

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique Université Saad Dahleb - Blida1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département Sciences Biologiques

Mémoire de fin d'études

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de : Master 2

Spécialité : Génétique

Thème :

**Caractérisation morphologique et analyse génomique in silico
d'Alternaria spp :
étude de la virulence de l'alternariose de la tomate et de la pomme
de terre**

Présenté par :

HAZLOUNE YOUNES

ZERROUK OUALID

Soutenu le 10/07/2025 devant le jury composé de :

Présidente	Dr SIFI M	MCA
Promotrice	Dr BELKHITER S	MCB
Examinatrice	Dr BENMANSOUR N	MCB

Année universitaire : **2024 / 2025**

Remerciements

Tout d'abord, nous tenons à exprimer notre profonde gratitude envers **notre promotrice, Madame BELKHIETER Siham**, pour sa disponibilité, son encadrement rigoureux, ses commentaires constructifs et ses conseils précieux tout au long de ce travail. Son accompagnement attentif a été essentiel à l'élaboration de notre recherche et à l'enrichissement de notre expérience académique.

Nous adressons également nos sincères remerciements à **Madame SIFI**, qui a accepté avec bienveillance de **présider notre jury**, et à **Madame BENMANSOUR**, pour avoir accepté d'examiner notre mémoire. Leurs remarques et suggestions nous ont permis de mieux approfondir notre réflexion scientifique.

Nous remercions aussi chaleureusement l'ensemble des **enseignants, chercheurs et membres du personnel académique de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**, dont le dévouement à l'enseignement et au mentorat a forgé les bases solides de notre formation.

Enfin, nous exprimons toute notre reconnaissance à **nos familles**, pour leur foi inébranlable en nous, leur soutien moral constant, et pour avoir été une source précieuse de motivation durant les moments les plus exigeants de ce parcours.

Dédicace

Nous dédions ce travail à nos familles, dont l'amour, la patience et le soutien indéfectible ont été le fondement de notre croissance académique et personnelle.

À nos parents — vos sacrifices, vos encouragements et votre foi en nous nous ont portés à travers chaque étape de ce parcours. Vous avez été notre lumière directrice, et nous devons cette réussite à votre dévouement sans fin. À nos frères et sœurs et êtres chers, merci pour les moments de joie, de réconfort et de compréhension, particulièrement pendant les périodes de stress et de doute.

À nos chers amis — ceux qui sont restés à nos côtés pendant les longues nuits, les échéances, les doutes et les percées — merci pour votre présence, vos mots et votre foi en nous.

Un remerciement spécial à nos camarades étudiants et amis — votre collaboration, vos conseils et vos conversations encourageantes ont été profondément appréciés. Vous avez aidé à transformer la pression en objectif.

Enfin, nous aimerions nous remercier mutuellement. Ce projet n'aurait pas été le même sans notre confiance mutuelle, nos forces complémentaires et notre engagement partagé. Ce fut un voyage de croissance, et nous sommes fiers de ce que nous avons accompli ensemble.

Resumé:

Ce mémoire porte sur l'étude comparative de *Alternaria alternata* et *Alternaria solani*, deux agents majeurs de l'alternariose chez la tomate et la pomme de terre. L'objectif est d'identifier leurs stratégies de virulence respectives à travers une approche combinant observations morphologiques en laboratoire et analyses génomiques in silico.

Les travaux expérimentaux ont été réalisés au laboratoire de fin d'études de l'Université de Blida 1. Des isolats fongiques ont été obtenus à partir d'échantillons infectés, cultivés sur milieu PDA, puis caractérisés par observation microscopique. Le logiciel **ImageJ** a été utilisé pour la mesure morphométrique des conidies.

Sur le plan bioinformatique, deux génomes de référence (*A. alternata* Z7 et *A. solani* NL03003) ont été analysés. Les gènes de virulence ciblés incluent le **cluster PKS** chez *A. alternata* et le **gène effecteur AsCEP112** chez *A. solani*. Les comparaisons ont été effectuées à l'aide des logiciels **BLAST**, **ClustalW** et **MEGA X** pour l'analyse phylogénétique.

Les résultats mettent en évidence deux stratégies distinctes de pathogénicité : une production de toxines nécrogènes chez *A. alternata* et une suppression immunitaire par effecteurs protéiques chez *A. solani*. Ces conclusions offrent des perspectives pour le développement de méthodes de diagnostic moléculaire et de stratégies de gestion phytosanitaire ciblées.

Mots-clés :

Alternaria, virulence, génomique, bioinformatique, ImageJ, BLAST, MEGA, effecteurs, toxines, tomate, pomme de terre.

Abstract:

This thesis presents a comparative study of *Alternaria alternata* and *Alternaria solani*, two major causal agents of early blight in tomato and potato. The aim is to identify their respective virulence strategies through a dual approach combining laboratory-based morphological observations and in silico genomic analysis.

Experimental work was conducted in the final project laboratory at the University of Blida 1. Fungal isolates were obtained from infected plant samples, cultivated on PDA medium, and morphologically identified using optical microscopy. Morphometric measurements of conidia were performed with **ImageJ** software.

On the bioinformatics side, two reference genomes (*A. alternata* Z7 and *A. solani* NL03003) were analyzed. The target virulence genes included the **PKS cluster** in *A. alternata* and the **AsCEP112 effector gene** in *A. solani*. Comparative analyses were conducted using **BLAST**, **ClustalW**, and **MEGA X** for phylogenetic reconstruction.

The findings reveal distinct pathogenicity strategies: *A. alternata* relies on necrogenic toxin production, while *A. solani* deploys effector proteins to suppress plant immunity. These insights offer valuable prospects for molecular diagnostics and targeted plant protection strategies.

Keywords:

Alternaria, virulence, genomics, bioinformatics, ImageJ, BLAST, MEGA, effectors, toxins, tomato, potato.

الملخص

يتناول هذا البحث دراسة مقارنة بين الفطرين *الترناريا ألترناتا* و*الترناريا سولاني*، وهما من العوامل المسببة الرئيسية لمرض البقعة المبكرة في الطماطم والبطاطا. تهدف الدراسة إلى تحديد استراتيجيات الضراوة الخاصة بكل نوع، من خلال منهجية تجمع بين الملاحظات المورفولوجية المجهرية في المختبر والتحليل الجينومية الحاسوبية.

تم تنفيذ الجانب العملي من البحث في مخبر مشروع نهاية الدراسة بجامعة البليدة 1، حيث تم الحصول على عزلات فطرية من عينات نباتية مصابة، وزُرعت هذه العزلات على وسط غذائي، ثم خضعت للملاحظة المجهرية. وقد استُخدم برنامج ImageJ لإجراء القياسات المورفومترية للأبواغ.

من NL03003 والسلالة *A. alternata* من Z7 في الجانب المعلوماتي الحيوي، تم تحليل جينومين مرجعيين: السلالة *A. alternata* لدى PKS وشملت الدراسة استهداف جينات الضراوة، من بينها مجموعة جينات *A. solani*. MEGA X وClustalW وBLAST وقد أُجريت المقارنات باستخدام برامج *A. solani* المؤثر لدى AsCEP112 لإعادة بناء العلاقات التطورية.

، والتثبيط المناعي *A. alternata* أظهرت النتائج وجود استراتيجيتين مختلفتين للإمراضية: إنتاج السموم النخرية لدى وتفتح هذه النتائج أفقاً لتطوير أدوات تشخيص جزيئي واستراتيجيات وقاية نباتية *A. solani*. عبر بروتينات مؤثرة لدى موجهة.

الكلمات المفتاحية

، البروتينات المؤثرة، السموم، MEGA، BLAST، ImageJ، الترناريا، الضراوة، الجينوم، المعلوماتية الحيوية، الطماطم، البطاطا.

Sommaire

SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUES	1
.....	1
I. CADRE THÉORIQUE ET PROBLÉMATIQUE SCIENTIFIQUE :	2
II. BASES MOLÉCULAIRES DE LA PATHOGÉNICITÉ :	5
.....	7
MATÉRIEL ET MÉTHODES	16
I. Objectif de cette étude :	17
II. Sites d'étude et infrastructures de recherche	17
III. Matériel	17
IV. Méthodes	18
.....	19
V. Approche méthodologique en génomique comparative :	20
RESULTATS ET DISCUSSION	26
I. Observations microscopiques :	27
II. Résultats de la sélection des génomes de référence :	31
III. Analyse Bioinformatique des Gènes de Virulence :	34
IV. Analyse Phylogénétique Comparative :	39
CONCLUSION	45
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	47
ANNEXES	50

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales toxines hôte-spécifiques (HST) produites par les pathotypes d' <i>Alternaria</i> spp	9
Tableau 2 : Classification des espèces d' <i>Alternaria</i> sp selon leur morphologie.....	30
Tableau 3: synthèse des isolats sélectionnés.....	31
Tableau 4: Analyse comparative d'homologie des séquences PKS.....	35
Tableau 5: Profil de composition nucléotidique des gènes PKS.....	36
Tableau 6: Analyse d'homologie du gène CEP112	38
Tableau 7 : Profil de composition nucléotidique du gène CEP112	38
Tableau 8: Comparaison des paramètres évolutifs	40
Tableau 9: Comparaison évolutive PKS vs CEP112	41

Liste des figures

Figure 1 : Alternariose précoce.....	4
Figure 2 : Symptômes de la pourriture de la collerette chez les jeunes tomates	4
Figure 3 : Vue rapprochée d'une lésion de la brûlure précoce avec des cercles concentriques sur une feuille de pomme de terre.	5
Figure 4 : Vue rapprochée d'une lésion de la brûlure précoce avec des cercles concentriques sur une feuille de pomme de terre. Crédit photo	5
Figure 5 : Mécanismes d'action cellulaires des toxines à large spectre (nHST) produites par <i>Alternaria solani</i>	7
Figure 6 : Schematic diagram of target sites of HSTs produced by <i>Alternaria Alternata</i>	10
Figure 7 : Caryotype électrophorétique des chromosomes conditionnellement dispensables (CDCs) d' <i>Alternaria alternata</i> Z7. Les bandes chromosomiques ont été séparées par électrophorèse CHEF	12
Figure 8 : Carte génomique comparative qui illustre comment les génomes des différentes espèces d' <i>Alternaria</i> sont organisés, mettant en évidence les régions conservées (synténie) et les réarrangements, et surtout la contribution des régions "CDC" à la grande ada.....	12
Figure 9: Fragments infectés déposés sur milieu de culture	19
Figure 10 : Échantillons végétaux infectés	19
Figure 11 : Observation microscopique de Structure des conidies d' <i>Alternaria solani</i>	27
Figure 12: Observation microscopique des Conidiophores et conidies d' <i>Alternaria alternata</i>	28
Figure 13 : Arbre phylogénétique des séquences PKS d' <i>Alternaria Alternata</i>	37
Figure 14 : Arbre phylogénétique des séquences de l'Effecteur CEP112 d' <i>Alternaria Solani</i>	39

