J, Feulner PGD, Johnston SE, Santure AW, Smadja CM (2017) Variation in recombination frequency and distribution across eukaryotes: patterns and processes. Philos Trans R Soc Lond, B, Biol Sci. doi: 10.1098/rstb.2016.0455

Stapley J, Santure AW, Dennis SR (2015) Transposable elements as agents of rapid adaptation may explain the genetic paradox of invasive species. Molecular Ecology **24**: 2241–2252

Steffens B, Rasmussen A (2016) The Physiology of Adventitious Roots. Plant Physiology **170**: 603–617

Stiers I, Coussement K, Triest L (2014) The invasive aquatic plant *Ludwigia grandiflora* affects pollinator visitants to a native plant at high abundances. Aquatic Invasions **9**: 357–367

Stinson KA, Campbell SA, Powell JR, Wolfe BE, Callaway RM, Thelen GC, Hallett SG, Prati D, Klironomos JN (2006) Invasive Plant Suppresses the Growth of Native Tree Seedlings by Disrupting Belowground Mutualisms. PLoS Biol **4**: e140

Suzuki M, Liao W, Wos F, Johnston AD, DeGrazia J, Ishii J, Bloom T, Zody MC, Germer S, Greally JM (2018) Whole-genome bisulfite sequencing with improved accuracy and cost. Genome Res **28**: 1364–1371

Szabó S, Peeters ETHM, Várbíró G, Borics G, Lukács BA (2019) Phenotypic plasticity as a clue for invasion success of the submerged aquatic plant Elodea nuttallii. Plant Biology **21**: 54–63

-T-

Ta J, Anderson LWJ, Christman MA, Khanna S, Kratville D, Madsen JD, Moran PJ, Viers JH (2017) Invasive Aquatic Vegetation Management in the Sacramento–San Joaquin River Delta: Status and Recommendations. San Francisco Estuary and Watershed Science 15:

Taylor SH, Ripley BS, Woodward FI, Osborne CP (2011) Drought limitation of photosynthesis differs between C3 and C4 grass species in a comparative experiment. Plant, Cell & Environment **34**: 65–75

Theoharides KA, Dukes JS (2007) Plant invasion across space and time: factors affecting nonindigenous species success during four stages of invasion. New Phytologist **176**: 256–273

Thiebaut F, Hemerly AS, Ferreira PCG (2019) A Role for Epigenetic Regulation in the Adaptation and Stress Responses of Non-model Plants. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2019.00246

Thiébaut G, Thouvenot L, Rodríguez-Pérez H (2018) Allelopathic Effect of the Invasive Ludwigia hexapetala on Growth of Three Macrophyte Species. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2018.01835

Thouvenot L (2012) Stratégies de réponse de l'espèce invasive *Ludwigia grandiflora* aux contraintes environnementales.

Thouvenot L, Haury J, Thiébaut G (2013a) Seasonal plasticity of *Ludwigia grandiflora* under light and water depth gradients: An outdoor mesocosm experiment. Flora - Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants **208**: 430–437

Thouvenot L, Puech C, Martinez L, Haury J, Thiébaut G (2013b) Strategies of the invasive macrophyte *Ludwigia grandiflora* in its introduced range: Competition, facilitation or coexistence with native and exotic species? Aquatic Botany **107**: 8–16

Tian Y, Zheng H, Zhang F, Wang S, Ji X, Xu C, He Y, Ding Y (2019) PRC2 recruitment and H3K27me3 deposition at FLC require FCA binding of COOLAIR. Science Advances **5**: eaau7246

Tóth VR, Villa P, Pinardi M, Bresciani M (2019) Aspects of Invasiveness of Ludwigia and Nelumbo in Shallow Temperate Fluvial Lakes. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2019.00647

Trap-Gentil M-V, Hébrard C, Lafon-Placette C, Delaunay A, Hagège D, Joseph C, Brignolas F, Lefebvre M, Barnes S, Maury S (2011) Time course and amplitude of DNA methylation in the shoot apical meristem are critical points for bolting induction in sugar beet and bolting tolerance between genotypes. J Exp Bot **62**: 2585–2597

Traveset A, Richardson DM (2006) Biological invasions as disruptors of plant reproductive mutualisms. Trends Ecol Evol (Amst) **21**: 208–216

Tricker PJ (2015) Transgenerational inheritance or resetting of stress-induced epigenetic modifications: two sides of the same coin. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2015.00699

Trussell GC, Smith LD (2000) Induced defenses in response to an invading crab predator: An explanation of historical and geographic phenotypic change. Proceedings of the National Academy of Sciences **97**: 2123–2127

-U-

Uga Y, Kitomi Y, Ishikawa S, Yano M (2015) Genetic improvement for root growth angle to enhance crop production. Breeding Science **65**: 111–119

-V-

Valladares F, Sanchez-Gomez D, Zavala MA (2006) Quantitative estimation of phenotypic plasticity: bridging the gap between the evolutionary concept and its ecological applications. Journal of Ecology **94**: 1103–1116

Vanden Broeck A, Cox K, Brys R, Castiglione S, Cicatelli A, Guarino F, Heinze B, Steenackers M, Vander Mijnsbrugge K (2018) Variability in DNA Methylation and Generational Plasticity in the Lombardy Poplar, a Single Genotype Worldwide Distributed Since the Eighteenth Century. Front Plant Sci. doi: 10.3389/fpls.2018.01635

Vilà M, D'Antonio CM (1998) Fruit Choice and Seed Dispersal of Invasive Vs. Noninvasive Carpobrotus (aizoaceae) in Coastal California. Ecology **79**: 1053–1060

Vilà M, Espinar JL, Hejda M, Hulme PE, Jarošík V, Maron JL, Pergl J, Schaffner U, Sun Y, Pyšek P (2011) Ecological impacts of invasive alien plants: a meta-analysis of their effects on species, communities and ecosystems: Ecological impacts of invasive alien plants. Ecology Letters **14**: 702–708

Vining KJ, Pomraning KR, Wilhelm LJ, Priest HD, Pellegrini M, Mockler TC, Freitag M, Strauss SH (2012) Dynamic DNA cytosine methylation in the Populus trichocarpa genome: tissue-level variation and relationship to gene expression. BMC Genomics **13**: 27

Vogt G (2017) Facilitation of environmental adaptation and evolution by epigenetic phenotype variation: insights from clonal, invasive, polyploid, and domesticated animals. Environmental Epigenetics. doi: 10.1093/eep/dvx002

-W-

Wakeel A, Ali I, Khan AR, Wu M, Upreti S, Liu D, Liu B, Gan Y (2018) Involvement of histone acetylation and deacetylation in regulating auxin responses and associated phenotypic changes in plants. Plant Cell Reports **37**: 51–59

Wang R, Wang Y-Z (2006) Invasion dynamics and potential spread of the invasive alien plant species Ageratina adenophora (Asteraceae) in China. Diversity and Distributions **12**: 397–408

Wang Z, Li G, Sun H, Ma L, Guo Y, Zhao Z, Gao H, Mei L (2018) Effects of drought stress on photosynthesis and photosynthetic electron transport chain in young apple tree leaves. Biology Open **7**: bio035279

Wanke D (2011) The ABA-mediated switch between submersed and emersed life-styles in aquatic macrophytes. Journal of Plant Research **124**: 467–475

Wasaya A, Zhang X, Fang Q, Yan Z (2018) Root Phenotyping for Drought Tolerance: A Review. Agronomy **8**: 241

Wasson A, Richards R, Chatrath R, Misra S, Sakuru S, Rebetzke G, Kirkegaard J, Christopher J, Watt M (2012) Traits and selection strategies to improve root systems and water uptake in water-limited wheat crops. Journal of experimental botany **63**: 3485–98

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 N, Cronn R, Liston A, Ashman T-L (2019) Functional trait divergence and trait plasticity confer polyploid advantage in heterogeneous environments. New Phytologist **221**: 2286–2297

Weinhold A (2018) Transgenerational stress-adaption: an opportunity for ecological epigenetics. Plant Cell Reports **37**: 3–9