Liste des Abréviations

<i>Abréviation</i>	<i>Signification</i>
AAL	Toxine du pathotype lycopersici
ACT	Toxines des Agrumes (pathotype citri)
AF	Toxine du pathotype fragariae
AK	Toxine du pathotype kikuchiana
AM	Toxine du pathotype mali
BLAST	Outil de Recherche d'Alignement Local Basique
BUSCO	Évaluation d'Orthologues Universels à Copie Unique
CAZy	Enzymes Actives sur les Glucides
CDC	Chromosome Conditionnellement Dispensable
CDS	Séquence Codante d'ADN
CEP	Protéine Effectrice Riche en Cystéine
CWDE	Enzyme Dégradant la Paroi Cellulaire
EFSA	Autorité Européenne de Sécurité des Aliments
GC	Contenu Guanine-Cytosine
HST	Toxine Sélective d'Hôte
L50	Nombre Minimum de Contigs (50% du génome)
Mb	Mégabase
MEGA	Analyse Génétique Évolutive Moléculaire
ML	Maximum de Vraisemblance
N50	Longueur Médiane des Contigs
nHST	Toxine Non-Sélective d'Hôte
NJ	Neighbor-Joining
PCR	Réaction en Chaîne par Polymérase
PCD	Programmed Cell Death
PKS	Polykétide Synthase
RNAi	ARN Interférence
spp.	espèces (pluriel)

Synthèse Bibliographique

I. CADRE THÉORIQUE ET PROBLÉMATIQUE SCIENTIFIQUE :

1. Le complexe d'espèces *Alternaria* : paradigme de pathosystème évolutif :

Le genre *Alternaria* constitue un modèle d'étude incontournable en phytopathologie fongique, en raison de sa remarquable **plasticité écologique** et de sa **diversité métabolique**, qui lui permettent d'adopter différents modes trophiques (saprophytisme, endophytisme, nécrotrophie), selon le contexte environnemental et les interactions hôte-pathogène (**Agrios, 2005 ; Thomma, 2003 ; Meena et al., 2017**). Ces adaptations favorisent une colonisation rapide de niches écologiques variées, en particulier les tissus végétaux affaiblis ou senescents.

Sur le plan évolutif, *Alternaria* est représentatif des **pathosystèmes complexes** où coexistent des souches à large spectre et des pathotypes hautement spécialisés. Cette diversité repose sur une structure génomique modulaire, incluant des chromosomes conditionnellement dispensables (CDC), vecteurs d'innovation pathogénique (**Tsuge et al., 2013 ; Harimoto et al., 2008**).

- *Alternaria alternata* est considéré comme un pathogène **généraliste**, capable de s'adapter à plusieurs hôtes grâce à la production de toxines hôte-spécifiques (HST) portées par des CDC.
- À l'opposé, *A. solani* manifeste une **spécialisation étroite sur les Solanacées**, notamment la tomate (*Solanum lycopersicum*) et la pomme de terre (*S. tuberosum*), avec un cycle infectieux favorisé par des conditions chaudes et humides (**Rutgers Plant Pest Advisory, 2021**).

2. Impact socio-économique et implications sanitaires :

L'alternariose est l'une des maladies fongiques les plus répandues à l'échelle mondiale, touchant plus de 400 espèces végétales cultivées. Elle constitue une menace majeure pour la productivité agricole, notamment dans les filières stratégiques telles que la tomate et la pomme de terre, avec des pertes de rendement pouvant dépasser 50 % en l'absence de contrôle (**EFSA, 2011 ; University of Wisconsin Vegetable Pathology, 2021**).

Par ailleurs, plusieurs espèces du genre *Alternaria* sont productrices de mycotoxines, telles que

- l'alternariol (AOH), aux propriétés génotoxiques.
- l'acide ténuazonique (TeA), inhibiteur de la synthèse protéique.
- ou encore la tentoxine, ciblant la photosynthèse chloroplastique.

Ces toxines sont non seulement phytotoxiques, mais également dangereuses pour la santé humaine et animale, entraînant des risques mutagènes, immunosuppresseurs ou cancérigènes. La reconnaissance du potentiel toxique de ces composés a conduit à des évaluations de risque par des agences sanitaires, telles que l'EFSA, qui souligne la nécessité de surveiller leur présence dans la chaîne alimentaire (EFSA, 2011 ; Mahmoudi, 2023).

3. Diversité pathogénique et spécialisation adaptative :

La diversité génétique et fonctionnelle observée au sein des espèces du genre *Alternaria* résulte d'un processus évolutif complexe, étroitement lié à la coévolution avec leurs plantes hôtes. Cette dynamique adaptative a conduit à l'émergence de pathotypes spécialisés, capables de produire des toxines hôtes-spécifiques (HST), qui jouent un rôle déterminant dans la pathogénicité.

Ces toxines sont généralement codées par des clusters de gènes localisés sur des chromosomes dits « conditionnellement dispensables » (CDC), c'est-à-dire non essentiels à la survie de base du champignon, mais fortement associés à sa virulence. Ce lien a été bien documenté par (Harimoto et al. 2008) et Tsuge et al. 2013), qui ont montré que la présence ou l'absence de ces chromosomes influence directement la capacité du pathotype à infecter son hôte spécifique.

Chez *Alternaria alternata*, les gènes codant pour les polykétide synthases (PKS), enzymes clés dans la biosynthèse de ces toxines, présentent une forte conservation entre les différentes souches pathogènes. Bien que les comparaisons précises avec d'autres espèces proches, telles que *A. solani*, restent limitées, cette stabilité intra-espèce suggère l'existence d'une pression de sélection purifiante agissant sur ces gènes. Une telle pression maintient l'intégrité fonctionnelle des enzymes nécessaires à la production des toxines. (Meena et al. 2017) ont mis en évidence l'organisation en clusters de ces gènes PKS chez *A. alternata*, tandis que (Wang et al. 2019) ont souligné leur rôle central dans le maintien du potentiel pathogène à travers différentes souches.

4 .Caractérisation symptomatologique :

4.1. *Alternaria alternata* (tomate – nécrose, taches et cankers) :

Sur la tomate, *A. alternata* (forme sp. *lycopersici*) provoque des taches brunes ou noires sur les feuilles basses, s'étendant ensuite en défoliation totale, avant la floraison, avec perte de feuilles et baisse du rendement (figures 1).

Des nécroses en collet (collar rot) ou cankers concentriques se développent sur les tiges des plants jeunes et transplants, pouvant entraîner la mort ou un affaiblissement significatif (figures 2).

Sur fruits, de petites taches sombres au niveau de l'épaule (« shoulder »), évoluant en zones concaves, puis recouvertes d'un duvet de spores noires.



Figure 1 : Alternariose précoce



Figure 2 : Symptômes de la pourriture de la collerette chez les jeunes tomates

4.2 .*Alternaria solani* (pomme de terre – early blight) :

- ✓ **Symptômes clairs sur feuilles** : taches brun-noir avec **anneaux concentriques**, entourées d'une marge jaunâtre, présentes d'abord sur les feuilles basses, progressant vers le haut, provoquant la défoliation (figure 3).
- ✓ **Sur les tiges** : lésions brunes ou grisâtres, souvent entourées d'anneaux concentriques .

- ✓ **Sur tubercules** : lésions enfoncées, brunes à noirs, bordés d'une zone violacée ou surélevée, sec, liégeux (figure 4).



Figure 4 : Vue rapprochée d'une lésion de la brûlure précoce avec des cercles concentriques sur une feuille de pomme de terre.



Figure 3 : Vue rapprochée d'une lésion de la brûlure précoce avec des cercles concentriques sur une feuille de pomme de terre.

II. BASES MOLÉCULAIRES DE LA PATHOGÉNICITÉ :

1. Toxines à large spectre d'activité (nHST) :

Les espèces du genre *Alternaria* sont reconnues pour leur capacité à produire une large gamme de métabolites secondaires non spécifiques d'hôte, désignés sous le terme de toxines à large spectre ou « non-host selective toxins » (nHST) (Meena *et al.*, 2017 ; EFSA, 2011). Contrairement aux toxines hôte-spécifiques, les nHST n'exigent aucune compatibilité moléculaire avec un hôte donné, pouvant affecter un large éventail de plantes, voire d'autres organismes.

1.1. Principaux composés identifiés :

Parmi les nHST les plus étudiées, produites principalement par *Alternaria alternata*, mais jouant un rôle central dans la pathogénicité de *Alternaria solani*, on retrouve :

- **L'alternariol (AOH)** : un dérivé de dibenzopyranone aux propriétés génotoxiques et mutagènes .
- **L'acide ténuazonique (TeA)** : inhibiteur de la synthèse protéique au niveau ribosomal.
- **La tentoxine (TEN)** : qui interfère avec la photophosphorylation dans les chloroplastes.
- **Le zinniol (ZEA)** : composé lipophile déclenchant un stress oxydatif rapide (EFSA, 2011 ; Meena et al., 2017).

1.2. Mécanismes d'action cellulaire :

Selon (Meena et al. 2017), les nHST agissent sur plusieurs cibles intracellulaires :

- Déstabilisation membranaire par dépolarisation et perte d'électrolytes .
- Dysfonctionnement mitochondrial accompagné d'une inhibition des processus photosynthétiques.
- Accumulation de ROS (espèces réactives de l'oxygène), dommages oxydatifs à l'ADN et induction de la mort cellulaire programmée (PCD) .

1.3. Conséquences agronomiques et sanitaires :

Ces toxines aggravent les symptômes phytopathologiques (nécrose, chlorose, flétrissement) et présentent des risques sanitaires importants. Leur accumulation dans les cultures peut conduire à une contamination des denrées alimentaires. Certaines d'entre elles, telles que AOH et TeA, sont suspectées d'être mutagènes ou cancérogènes (EFSA, 2011; Mahmoudi, 2023). L'EFSA recommande d'ailleurs des seuils réglementaires stricts pour limiter leur présence dans la chaîne alimentaire (EFSA, 2011).

1.4. Rôle écologique et pathogène :

Bien que les nHST (non-Hôte Spécifique Toxines) ne soient pas indispensables à la croissance *in vitro* du champignon, elles jouent un rôle crucial dans son interaction avec l'hôte en lui conférant des avantages compétitifs importants. Elles facilitent notamment la pénétration des tissus végétaux en affaiblissant les barrières structurales de la plante, ce qui permet au

pathogène de coloniser plus efficacement les tissus. De plus, ces toxines offrent un avantage concurrentiel face aux autres micro-organismes du microbiome, en perturbant l'équilibre microbien en faveur du champignon. Enfin, chez les espèces nécrotrophes telles qu'*Alternaria alternata*, les nHST contribuent à renforcer la virulence du pathogène, en amplifiant les dégâts causés aux cellules végétales (Meena et al., 2017).

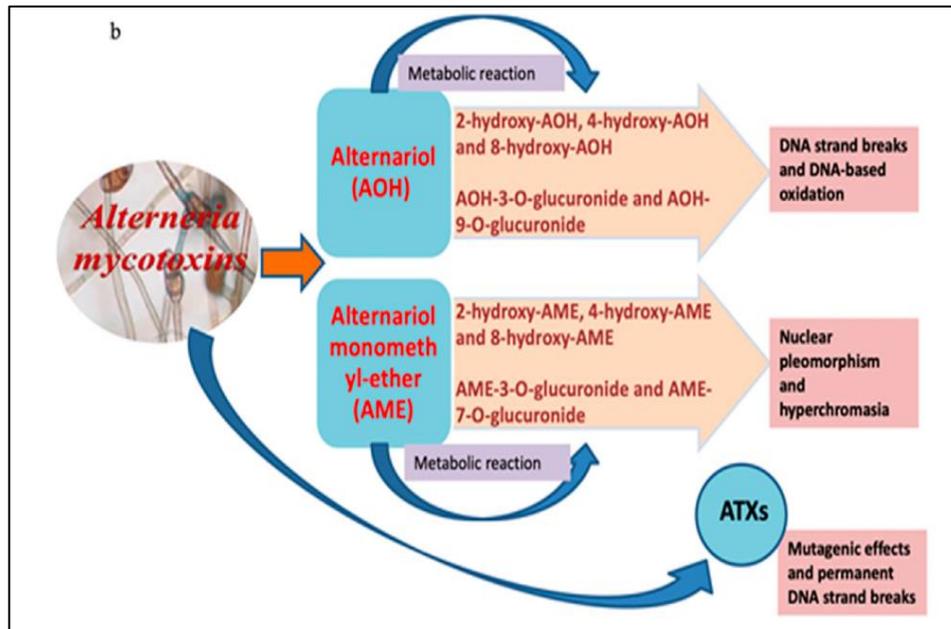


Figure 5 : Mécanismes d'action cellulaires des toxines à large spectre (nHST) produites par *Alternaria solani*.

2. Toxines hôte-spécifiques (HST) déterminants de spécificité :

Les toxines hôte-spécifiques (HST) représentent un élément clé de la stratégie infectieuse de certains pathotypes d'*Alternaria alternata*. Contrairement aux toxines à large spectre (nHST), les HST exercent une action pathogène ciblée, limitée à des plantes hôtes génétiquement compatibles. Cette spécificité moléculaire confère à ces composés une remarquable sélectivité vis-à-vis de l'hôte (Tsuge et al., 2013 ; Akagi et al., 2009).

2.1. Rôle dans la pathogénicité ciblée :

À l'instar des effecteurs protéiques, les HST interagissent spécifiquement avec des cibles moléculaires de l'hôte, exploitant les voies de défense pour favoriser la colonisation

fongique, en permettant au champignon de détecter et d'attaquer sélectivement certains végétaux. Leur mécanisme d'action repose souvent sur l'induction de la mort cellulaire programmée (PCD) ou la désactivation de fonctions physiologiques essentielles chez des hôtes sensibles (Meena et al., 2017). Cette spécificité résulte d'une coévolution étroite entre le champignon et ses plantes hôtes, menant à des interactions dites « compatibles », dans lesquelles la toxine déclenche une réponse favorable à la colonisation fongique.

2.2. Fondements génétiques et biosynthèse :

La production des HST repose sur des clusters géniques spécialisés, fréquemment situés sur des chromosomes conditionnellement dispensables (CDC), absents dans certaines souches non pathogènes. L'origine probable de ces CDC par transfert horizontal entre isolats, décrite notamment chez *Alternaria*, suggère un mécanisme évolutif adaptatif permettant une acquisition rapide de la virulence en réponse à la pression sélective exercée par l'hôte (Harimoto et al., 2008 ; Hu et al., 2021). Ces clusters incluent :

- des polykétide synthases (PKS) et des non-ribosomal peptide synthetases (NRPS), enzymes centrales de la biosynthèse des toxines .
- des enzymes de modification (monooxygénases, oxydoréductases...).
- des protéines de transport impliquées dans l'export des toxines vers l'espace extracellulaire.

L'expression de ces gènes est étroitement régulée et ne se déclenche que dans des conditions d'interaction active avec l'hôte, soulignant leur rôle adaptatif dans la pathogénie ciblée (Tsuge et al, 2013).

2.3. Implications taxonomiques, écologiques et agronomiques :

La spécialisation d'hôte induite par les toxines hôte-spécifiques (HST) a conduit à l'introduction du concept de *formae speciales*, désignant des groupes de souches morphologiquement semblables mais présentant un spectre d'hôte restreint (Tsuge et al, 2013). Par exemple, *A. alternata f. sp. lycopersici* est un pathotype spécialisé de la tomate, produisant une toxine active uniquement sur cet hôte.

Cette spécialisation est rendue possible par l'acquisition de clusters géniques de virulence localisés sur des chromosomes conditionnellement dispensables (CDC). L'origine probable de ces CDC par transfert horizontal entre isolats, décrite notamment chez *Alternaria*, reflète une stratégie évolutive adaptative permettant une émergence rapide de nouveaux pathotypes en réponse à la pression de sélection exercée par l'hôte (**Harimoto et al., 2008 ; Hu et al., 2021**).

Sur le plan agricole, cette diversité pathotypique a plusieurs implications concrètes :

- elle rend difficile l'application de stratégies de lutte fongique universelles .
- elle impose la mise en place de méthodes de diagnostic moléculaire spécifiques à chaque pathotype .
- elle pose des défis en matière de quarantaine, de biosécurité et de sélection variétale résistante (**EFSA, 2011 ; Akagi et al., 2009**).

Tableau 1 : Principales toxines hôte-spécifiques (HST) produites par les pathotypes d'*Alternaria* spp.

Pathotype	Gènes impliqués	Toxine hôte-spécifique (HST)
Pommier (Apple)	<i>AMT genes</i>	AM-toxine
Fraise (Strawberry)	<i>AFT genes</i>	AF-toxine
Poirier japonais	<i>AKT genes</i>	AK-toxine
Agrumes (Tangerine)	<i>ACTT genes</i>	ACT-toxine
Citron rugueux	<i>ACRT genes</i>	ACR-toxine
Tomate (Tomato)	<i>ALT genes</i>	AAL-toxine

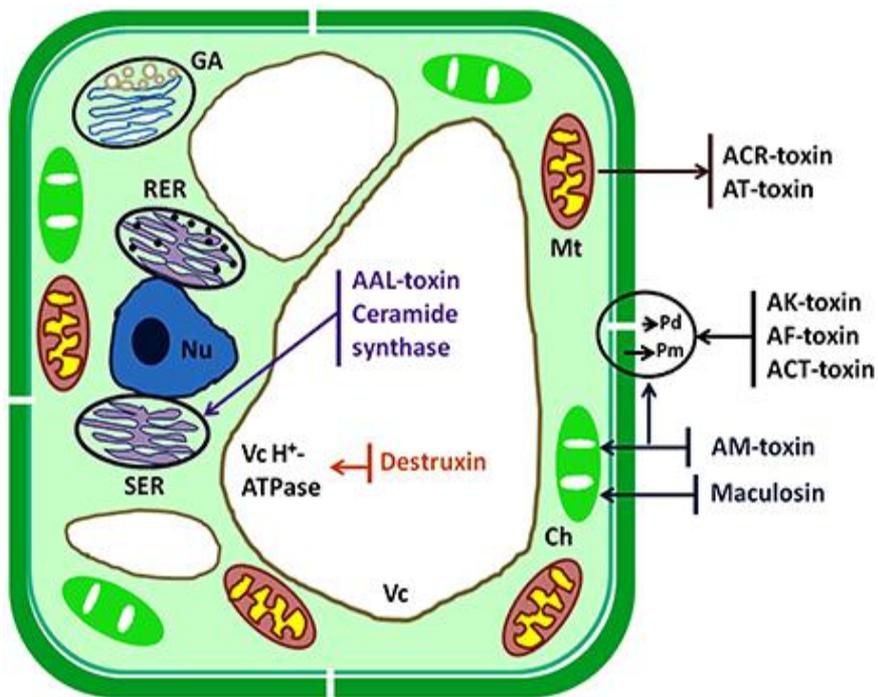


Figure 6 : Schematic diagram of target sites of HSTs produced by *Alternaria alternata*. (Meena et al 2017)

2.4. Architecture génomique de la virulence :

A. Organisation chromosomique et rôle des CDC :

L'architecture génomique des facteurs de pathogénicité chez *Alternaria* révèle une stratégie évolutive particulièrement spécialisée. Les gènes impliqués dans la biosynthèse des toxines hôte-spécifiques (HST) sont principalement localisés sur des chromosomes conditionnellement

dispensables (CDC), également appelés chromosomes accessoires, dont la présence varie selon les souches (**Harimoto et al., 2008 ; Wang et al., 2019**). Ces éléments génomiques surnuméraires jouent un rôle fondamental dans la plasticité pathogénique du genre.

La souche *Alternaria alternata* Z7, utilisée comme souche de référence, présente une organisation chromosomique bien caractérisée, composée de dix chromosomes essentiels et de deux CDC, comme confirmé par des assemblages génomiques de haute résolution (**Wang et al., 2019 ; Gai et al., 2021**). Ces CDC hébergent des clusters géniques de virulence, notamment ceux codant pour des enzymes de type PKS impliquées dans la biosynthèse des toxines HST (**Tsuge et al., 2013 ; Wang et al., 2019**).

B. Mécanismes de transfert horizontal :

Les CDC ont été largement étudiés chez *A. alternata* (souche Z7) et *A. arborescens*, où ils agissent comme des vecteurs dynamiques de transfert horizontal de gènes entre isolats. Ce mécanisme, désormais bien documenté, permet :

- le transfert en bloc de clusters géniques codant pour des toxines, favorisant l'émergence rapide de pathotypes hautement virulents .
- la génération de nouvelles combinaisons de virulence, via l'acquisition ou la perte complète de CDC .
- une évolution non clonale de la pathogénicité, indépendante des mécanismes classiques de reproduction sexuée (**Harimoto et al., 2008 ; Wang et al., 2019 ; Gai et al., 2021**).