West-Eberhard MJ (2005) Phenotypic accommodation: adaptive innovation due to developmental plasticity. Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution **304B**: 610–618

Whittaker C, Dean C (2017) The FLC Locus: A Platform for Discoveries in Epigenetics and Adaptation. Annu Rev Cell Dev Biol **33**: 555–575

Wibowo A, Becker C, Marconi G, Durr J, Price J, Hagmann J, Papareddy R, Putra H, Kageyama J, Becker J, et al (2016) Hyperosmotic stress memory in Arabidopsis is mediated by distinct epigenetically labile sites in the genome and is restricted in the male germline by DNA glycosylase activity. eLife. doi: 10.7554/eLife.13546

Widman N, Feng S, Jacobsen SE, Pellegrini M (2014) Epigenetic differences between shoots and roots in Arabidopsis reveals tissue-specific regulation. Epigenetics **9**: 236–242

Williamson M, Fitter A (1996) The Varying Success of Invaders. Ecology **77**: 1661–1666

Winter M, Schweiger O, Klotz S, Nentwig W, Andriopoulos P, Arianoutsou M, Basnou C, Delipetrou P, Didžiulis V, Hejda M, et al (2009) Plant extinctions and introductions lead to phylogenetic and taxonomic homogenization of the European flora. PNAS **106**: 21721–21725

Wong MM, Chong GL, Verslues PE (2017) Epigenetics and RNA Processing: Connections to Drought, Salt, and ABA? *In* R Sunkar, ed, Plant Stress Tolerance. Springer New York, New York, NY, pp 3–21

-X-

Xiao J, Jin R, Wagner D (2017) Developmental transitions: integrating environmental cues with hormonal signaling in the chromatin landscape in plants. Genome Biology **18**: 88

-Y-

Yamada M, Morishita H, Urano K, Shiozaki N, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Yoshiba Y (2005) Effects of free proline accumulation in petunias under drought stress. Journal of Experimental Botany **56**: 1975–1981

Yamamuro C, Zhu J-K, Yang Z (2016) Epigenetic Modifications and Plant Hormone Action. Molecular Plant **9**: 57–70

Yang J, Zhang J, Liu K, Wang Z, Liu L (2007) Involvement of polyamines in the drought resistance of rice. Journal of Experimental Botany **58**: 1545–1555

Yeung E, Bailey-Serres J, Sasidharan R (2019) After The Deluge: Plant Revival Post-Flooding. Trends in Plant Science **24**: 443–454

Yeung E, Veen H van, Vashisht D, Paiva ALS, Hummel M, Rankenberg T, Steffens B, Steffen-Heins A, Sauter M, Vries M de, et al (2018) A stress recovery signaling network for enhanced flooding tolerance in Arabidopsis thaliana. PNAS **115**: E6085–E6094

Yona AH, Frumkin I, Pilpel Y (2015) A Relay Race on the Evolutionary Adaptation Spectrum. Cell **163**: 549–559

Yordanov I, Velikova V, Tsonev T (2000) Plant Responses to Drought, Acclimation, and Stress Tolerance. Photosynthetica **38**: 171–186

You J, Zhang Y, Liu A, Li D, Wang X, Dossa K, Zhou R, Yu J, Zhang Y, Wang L, et al (2019) Transcriptomic and metabolomic profiling of drought-tolerant and susceptible sesame genotypes in response to drought stress. BMC Plant Biology **19**: 267

Younginger BS, Sirová D, Cruzan MB, Ballhorn DJ (2017) Is biomass a reliable estimate of plant fitness? Applications in Plant Sciences **5**: 1600094

Yung PYK, Elsässer SJ (2017) Evolution of epigenetic chromatin states. Current Opinion in Chemical Biology **41**: 36–42

-Z-

Zedler J, Kercher S, Professor R, Schierenbeck K (2004) Causes and Consequences of Invasive Plants in Wetlands: Opportunities, Opportunists, and Outcomes. Critical Reviews in Plant Sciences **23**: 431–452