C. Implications évolutives :

La présence de CDC confère au genre *Alternaria* une remarquable plasticité évolutive, traduite par :

- une colonisation accélérée de niches écologiques diverses .
- une spécialisation adaptative vis-à-vis de multiples hôtes végétaux .
- une diversification génomique étendue, expliquant la grande variabilité phénotypique, écologique et pathogénique observée au sein du genre (**Tsuge et al., 2013 ; Meena et al., 2017**).

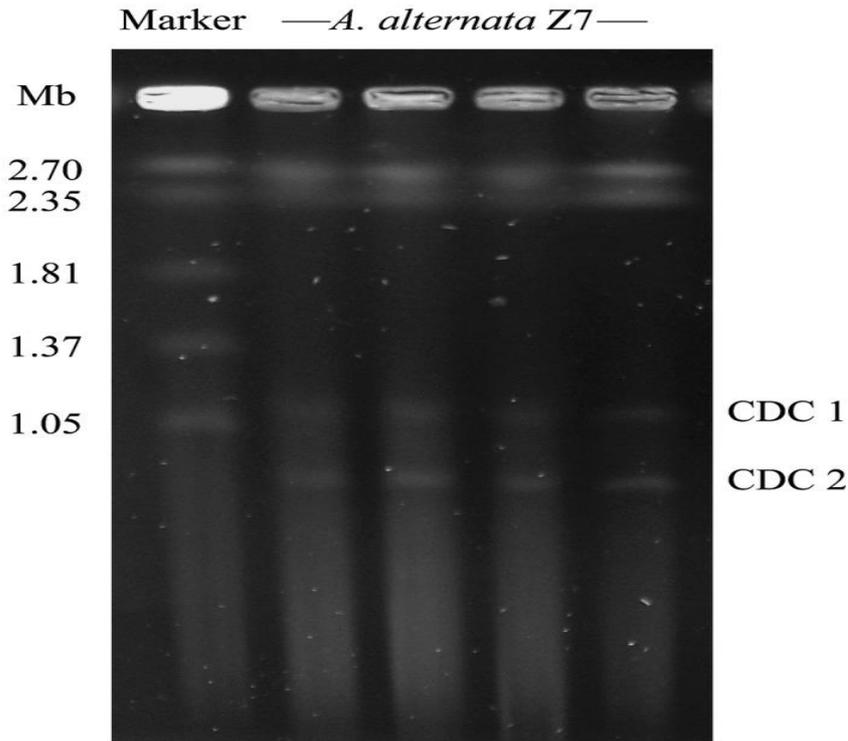


Figure 7 : Caryotype électrophorétique des chromosomes conditionnellement dispensables (CDCs) d'*Alternaria alternata* Z7. Les bandes chromosomiques ont été séparées par électrophorèse CHEF (Wang et al 2019)

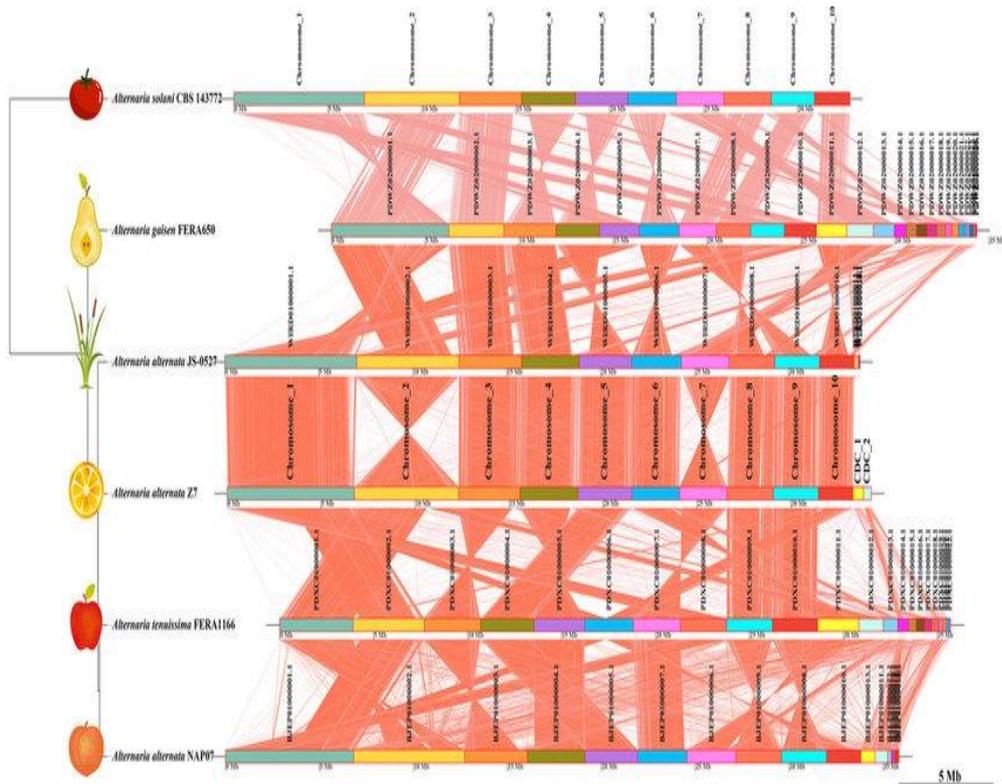


Figure 8 : Carte génomique comparative qui illustre comment les génomes des différentes espèces d'*Alternaria* sont organisés, mettant en évidence les régions conservées (synténie) et les réarrangements, et surtout la contribution des régions "CDC" (Gai et al 2021)

3 . Mécanismes de virulence enzymes de dégradation et effecteurs protéiques :

La virulence des espèces du genre *Alternaria* repose sur une stratégie infectieuse bimodale combinant :

- un **arsenal enzymatique** destiné à désorganiser les structures de la paroi cellulaire végétale, facilitant la pénétration mécanique du champignon dans les tissus hôtes.
- un **ensemble d'effecteurs protéiques** capables d'inhiber ou de contourner les mécanismes de défense immunitaire des plantes (Meena et al., 2017 ; Wang et al., 2022).

Ces deux composantes, à la fois structurales et fonctionnelles, agissent de manière **coordonnée et complémentaire**, assurant une infection efficace. Tandis que les enzymes ouvrent physiquement la voie en altérant les parois cellulaires, les effecteurs interviennent dans un second temps pour moduler les réponses de l'hôte, favorisant la colonisation prolongée du pathogène et la progression des lésions.

3.1 Machinerie enzymatique de dégradation tissulaire :

Le processus infectieux débute par la **sécrétion ciblée d'enzymes hydrolytiques**, conçues pour attaquer et dégrader les principaux constituants de la paroi cellulaire végétale. Ces enzymes ciblent notamment la **pectine**, la **cellulose** et les **hémicelluloses**, qui assurent la rigidité et la cohésion structurale des cellules végétales. Leur action conduit à une désorganisation progressive de la matrice pariétale, créant des brèches permettant au champignon de pénétrer activement dans les tissus internes (Meena et al., 2017).

A. Propriétés biochimiques et fonctionnelles :

- Ces enzymes fonctionnent **efficacement dans un pH légèrement acide à neutre**, condition typique de l'apoplasme des tissus végétaux.
- Elles présentent une **spécificité substrat-dépendante**, ciblant sélectivement des polysaccharides particuliers selon les tissus attaqués.
- Leur expression est **finement régulée** et peut être activée par des signaux moléculaires émis par des cellules végétales endommagées.
- Certaines enzymes présentent une **tolérance aux inhibiteurs enzymatiques** produits par les plantes, ce qui leur permet de maintenir leur activité dans un environnement hostile.

B. Principales classes enzymatiques impliquées :

- **Pectinases** : Elles dégradent la **lamelle moyenne** riche en pectine, affaiblissant la cohésion cellulaire et favorisant la macération des tissus.
- **Cellulases** : Elles hydrolysent les **microfibrilles de cellulose**, compromettant l'intégrité mécanique de la paroi cellulaire.
- **Hémicellulases**: Elles s'attaquent aux **polysaccharides secondaires** tels que les xylanes, arabinoxylanes et mannanes, complétant l'action des cellulases.

La production de ces enzymes suit une régulation temporelle orchestrée, alignée avec les différentes phases de l'infection : ouverture initiale des tissus, extension mycélienne, et colonisation terminale. Cette cinétique contrôlée maximise l'efficacité de l'invasion tout en minimisant la détection par le système immunitaire de la plante.

3.2 Protéines effectrices et suppression immunitaire :

Après la désorganisation des parois cellulaires végétales par les enzymes hydrolytiques, *Alternaria* active une seconde ligne d'attaque plus furtive mais tout aussi décisive : la **sécrétion de protéines effectrices**. Celles-ci sont déployées dans l'apoplasme pour **perturber les mécanismes de défense immunitaire de la plante hôte**, facilitant ainsi une colonisation prolongée (Meena et al., 2017 ; Wang et al., 2022).

A. Propriétés structurales :

- Les effecteurs fongiques sont souvent de **petites protéines riches en cystéines**, ce qui leur confère une **stabilité conformationnelle** élevée grâce à la formation de **ponts disulfures**.
- Ils sont adaptés à l'environnement hostile de l'apoplasme (pH acide, enzymes hydrolytiques), ce qui leur permet de rester **fonctionnels dans des conditions stressantes**.
- Leur séquence primaire est généralement dépourvue d'homologie avec des protéines connues, ce qui complique leur détection par les systèmes de défense végétaux.

B. Mécanismes d'immunosuppression identifiés :

Les protéines effectrices altèrent les défenses végétales par plusieurs mécanismes bien documentés :

- Inhibition de la mort cellulaire programmée (PCD) : elles empêchent la plante d'activer cette réponse sacrificielle, qui isole normalement les foyers infectieux.
- Réduction de la synthèse de métabolites antimicrobiens (phytoalexines, composés phénoliques), qui limite la réponse chimique de défense.
- Altération des voies de signalisation immunitaire, en ciblant par exemple les récepteurs PRR (Pattern Recognition Receptors) ou les protéines intracellulaires régulatrices.

Ces actions convergent vers une immunosuppression active, créant un environnement favorable à la prolifération fongique.

C. Spécificité d'hôte :

Certains effecteurs, tels que les protéines AsCEP19 et AsCEP20 récemment identifiées chez *A. solani*, présentent une spécificité d'activation remarquable, n'étant exprimés que lors de l'infection de plantes hôtes comme les Solanacées (Xiao et al., 2022 ; Xiao et al., 2024). Cette spécialisation, fruit d'une coévolution étroite avec l'hôte, en fait des cibles prometteuses pour le biocontrôle ou la sélection.

Matériel et Méthodes

I. Objectif de cette étude :

Le but de cette étude est de comprendre les mécanismes de pathogénicité chez *Alternaria sp.*, en combinant des approches de biologie classique (isolement et étude de la morphologie des différentes espèces) et de génomique (en se basant sur des outils bioinformatiques pour étudier la classification et le degré de pathogénicité entre les deux espèces).

Dans cette étude nous voulons faire une comparaison morphologique et comparaison entre les gènes de virulence des deux espèces *A. alternata* et *A. solani* Afin de contribuer à l'amélioration des stratégies de gestion phytosanitaire pour les cultures de tomate et de pomme de terre.

II. Sites d'étude et infrastructures de recherche

Dans le cadre de ce travail, deux sites ont été mobilisés :

1. Institut Technique des Cultures Maraîchères et Industrielles (**ITCMI– Staouéli, Alger**), cet établissement public à caractère administratif (EPA), spécialisé dans la recherche appliquée et l'expérimentation en cultures maraîchères ,condimentaires et industrielles,
2. L'ensemble des manipulations expérimentales ont été réalisées au laboratoire de projet de fin d'études (**université de Blida 1**) telles que l'isolement du champignon, la préparation du milieu de culture, la mise en culture, l'incubation et l'observation microscopique.

III. Matériel

1. Matériel biologique :

Des échantillons de folioles et tiges infectés par des symptômes typiques de l'*alternaria* ont été ramenés de l'ITCMI au laboratoire PFE et conservés à 4° C, dans le réfrigérateur pour des analyses ultérieures au laboratoire.

2. Matériel non biologique (Voir Annexes) :

Nous avons utilisé le matériel suivant :

- Balance analytique, agitateur magnétique.
- Gants en latex, masque chirurgical.
- Tubes de conservation et tubes stériles.
- Eau de Javel (dilution 1:10) , eau distillée stérile.
- Boîtes de Pétri, Flacon.
- Autoclave, Bec Benzène.
- Scalpel, pince, ciseau coton, papier essuie tout.

IV. Méthodes

1. Préparation du milieu de culture PDA (Potato Dextrose Agar) :

- **Extraction amidonnée** : faire bouillir 200 g de pommes de terre épluchées dans 1000 mL d'eau distillée pendant 15 à 20 minutes.
- **Filtration** : filtrer le bouillon obtenu à travers une gaze stérile ou un filtre, puis compléter le volume final à 1000 mL.
- **Supplémentation** : ajouter 20 g de glucose et 20 g d'agar-agar au filtrat.
- **Dissolution** : chauffer la solution sous agitation douce jusqu'à dissolution complète des composants (5 à 10 minutes).
- **Stérilisation** : transférer le mélange dans des flacons adaptés, puis stériliser à l'autoclave à 120°C pendant 20 minutes.
- **Coulée** : verser aseptiquement 20 à 25 mL de milieu stérile dans des boîtes de Pétri sous hotte à flux laminaire.

2. Protocole d'isolement et de purification :

- **Stérilisation des instruments** : flamage des scalpels et pinces à l'éthanol 70% suivi d'une exposition à la flamme.
- **Prélèvement des échantillons** : collecte de fragments de tissus végétaux infectés présentant des lésions typiques de l'alternariose.
- **Décontamination** : Immersion des fragments dans une solution d'eau de Javel diluée (1:10) pendant 30 secondes.
- Rinçage successif dans trois bains d'eau distillée stérile (30 secondes chacun).
- **Ensemencement** : placer les fragments végétaux au centre de la gélose PDA sous conditions stériles.
- **Scellage** : fermer hermétiquement les boîtes de Pétri avec du parafilm ou un film plastique autocollant.

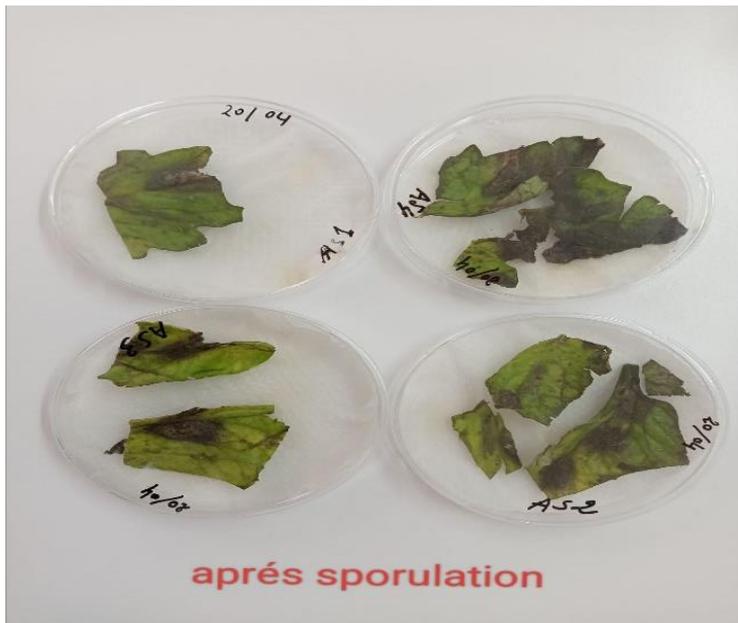


Figure 9 : Échantillons végétaux infectés

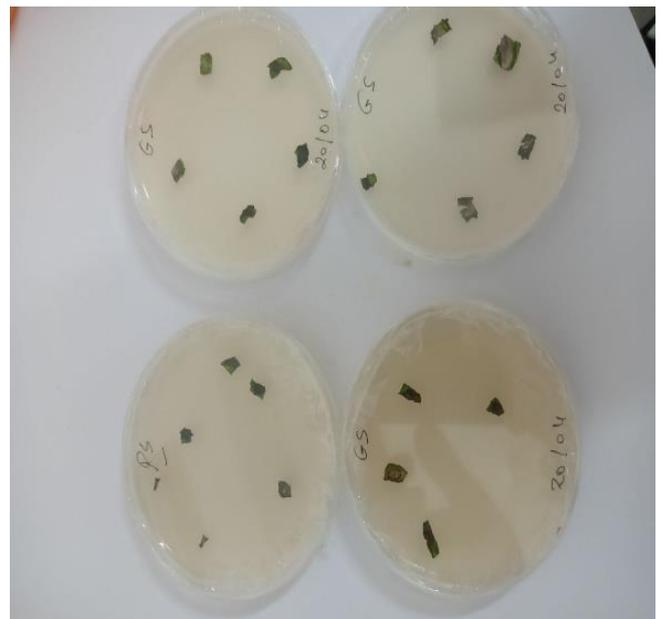


Figure 10: Fragments infectés déposés sur milieu de culture

3. Conditions d'incubation optimales :

- **Température** : $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ (optimum de croissance pour *Alternaria* spp).
- **Photopériode** : cycle lumineux de 12 heures lumière / 12 heures obscurité.
- **Position** : boîtes disposées à plat, face gélosée vers le bas.
- **Humidité relative** : 80 à 85%, assurée dans une chambre de culture ou par placement dans des récipients avec eau stérile.
- **Durée d'incubation** : apparition des premiers signes en 2 à 5 jours ; colonies matures (présentant sporulation et morphologie typique) en 7 à 10 jours.

4. Identification des isolats de l'Altérnaria sp :

L'identification des isolats obtenus c'est basée sur les caractères morphologiques du champignon et l'aspect cultural (la couleur des colonies, l'aspect du mycélium et la Pigmentation), sur le milieu PDA. Les caractéristiques d'évaluation retenues dans notre étude sont :

- Les observations macroscopiques des colonies .
- Les observations microscopiques .
- La croissance mycélium sur le milieu PDA.

Matériel et Méthodes

- Les caractères morphologiques des colonies .
- La taille des conidies .
- La forme des conidies.

5. Identification Fongique De l'observation microscopique au traitement numérique :

L'identification des genres et espèces fongiques isolées est réalisée par observation microscopique de préparations entre lame et lamelle, à l'aide d'un microscope photonique. Cette observation s'effectue à différents grossissements (X4, X10, X25 et X40) afin de distinguer les caractéristiques cellulaires essentielles. L'identification est facilitée par l'utilisation de clés de détermination des champignons, telle que "ILLUSTRATED GENERA IMPERFECT FUNGI" (**Barnett et Hunter, 1972**). Les critères cellulaires discriminants incluent notamment la forme et la couleur des spores, la présence ou l'absence de mycélium cœnocytaire hyalin ou coloré, la présence ou l'absence de mycélium septé hyalin ou coloré, ainsi que la présence ou l'absence de fructifications sexuées ou asexuées. Pour le traitement des images microscopiques, on utilise ImageJ, un logiciel multiplateforme, libre et open source, écrit en Java. Spécifiquement conçu pour le traitement et l'analyse d'images scientifiques, ImageJ permet aux chercheurs de visualiser, éditer, mesurer et traiter une grande variété d'images, notamment celles issues de la microscopie. Sa nature extensible via des plugins et des macros en fait un outil polyvalent et indispensable pour la quantification et l'analyse de données visuelles dans divers domaines scientifiques.

V. Approche méthodologique en génomique comparative :

1. Stratégie de sélection :

Les génomes de référence ont été sélectionnés à partir de la base de données NCBI Assembly, en ciblant les espèces *Alternaria solani* et *A. alternata*. La sélection s'est appuyée sur des critères qualitatifs :

- qualité d'assemblage (nombre de contigs, scaffolds, N50, profondeur de couverture).
- complétude génomique (**BUSCO**).
- présence de gènes de virulence (clusters PKS, gènes AsCEP).
- pertinence fonctionnelle pour les analyses phylogénomiques comparatives.

Matériel et Méthodes

Deux isolats ont été retenus :

- *A. solani* : souche NL03003 (GCA_002952155.1) – Assemblage en 10 chromosomes, profondeur 150×.
- *A. alternata* : souche Z7 (GCA_014751505.1) – Assemblage en 10 chromosomes essentiels + 2 CDC, profondeur 1000×.

Les isolats alternatifs ont été exclus en raison de la fragmentation excessive des assemblages ou de la faible profondeur de couverture.

2. Sélection des gènes cibles de virulence :

2.1 Pour *A. alternata* :

La sélection génique s'est portée prioritairement sur les **clusters codant pour les polykétide synthases (PKS)**, en raison de leur rôle déterminant dans la **biosynthèse des toxines hôte-spécifiques (HST)**. Ces toxines sont des **métabolites secondaires bioactifs**, produits par des **complexes enzymatiques multidomains**, et sont considérés comme les principaux **facteurs de pathogénicité** chez *A. alternata* (Tsuge et al., 2013 ; Harimoto et al., 2008).

Ces toxines sont capables de :

- Perturber les membranes cellulaires.
- Inhiber la respiration mitochondriale.
- Induire l'apoptose des cellules végétales.

Elles sont directement responsables des symptômes tels que la **nécrose foliaire**, la **défoliation**, et facilitent la **pénétration** et la **colonisation** des tissus hôtes.