Zehnsdorf A, Hussner A, Eismann F, Rönicke H, Melzer A (2015) Management options of invasive Elodea nuttallii and Elodea canadensis. Limnologica **51**: 110–117

Zhang H, Lang Z, Zhu J-K (2018) Dynamics and function of DNA methylation in plants. Nature Reviews Molecular Cell Biology **19**: 489

Zhang S-W, Li C-H, Cao J, Zhang Y-C, Zhang S-Q, Xia Y-F, Sun D-Y, Sun Y (2009) Altered architecture and enhanced drought tolerance in rice via the down-regulation of indole-3-acetic acid by TLD1/OsGH3.13 activation. Plant Physiol **151**: 1889–1901

Zhang Y-Y, Fischer M, Colot V, Bossdorf O (2013) Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. New Phytologist **197**: 314–322

Zheng X, Hou H, Zhang H, Yue M, Hu Y, Li L (2018) Histone acetylation is involved in GA-mediated 45S rDNA decondensation in maize aleurone layers. Plant Cell Reports **37**: 115–123

Zhong S, Fei Z, Chen Y-R, Zheng Y, Huang M, Vrebalov J, McQuinn R, Gapper N, Liu B, Xiang J, et al (2013) Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. Nature Biotechnology **31**: 154–159

Zhu J, Brown KM, Lynch JP (2010) Root cortical aerenchyma improves the drought tolerance of maize (Zea mays L.). Plant Cell Environ **33**: 740–749

Ziller MJ, Hansen KD, Meissner A, Aryee MJ (2015) Coverage recommendations for methylation analysis by whole genome bisulfite sequencing. Nat Methods **12**: 230–232

Annexes

Annexe 1 : liste des espèces invasives préoccupantes en Europe d'après le centre de ressources espèces exotiques envahissantes et l'agence française pour la biodiversité (UICN0) (en date du 25 juillet 2019)

Plantes aquatiques

Cabomba caroliniana – Eventail de Caroline

Elodea nuttalii - Elodée de Nuttall

Eichhornia crassipes - Jacinthe d'eau

Hydrocotyle ranunculoides - Hydrocotyle fausse-renoncule

Lagarosiphon major – Grand Lagarosiphon

Ludwigia grandiflora - Jussie à grandes fleurs

Ludwigia peploides - Jussie rampante

Myriophyllum aquaticum- Myriophylle du Brésil

Myriophyllum heterophyllum - Myriophylle hétérophylle

Salvinia molesta - Salvinie géante

Plantes terrestres

Acacia saligna - Acacia à feuilles de Saule

Ailanthus altissima - Ailante glanduleux

Alternanthera philoxeroides - Herbe à alligator

Andropogon virginicus

Asclepia syriaca - Asclépiade de Syrie

Baccharis halimifolia – Baccharis à feuilles d'arroche

Cardiospermum grandiflorum

Cortaderia jubata

Ehrharta calycina

Gunnera tinctoria - Gunnère du Brésil

Gymnocoronis spilanthoides

Heracleum mantegazzianum - Berce du Caucase

Heracleum persicum - Berce de Perse

Heracleum sosnowskyi - Berce de Sosnowsky

Humulus scandens - Houblon du Japon
Parthenium hysterophorus - Fausse camomille
Impatiens glandulifera - Balsamine de l'Himalaya
Lespedeza cuneata - Lespedeza de Chine
Lysichiton americanus - Faux-arum
Lygodium japonicum
Microstegium vimeneum
Polygonum perfoliatum - Renouée perfoliée
Pueraria montana var. lobata - Kudzu
Pennisetum setaceum
Prosopis juliflora - Prosopis
Triadica sebifera
Invertébrés
Arthurdenduys triangulatus
Eriocheir sinensis - Crabe chinois
Orconectes limosus - Écrevisse américaine
Orconectes virilis - Écrevisse à pinces bleues
Pacifastacus leniusculus - Écrevisse de Californie
Procambarus clarkii - Écrevisse de Louisiane
Procambarus cf fallax - Écrevisse marbrée
Vespa velutina nigrithorax - Frelon asiatique
Poissons
Lepomis gibbosus - Perche soleil
Perccottus glenii - Goujon de l'Amour
Plotosus lineatus - Poisson chat rayé
Pseudorasbora parva - Pseudorasbora
Reptiles et amphibiens
Lithobates (Rana) catesbeianus - Grenouille taureau

Trachemys scripta - Tortue de Floride

Oiseaux

Acridotheres tristis - Martin triste

Alopochen aegyptiacus - Ouette d'Egypte

Corvus splendens - Corbeau familier

Oxyura jamaicensis - Erismature rousse

Threskiornis aethiopicus - Ibis sacré

Mammifères

Callosciurus erythraeus - Écureuil de Pallas

Herpestes javanicus - Maugouste de Java

Muntiacus reevesii - Muntjac

Myocastor coypus - Ragondin

Nasua nasua - Coati

Nyctereutes procyonides - Chien viverrin

Procyon lotor - Raton laveur

Ondatra zibethicus - Rat musqué

Sciurus carolinensis - Écureuil gris

Sciurus niger - Écureuil fauve

Tamias sibiricus - Écureuil de Corée

Annexe 2 : Présentation et description générale de l'espèce *Ludwigia grandiflora* (Rapport : stratégie nationale de gestion relative aux jussies exotiques, 2019).

Ludwigia grandiflora (Michaux) Greuter et Burdet, 1987 & *Ludwigia peploides* (Kunth) P.H. Raven, 1963	
Classification	
Plante vasculaire aquatique, Magnoliopsida, Myrtales, Onagraceae Noms vernaculaires : *L. grandiflora* : Ludwigie/Jussie à grandes fleurs, grande Jussie *L. peploides* : Ludwigie/Jussie faux-pourpier, Ludwigie/Jussie fausse péplide, Jussie rampante, Jussie à petites fleurs Principaux synonymes : *L. grandiflora* : *Adenola grandiflora, Jussiaea grandiflora, Jussiaea michauxiana, Jussiaea repens sensu, Jussiaea repens* subsp. Grandiflora*, Jussiaea uruguayensis, Ludwigia uruguayensis, Ludwigia hexapetala.* *L. peploides* : *Jussiaea californica, Jussiaea fluitans, Jussiaea gomezii, Jussiaea patibilcensis, Jussiaea peploides, Jussiaea polygonoides, Jussiaea ramulosa, Ludwigia ramulosa, Jussiaea repens* var. californica , *Jussiaea repens* var. peploides, *Ludwigia clavellina* var. peploides	
Description physique	
Cycle de vie	Herbacée hydrophyte amphibie pérenne
Taille	Jusqu'à 3 m de profondeur et émergeante jusqu'à 80 cm au-dessus de la surface Formes terrestres de plus petite taille (moins de 1 m en longueur cumulée des tiges)
Floraison	*L. grandiflora* : Fleur jaune à 5 (parfois 6) pétales recouvrants, de 4 à 6 cm *L. peploides* : Fleur jaune à 5 pétales disjoints, de 2 à 3 cm Floraison de juin à septembre
Fructification	Capsules cylindriques (pubescentes chez *L .grandiflora*) de 13-25 mm de long, portées par un pédicelle
Risque de confusion	Confusion possible entre les deux espèces mais également avec la jussie indigène (*Ludwigia palustris*) En l'absence de fleurs, possible confusion avec *Persicaria amphibia* et *Myosotis scorpiodes*
Distribution	
Répartition d'origine	*L. grandiflora* : Amérique du Sud *L. peploides* : Amérique ?
Répartition d'introduction (Europe uniquement)	Les deux espèces : Belgique, Espagne, France, Italie, Pays-Bas, Royaume-Uni *L. grandiflora* uniquement : Allemagne, Irlande, Suisse, Hongrie