Les **clusters PKS** sont caractérisés par :

- Une organisation génomique modulaire conservée.
- Une régulation transcriptionnelle spécifique à l'interaction hôte-pathogène.
- Et la présence de gènes accessoires (transporteurs, régulateurs, enzymes de modification), ce qui en fait des **cibles privilégiées pour l'analyse bioinformatique comparative**.

2.2 Pour *A. solani* :

Chez *A. solani*, l'attention a été portée sur les gènes codant pour des protéines effectrices de type AsCEP (*Alternaria solani* Candidate Effector Proteins), connues pour être sécrétées activement dans les cellules hôtes végétales durant les premières étapes de l'infection (**Meng et al., 2020**).

Ces effecteurs agissent en ciblant des éléments-clés de l'immunité végétale :

- Récepteurs de surface (PRR),
- Facteurs de transcription de défense,
- Voies de biosynthèse des ROS,
- Gènes PR (pathogenesis-related proteins).

Les gènes *AsCEP* sont fortement exprimés durant les phases précoces de l'infection et montrent une spécificité d'expression notable chez les Solanacées, justifiant leur utilisation comme biomarqueurs potentiels de virulence active chez *A. solani*.

2.3. Justification méthodologique :

Le choix de combiner l'analyse d'un cluster PKS chez *A. alternata* et celle du gène AsCEP112 chez *A. solani* repose sur une approche comparative complémentaire visant à explorer deux stratégies distinctes mais convergentes de pathogénicité :

A. alternata mobilise des toxines nécrogènes codées par des clusters PKS pour provoquer une nécrose rapide chez l'hôte (**Tsuge et al., 2013**). Tandis, que *A. solani* met en œuvre une infiltration silencieuse basée sur des effecteurs protéiques spécialisés, notamment AsCEP112, capables de supprimer l'immunité végétale (**Wang et al., 2022A**).

Cette dualité permet de :

- Mettre en évidence la diversité fonctionnelle des stratégies de virulence au sein du genre *Alternaria*.

Matériel et Méthodes

- Identifier des marqueurs spécifiques à chaque espèce.
- Et potentiellement développer des outils de diagnostic différentiel ou des stratégies de lutte ciblée basées sur l'interférence ARN ou l'édition génomique.

3. Analyse bioinformatique comparative :

3.1. Analyse des gènes PKS :

a) Caractéristiques compositionnelles :

L'analyse comparative a porté sur un ensemble de **six séquences homologues de gènes PKS** issues de différentes souches et espèces du genre *Alternaria*, identifiées par alignement BLASTn (Altschul et al., 1990). Les PKS (polykétide synthases) sont des enzymes centrales dans la **biosynthèse des toxines hôte-spécifiques (HST)**, considérées comme des déterminants majeurs de la virulence chez *A. alternata* (Tsuge et al., 2013 ; Harimoto et al., 2008).

Le génome de référence utilisé pour *A. alternata* est celui de la souche **Z7**, dont l'assemblage chromosomique est complet. Toutefois, l'**annotation fonctionnelle des clusters PKS** n'était pas disponible dans les fichiers associés (GFF ou GenBank), rendant nécessaire une méthode alternative pour identifier la localisation du cluster d'intérêt.

Pour cela, une **approche d'inférence comparative par recherche BLASTn** a été employée:

- Chaque **chromosome du génome Z7** (au format FASTA) a été utilisé comme **base de recherche indépendante**.
- Une séquence PKS de référence, extraite de la souche *Alternaria sp.* O-276, a été utilisée comme **requête de comparaison**.
- L'**alignement le plus significatif** a été observé sur le **chromosome 3**, indiquant une **localisation probable du cluster PKS** sur cette région du génome.

Cette stratégie, bien que manuelle, s'inscrit dans les méthodes validées de la **génomique comparative de clusters de gènes**, notamment dans l'esprit des outils comme **cblaster**, qui reposent sur la détection de clusters homologues par alignements BLAST dans des bases de données génomiques non annotées (Gilchrist et al., 2021). Elle est particulièrement utile pour repérer des loci biosynthétiques dans des génomes incomplets ou partiellement annotés.

b) Reconstruction phylogénétique :

La reconstruction de l'arbre phylogénétique des séquences PKS a été effectuée selon une approche standard en phylogénie moléculaire, reposant sur une combinaison d'outils bioinformatiques éprouvés :

- **Alignement multiple** : Les séquences nucléotidiques des gènes PKS ont été alignées à l'aide du logiciel ClustalW (**Larkin et al., 2007**), en conservant les paramètres par défaut, reconnus pour leur robustesse dans la conservation des régions homologues.
- **Construction de l'arbre évolutif** : L'alignement a été importé dans MEGA X version 12 (**Kumar et al., 2018**), où un arbre a été généré selon la méthode Maximum Likelihood (ML). Le modèle Tamura-Nei a été sélectionné pour l'estimation des distances évolutives, en raison de sa pertinence pour les séquences présentant une composition en bases asymétrique.
- **Raffinement heuristique** : L'optimisation de la topologie de l'arbre a été réalisée à l'aide de l'algorithme Nearest Neighbor Interchange (NNI), permettant une exploration efficace des configurations possibles.
- **Robustesse statistique** : La stabilité des branches a été évaluée par un test de bootstrap sur 1000 réplicats, fournissant un indice de fiabilité pour chaque nœud de l'arbre.

Le choix du modèle Tamura-Nei est justifié par sa capacité à :

- prendre en compte la **variabilité des fréquences nucléotidiques** ;
- intégrer les **différences de taux de transitions/transversions**, souvent observées dans les gènes de biosynthèse secondaire.

L'approche ML avec NNI est largement considérée comme l'une des plus fiables pour les reconstructions phylogénétiques modernes.

3.2 Analyse du gène *AsCEP112* :

a) Homologie et composition :

La séquence nucléotidique du gène *AsCEP112*, extraite du génome de *A. solani* (isolat NL03003), a été obtenue à partir de la base de données NCBI au format FASTA. Elle a ensuite été utilisée comme requête dans une analyse **BLASTn** (**Altschul et al., 1990**) afin d'identifier

Matériel et Méthodes

les séquences homologues au sein du genre *Alternaria*. Cette approche visait à évaluer la conservation interspécifique de ce gène effecteur impliqué dans la suppression de l'immunité végétale.

b) Phylogénie :

- Alignement des séquences homologues .
- Construction d'un arbre phylogénétique selon les mêmes paramètres que pour le gène. PKS (MEGA X, ML, modèle Tamura-Nei, bootstrap).

3.3. Comparaison évolutive intégrative :

Une **analyse comparative des distances évolutives** a été réalisée entre les gènes PKS et AsCEP112, incluant :

- distances minimales, maximales, moyennes .
- support bootstrap des arbres .
- composition nucléotidique (GC content, ratio AT/GC).

Résultats et Discussion

Résultats et Discussion

I. Observations microscopiques :

1. Analyse morphologique des conidiophores *Alternaria solani* :

L'analyse morphométrique des conidies par le logiciel ImageJ, après observation microscopique, confirme les caractéristiques morphologiques d'*A. solani* : conidies solitaires, obclavées, à parois épaisses et septation muriforme marquée. Le bec conidial proéminent, bien visible à l'extrémité, renforce l'identification spécifique. Ces observations sont cohérentes avec les descriptions taxonomiques (d'Agrios (2005) et Zhao et al. 2018).

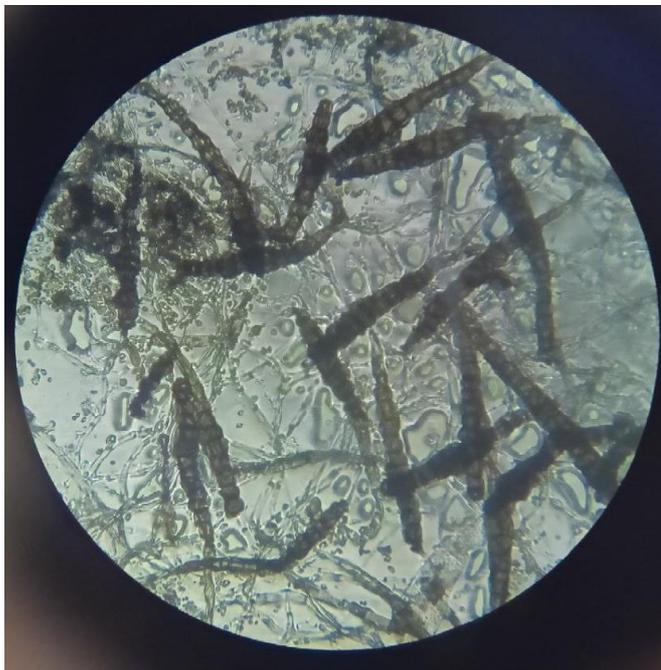


Figure 11 : Observation microscopique de Structure des conidies d'*Alternaria solani*

2. Observation microscopique – *Alternaria alternata* :

L'examen microscopique met en évidence des structures conidiennes typiques du genre *Alternaria*. Les conidiophores sont simples, dressés, et brun foncé. Les conidies présentent une morphologie allant d'obclavée à obpyriforme, disposées en chaînes acropètes souvent ramifiées. Une septation transversale et longitudinale régulière leur confère un aspect

Résultats et Discussion

muriforme caractéristique. Ces traits morphologiques sont en accord avec les descriptions taxonomiques rapportées par (Zhao et al. 2018).



Figure 12: Observation microscopique des Conidiophores et conidies d'*Alternaria alternata*

3. Discussion sur l'identification morphologique de *A. solani* et *A. alternata* :

L'identification morphologique constitue une étape clé dans la caractérisation des espèces du genre *Alternaria*, en particulier lorsqu'elle est associée à des critères taxonomiques bien établis. Les espèces *Alternaria solani* et *Alternaria alternata*, bien que morphologiquement proches, présentent un ensemble de caractéristiques distinctives qui permettent une

Résultats et Discussion

différenciation fiable au microscope optique, comme confirmé par les descriptions classiques (d'Agrios 2005) et les observations actualisées de (Zhao et al. 2018).

Chez *A. solani*, les conidies sont produites **isolément** au sommet des conidiophores, sans formation en chaînes. Leur forme est typiquement **obclavée allongée**, parfois légèrement incurvée, avec un **bec conidial proéminent** à l'extrémité apicale. Cette morphologie, associée à une **structure muriforme marquée**, comprenant de **5 à 10 cloisons transversales** et jusqu'à **5 cloisons longitudinales**, confère à *A. solani* une apparence fortement segmentée et allongée, aisément reconnaissable. La **pigmentation brun foncé à noirâtre** des conidies et conidiophores renforce cette signature morphologique. Enfin, la **sporulation directe, sans chaînage**, est un élément distinctif important, rarement observé chez d'autres espèces du genre.