	L. peploides uniquement : Grèce
Apparition en nature en France	Le Lez, 1820-1830
Statut de répartition en France / État d'implantation en France	Largement répandue, surtout dans le bassin de la Loire et du Rhône
Voies d'introduction	
Entrées humaines volontaires	Plante ornementale d'aquariophilie
Entrées humaines involontaires	Activité d'extraction et de curage des cours d'eau
Entrées naturelles frontalières	Cours d'eau
Établissement	
Climat	Présentes dans les climats tempéré, atlantique et méditerranéen ; les parties submergées ou enterrées de la plante ainsi que ses rhizomes parviennent à survivre au gel hivernal
Habitats en France	Eaux à faible débit (rivières et ruisseaux) ; étangs et lacs naturels ; canaux et voies navigables ; lacs et cours d'eau secondaires ; étangs et lacs artificiels ; zones humides permanentes ou temporaires ; fossés et réseaux de fossés ; prairies humides
Conditions abiotiques	Préfèrent les eaux très ensoleillées stagnantes ou faiblement courante ; tolérantes à un large éventail de conditions en terme d'éléments nutritifs, de substrat, de pH et de qualité d'eau ; préfère les milieux riches en nutriments ; faible tolérance à la salinité
Conditions biotiques	Plante entomogames mais pollinisation non-essentielle au maintien d'une population
Modifications anthropiques favorisant l'établissement et la propagation	Propagation de l'espèce par les activités d'extraction et de curage ; Dispersion par les activités anthropiques et pratiques aquacoles
Traits de vie	
Description	Conséquences
Reproduction végétative fragmentation des tiges	Forte capacité de dispersion dans l'eau pouvant être favorisée par les activités anthropiques (machines et équipements utilisés pour la gestion des cours d'eau, désherbage ou les pratiques aquacoles négligées ou non contrôlées)
Reproduction végétative principalement	Dès lors qu'ils possèdent un nœud, un seul fragment de tige de quelques centimètres de longueur peut suffire à reconstituer une plante
Peut rapidement augmenter sa biomasse (2 à 3,5 kg de matière sèche par m² en 4 à 5 mois)	Forme rapidement des herbiers très denses et quasiment impénétrables

Possibilité de reproduction sexuée avec formation de graine (environs 10 000 graines / m²)	Dispersion sur de longues distances par hydrochorie. Possibilité de développement des plantules après enlèvement des parties végétatives dans les sites entretenus
Grande capacité de résistance et d'adaptation à la sécheresse ; forte plasticité phénotypique adaptative	Bien que principalement aquatique, possibilité de colonisation d'habitats terrestres (ex. berges de cours d'eau, marais, prairie humide)
Plante possédant des propriétés allélopathiques	Inhibition de la germination des graines et la croissance des plantules des autres espèces végétales
Impacts	
Écologiques	Concurrence avec les espèces locales ; modification des chaines trophiques ; asphyxie du milieu aquatique ; diminution de la biodiversité locale (faune et flore)
Écosystémiques	Modification profonde du fonctionnement des écosystèmes aquatiques et de leurs équilibres biologiques : réduction du courant ; réduction des concentrations en oxygène (risque asphyxie du milieu) ; augmentation de la sédimentation ; modification de la circulation du cours d'eau ; altération du régime hydrologique
Économiques	Obstacle à la circulation de l'eau, gêne pour la pratique des activités aquatiques de loisir (pêche, navigation, baignade) ; obstruction des systèmes de drainage et de protection contre les inondations ; diminution des zones de pastoralisme et perte de valeur pastorale
Sanitaires	Les tapis denses formés par les jussies peuvent fournir un habitat pour les larves de moustiques
Usages	
Utilisations et valorisations commerciales	Plante ornementale d'aquariophilie
Règlementations	
Règlementation internationale	Règlement d'exécution 2016/1141
Règlementation nationale	Arrêté interministériel du 14 février 2018
Liste rouge mondiale UICN (statut de conservation)	N.E.

UNIVERSITE ECOLOGIE
BRETAGNE GEOSCIENCES
LOIRE AGRONOMIE ALIMENTATION

AGRO CAMPUS OUEST

Titre : Acclimatation de l'espèce aquatique invasive, *Ludwigia grandiflora*, au milieu terrestre : Approches physiologique et épigénétique **par Julien Genitoni**

Mots clés : invasion biologique, jussie, adaptation, plasticité phénotypique, épigénétique, métabolomique

Résumé : Dans un contexte d'expansion des espèces invasives, leur survie et succès sont conditionnés par leur capacité à s'adapter. En France, *Ludwigia grandiflora* (jussie) a envahi bon nombre de biotopes aquatiques et son déploiement récent dans les prairies humides a conduit à l'apparition de deux morphotypes, l'un aquatique et l'autre dit « terrestre ». L'objectif de cette thèse visait à mieux comprendre les capacités d'acclimatation de la jussie au milieu terrestre en explorant les sources de flexibilité que sont les mécanismes génétiques et épigénétiques. Les réponses des morphotypes aquatique et terrestre à différentes contraintes hydriques ont été évaluées via l'observation des traits morphologiques et développementaux, des dosages de métabolites et de phytohormones. La piste épigénétique a été abordée par l'utilisation d'une drogue hypométhylante, la zébularine. Ces travaux ont montré que *L. grandiflora* adapte son développement et son métabolisme avec des valeurs de biomasses élevées et un métabolisme mobilisant la glycolyse et la respiration en condition terrestre et des contenus en eau importants et un métabolisme adapté à un milieu pauvre en oxygène (glycolyse et fermentation) en condition aquatique. Le morphotype terrestre présente des valeurs de traits plus importants que ceux du morphotype aquatique, quelle que soit la condition. Cependant, la plasticité phénotypique est plus importante chez le morphotype aquatique. Enfin, l'épigénétique via la méthylation de l'ADN semble impliquée dans la transition du morphotype aquatique vers le milieu terrestre. Nos résultats suggèrent une implication de la méthylation de l'ADN et de la plasticité phénotypique dans la réponse de la jussie au changement de milieu. Le morphotype terrestre ayant des capacités supérieures au morphotype aquatique, sa gestion doit devenir une priorité. L'obtention de ressources génomiques chez *L. grandiflora* permettra de rechercher des marqueurs génétiques et épigénétiques de l'acclimatation au milieu terrestre. Ces marqueurs pourront être validés via la comparaison des réponses aux contraintes hydriques de populations de jussie uniquement aquatiques ou aquatiques et terrestres.

Title : Acclimation of the invasive aquatic species, *Ludwigia grandiflora*, to terrestrial environment : Physiological and epigenetic approaches **by Julien Genitoni**

Keywords: biological invasion, water primrose, adaptation, phenotypic plasticity, epigenetic, metabolomic.

Abstract: In the context of the expansion of invasive species, their survival and success are conditioned by their ability to adapt. In France, *Ludwigia grandiflora* (water primrose) has invaded many aquatic biotopes and its recent deployment in wet meadows has led to the emergence of two morphotypes, one aquatic and the other called "terrestrial". The aim of this thesis was to get a better understanding of water primrose acclimation capacities to terrestrial environment through exploring the sources of flexibility, as genetic and epigenetic mechanisms. The responses of aquatic and terrestrial morphotypes to different water stresses were evaluated by observing morphological and developmental traits, metabolite and phytohormone assays. The epigenetic pathway was addressed by the use of a hypomethylant drug, zebularin. This work showed that *L. grandiflora* adapts its development and metabolism with high biomass values and metabolism mobilising glycolysis and respiration in terrestrial condition and important water contents and a metabolism adapted to a low oxygen environment (glycolysis and fermentation) in aquatic condition. The terrestrial morphotype shows higher trait values than those of the aquatic morphotype, regardless of the condition. However, phenotypic plasticity is higher in the aquatic morphotype. Finally, epigenetics via DNA methylation appears to be involved in the transition from the aquatic morphotype to the terrestrial environment. Our results suggest the involvement of DNA methylation and phenotypic plasticity in the response of water primrose to environmental change. Since the terrestrial morphotype has higher capacities than the aquatic morphotype, its management must become a priority. The acquisition of genomic resources in *L. grandiflora* will make it possible to search for genetic and epigenetic markers of acclimation to the terrestrial environment. Comparing the responses to water constraints of aquatic or terrestrial and aquatic populations can validated these markers.