En comparaison, *A. alternata* présente une organisation conidienne typique du genre, avec des **chaînes acropètes**, souvent **ramifiées**, traduisant un mode de développement asexué très actif. Les conidies sont plus **courtes et modérément larges**, à **morphologie obpyriforme à obclavée courte**, avec un **bec conidial moins développé** que celui observé chez *A. solani*. La **septation muriforme** est bien présente, avec en moyenne **3 à 7 cloisons transversales** et **0 à 3 longitudinales**, mais dans une architecture plus compacte et moins élancée. La **coloration brun à brun olivâtre**, bien que présente, est légèrement plus claire et diffuse, surtout au niveau des conidiophores. Le **mode de développement en chaînes successives** est un critère distinctif majeur, reflétant une dynamique sporulante différente.

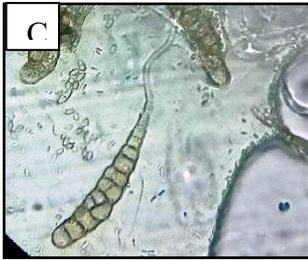
Ainsi, la confrontation de ces critères permet de distinguer efficacement les deux espèces, même en l'absence d'analyses moléculaires. La présence d'un **bec conidial proéminent**, une **sporulation isolée**, et une **forme allongée fortement septée** orientent vers *A. solani*, tandis qu'une **chaîne ramifiée de conidies plus courtes** avec **sporulation acropète** est caractéristique de *A. alternata*. Ces différences morphologiques, bien que parfois subtiles, sont renforcées par les données génétiques et fonctionnelles obtenues dans cette étude, confirmant l'importance d'une approche intégrée dans la différenciation des espèces du genre *Alternaria*.

Résultats et Discussion

4. Observation et mesures (*ImageJ*) des espèces d'*Alternaria sp* isolées dans notre étude:

Les structures observées par le microscope optique correspondent à des conidies du genre *Alternaria*, reconnaissables par leur forme typique (clavée, ellipsoïdale ou cylindrique), leur cloisonnement transversal et parfois longitudinal, ainsi que leur disposition en chaînes ou isolées. La figure A : montre des conidies modérément cloisonnées et allongées, caractéristiques de *Alternaria alternata*. En revanche, la figure B présente des conidies très longues et fortement cloisonnées, proches de *Alternaria longipes*. Tandis que la figure 3 révèle plusieurs conidies disposées en chaîne, typiques de *Alternaria tenuissima*. Les dimensions des conidies varient selon l'espèce, allant de 25 à 90 μm de long et de 8 à 12 μm de large.

Tableau 2 : Classification des espèces d'*Alternaria sp* selon leur morphologie

	Forme des conidies	Nombre de cloisons	Dimensions approximatives (μm)	Espèce probable	Commentaires morphologiques
	Ellipsoïdale allongée, droite à légèrement courbée	5–6 cloisons transversales, 1–2 longitudinales	Longueur : 40–60 μm Largeur : 10–12 μm	<i>Alternaria alternata</i>	Conidie solitaire ou en chaîne courte. Cloisonnement clair. Base arrondie, sommet effilé.
	Longue, cylindrique incurvée	8–10 cloisons transversales, cloisons longitudinales visibles	Longueur : 70–90 μm Largeur : 8–10 μm	<i>Alternaria longipes</i> (ou proche)	Conidie fortement cloisonnée, très allongée, typique des espèces à croissance rapide.
	Clavate à ellipsoïdale, en chaîne	4–7 cloisons transversales, parfois longitudinale	Longueur : 25–45 μm Largeur : 8–10 μm	<i>Alternaria solani</i>	Plusieurs conidies en formation apicale en chaîne. Formes variées, à extrémité effilée ou arrondie.

Résultats et Discussion

II. Résultats de la sélection des génomes de référence :

Les isolats NL03003 (*Alternaria solani*) et Z7 (*Alternaria alternata*) ont été sélectionnés comme génomes de référence en raison de leur qualité d'assemblage, de leur pertinence fonctionnelle en phytopathologie, et de leur usage récurrent dans les études génomiques et moléculaires du genre *Alternaria*.

Pour *A. alternata*, la souche Z7, correspondant au pathotype tangerine, a été retenue bien que l'espèce étudiée ici infecte la tomate. Ce choix repose sur la disponibilité d'un génome assemblé au niveau chromosomique, composé de 10 chromosomes essentiels et 2 chromosomes conditionnellement dispensables (CDC).

Ces CDC hébergent des clusters de gènes de virulence, notamment des PKS et NRPS, impliqués dans la production de toxines hôte-spécifiques (HST) (Wang et al., 2019 ; Gai et al., 2021). L'étude de (Gai et al. 2021), fournit par ailleurs une annotation complète de ce génome, incluant l'organisation des effecteurs, les gènes de synthèse secondaire et les éléments transposables.

Tableau 3: synthèse des isolats sélectionnés

Taxon	Isolat/Souche	Numéro d'accèsion	Assemblage	Paramètres génomiques	Critères de validation
<i>Alternaria alternata</i>	Z7	GCA_014751505 .1	ASM1475150v1	10 chromosomes essentiels + 2 CDC 34,3 Mb, BUSCO 97,9%	Architecture génomique complexe, présence de CDC, couverture 1000×
<i>Alternaria solani</i>	NL03003	GCA_002952155 .1	ASM295215v1	10 chromosomes 32,8 Mb, N50: 2,9 Mb	Assemblage chromosomique continué optimale sans CDC

Pour *A. solani*, l'isolat NL03003 se distingue par un assemblage génomique de haute qualité structuré en 10 chromosomes linéaires, obtenu avec une profondeur de séquençage de 150×. Ce génome est largement utilisé pour la caractérisation des protéines effectrices sécrétées, notamment dans l'analyse des gènes associés à la nécrotrophie. Sa structure et ses annotations ont été décrites en détail par (Gai et al. 2021), et précédemment exploitées pour des analyses fonctionnelles par (Dang et al. 2015).

Résultats et Discussion

1. Caractérisation de l'isolat *Alternaria solani* NL03003 :

L'isolat *A. solani* NL03003, sélectionné comme souche de référence dans de nombreuses études récentes, présente un **génomme haploïde complet** structuré en **10 chromosomes linéaires**. Cet assemblage, caractérisé par une continuité parfaite (scaffolds/contigs = 10/10), témoigne d'une **qualité génomique exceptionnelle** et conforme aux standards actuels pour les espèces fongiques.

La **taille totale du génome** est estimée à **32,8 Mb**, sans aucune région indéterminée (ungapped length = genome size), validant ainsi l'intégrité structurale **de la séquence**.

A. Métriques de contiguïté :

- N50 = 2,9 Mb : 50 % du génome est contenu dans des fragments d'au moins 2,9 Mb, traduisant une faible fragmentation (**Bradnam et al., 2013**).
- L50 = 4, indiquant que seuls quatre fragments couvrent la moitié du génome.
- L'assemblage est classé en tant que "Complete Genome" selon les critères NCBI.

B. Paramètres compositionnels :

Le **taux de GC**, mesuré à **51,5 %**, est en adéquation avec les valeurs observées chez les champignons de l'ordre des **Pleosporales** (**Woudenberg et al., 2013 ; Gai et al., 2021**). La **profondeur de couverture**, estimée à 150×, assure une très haute fidélité dans la détection des bases et la représentation des loci fonctionnels.

C. Annotation génomique et potentiel fonctionnel :

Une annotation complète du génome de l'isolat *Alternaria solani* NL03003 a permis d'identifier 10 358 gènes codant pour des protéines (**Wolters et al., 2018**), incluant :

- des enzymes hydrolytiques, telles que les pectinases et cellulases, impliquées dans la dégradation de la paroi cellulaire des plantes.

Résultats et Discussion

- des effecteurs protéiques spécifiques de lignée, susceptibles de participer à la suppression des réponses immunitaires de l'hôte .
- ainsi que divers gènes associés à la virulence nécrotrophique.

Ces éléments ont été mis en évidence grâce à une approche multiomique intégrée combinant données génomiques, transcriptomiques et prédictions bioinformatiques des effecteurs (Wang et al., 2022a). Par ailleurs, des régions chromosomiques enrichies en gènes codant des protéines sécrétées ont été identifiées, ce qui confirme la pertinence de l'isolat NL03003 comme modèle représentatif des stratégies de virulence d'*A. solani*, notamment dans le contexte infectieux de la tomate et de la pomme de terre.

2. Caractérisation de l'isolat *Alternaria alternata* Z7 :

L'isolat *A. alternata* Z7, utilisé comme souche de référence, présente une **architecture génomique bien caractérisée**, composée de **10 chromosomes essentiels** et de **2 chromosomes conditionnellement dispensables (CDC)**. Ces CDC hébergent des **gènes de virulence spécialisés**, notamment impliqués dans la biosynthèse de **toxines hôte-spécifiques (HST)** (Wang et al., 2019 ; Gai et al., 2021; Tsuge et al., 2013).

Le ratio **scaffolds/contigs = 1:1 (12/12)** atteste d'un **assemblage complet et non fragmenté**, conforme aux standards de qualité des génomes de référence.

A. Métriques de qualité et de complétude :

- **Taille totale du génome** : 34,3 Mb, incluant chromosomes essentiels et accessoires .
- **N50 = 3,1 Mb** et **L50 = 4**, indiquant une excellente continuité de l'assemblage .
- **Assemblage classé "Complete Genome"**, avec un **score BUSCO de 97,9 %**, démontrant une complétude fonctionnelle élevée (Simão et al., 2015) .
- **Profondeur de couverture** : 1000×, confirmée par les données NCBI, assurant une haute résolution, y compris pour les séquences répétées.

Résultats et Discussion

B. Richesse fonctionnelle et annotation :

Le génome Z7 code environ **12 067 gènes**, dont :

- Des **clusters PKS** (polykétide synthases) impliqués dans la production de toxines ;
- Des **enzymes secondaires** et éléments transposables ;
- Plusieurs **gènes de virulence localisés sur les CDC**, dont des effecteurs et protéines sécrétées.
- Cette qualité d'assemblage et d'annotation fait de Z7 un **modèle de référence** pour l'étude de la plasticité génomique et des mécanismes de spécialisation pathogène chez *Alternaria alternata*.

III. Analyse Bioinformatique des Gènes de Virulence :

1. Caractérisation du Gène PKS – *A. alternata* :

1.1. Analyse d'homologie :

Les résultats d'alignement BLASTn montrent une forte conservation des séquences codant les PKS au sein du genre *Alternaria*. La souche O-276, utilisée comme substitut de référence en raison de l'absence d'annotation PKS dans Z7, présente une identité de 98,24 % avec la séquence requête, indiquant une homologie fonctionnelle très élevée.

Chez les autres espèces apparentées, l'identité varie de 91,5 % à 97,18 %, avec des valeurs d'E-value très faibles et une couverture quasi complète (> 86 %). Ces données suggèrent que le cluster PKS est soumis à une pression de sélection purifiante dans le complexe *A. alternata*, maintenant une intégrité fonctionnelle nécessaire à la biosynthèse des toxines hôte-spécifiques (Tsuge et al., 2013).

La conservation intra-espèce élevée contraste avec une divergence modérée inter-espèces, ce qui reflète à la fois :

- une stabilité évolutive du cluster PKS dans les souches d'*A. alternata*.
- et une diversification adaptative chez les espèces apparentées, probablement influencée par les pressions spécifiques de l'hôte ou de l'environnement (**Tableau 4**).

Résultats et Discussion

Tableau 4: Analyse comparative d'homologie des séquences PKS.

Accession	Espèce	Identité	E-value	Couverture
AB465652.1	A. O-276	98.24%	1 ^e -175	100%
XM_038928737.1	<i>A.burnsii</i>	96.05%	8 ^e -73	86%
KU728649.1	<i>A.alternantherae</i>	91.50%	3 ^e -127	100%
JX103645.1	<i>A.Alternata strain ATCC 66981</i>	98.24%	1 ^e -165	100%
XM_051727578.1	<i>A.postmessia</i> Type I Iterative	97.18%	4 ^e -76	86%
XM_028650178.1	<i>A.arborescens</i> Lovastatin diketide synthase	97.18%	4 ^e -76	86%

1.2. Composition nucléotidique :

Le contenu moyen en GC de 51 % observé dans les gènes PKS est en accord avec la composition globale du génome d'*Alternaria*, ce qui suggère une pression sélective équilibrée, sans signe d'adaptation compositionnelle particulière. Le **ratio AT/GC proche de 1** (0,96) reflète une distribution nucléotidique harmonieuse, caractéristique des gènes essentiels hautement conservés. Cette stabilité structurelle souligne l'importance fonctionnelle des polykétide synthases dans la biosynthèse des toxines hôte-spécifiques (HST), où toute dérive dans la composition pourrait affecter leur efficacité enzymatique et compromettre leur rôle dans la virulence (**Tableau 5**).

Résultats et Discussion

Tableau 5: Profil de composition nucléotidique des gènes PKS

Identifiant	Taille (pb)	Adénine (%)	Thymine (%)	Guanine (%)	Cytosine (%)	Contenu GC (%)	Ratio AT/GC
KU728649.1	6853	23.1	23.7	26.4	26.9	53.3	0.88
AB465652.1	340	29.4	22.1	24.1	24.4	48.5	1.06
JX103645.1	6879	24.3	24.7	24.9	26.1	51.0	0.96
XM_028650178.1	6783	24.4	24.4	25.0	26.1	51.1	0.96
XM_038928737.1	6783	24.5	24.6	24.8	26.1	50.9	0.96
XM_051727578.1	6783	24.3	24.4	25.0	26.2	51.2	0.95
Profil Moyen	5570	25.0	24.0	25.0	26.0	51.0	0.96

1.3. Topologie Phylogénétique du Cluster PKS :

Conservation ultra-haute : Le regroupement des souches principales d'*A. Alternata* avec 98-99% de support bootstrap confirme la stabilité évolutive exceptionnelle du cluster PKS, témoignant de contraintes fonctionnelles strictes.

Divergence fonctionnelle : La position basale de la souche AB465652.1 (distance: 0.56) suggère une divergence ancienne, potentiellement associée à une spécialisation toxicologique particulière ou à une adaptation à un hôte spécifique.

Monophylie du complexe : Le super-clade conservé démontre l'origine commune des mécanismes de biosynthèse des HST chez *A. alternata*, supportant l'hypothèse d'une acquisition unique suivie de diversification.

Implications évolutives : La conservation parfaite intra-espèce contraste avec la diversité inter-espèces, indiquant que les mutations délétères dans les clusters PKS sont contre-

Résultats et Discussion

sélectionnées, maintenant l'intégrité catalytique.

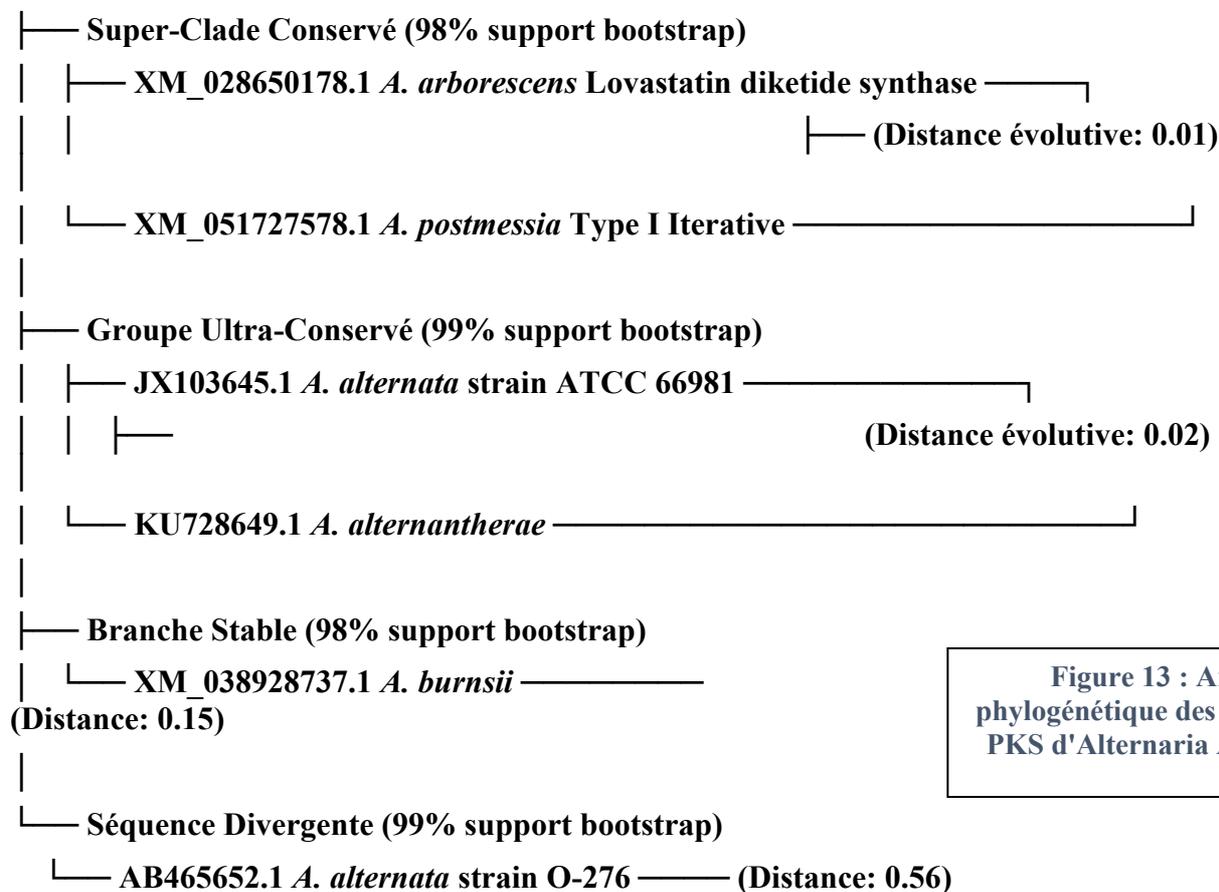


Figure 13 : Arbre phylogénétique des séquences PKS d'*Alternaria Alternata*

2. Caractérisation du Gène CEP112 –A. Solani :

2.1. Analyse d'homologie :

La conservation variable (80–96 %) du gène (effecteur) *cep112* entre espèces d'*Alternaria* reflète une **diversification évolutive plus marquée** que celle observée pour les clusters PKS. Cette variabilité pourrait témoigner d'une **adaptation fonctionnelle aux systèmes immunitaires des hôtes**, en particulier chez les espèces colonisant des plantes phylogénétiquement différentes (**Tableau 6**).

Résultats et Discussion

Tableau 6: Analyse d'homologie du gène CEP112

Accession	Espèce	Identité (%)	E-value	Couverture (%)
OM735616.1	<i>A. solani</i>	100	0.0	100
XM_069454697.1	<i>A. dauci</i>	96.31	2 ^e -120	81
XM_051728220.1	<i>A. postmessia</i>	82.59	5 ^e -57	8181
XM_028654250.1	<i>A. arborescens</i>	82.96	1 ^e -58	81
XM_043319439.1	<i>A. atra</i>	85.93	5 ^e -72	80
XM_038935562.1	<i>A. burnsii</i>	80.00	1 ^e -18	29

2.2.Composition nucléotidique :

Le contenu moyen en GC de 59,4 % est **supérieur au niveau génomique global** d'*Alternaria* (≈51 %), ce qui peut refléter une **pression de sélection adaptative** visant à améliorer la **stabilité de l'ARNm** ou l'**efficacité de la traduction**. Le ratio AT/GC < 1 renforce l'hypothèse d'un gène optimisé pour une expression élevée et spécifique à l'infection.

Tableau 7 : Profil de composition nucléotidique du gène CEP112

Identifiant	Taille (pb)	Adénine (%)	Thymine (%)	Guanine (%)	Cytosine (%)	Contenu GC (%)	Ratio AT/GC
OM735616.1	513	20.7	21.4	24.8	33.1	57.9	0.73
XM_051728220.1	420	21.2	20.2	25.7	32.9	58.6	0.71
XM_069454697.1	414	19.3	20.3	24.4	36.0	60.4	0.66
XM_038935562.1	420	21.0	20.0	25.7	33.3	59.0	0.70
XM_043319439.1	417	19.4	19.7	22.8	38.1	60.9	0.64
XM_028654250.1	420	20.5	19.5	26.0	34.0	60.0	0.67
Profil Moyen	434	20.4	20.2	24.9	34.5	59.4	0.68

2.3.Analyse Phylogénétique Intégrative du Gène CEP112 :

- **Conservation modérée** : Le regroupement des séquences *A. solani* montre un support bootstrap modéré (79–80 %), indiquant une **évolution plus dynamique** des effecteurs *CEP112* comparée à la stabilité des PKS.

Résultats et Discussion

- **Diversification fonctionnelle** : La position isolée d'*A. solani* (distance génétique = 0.07) suggère une spécialisation adaptative vers les Solanacées, possiblement liée à une pression sélective récente sur la suppression immunitaire.
- **Évolution convergente** : Le clade formé par *A. postmessia* et *A. arborescens* (support 80 %) pourrait indiquer une **convergence évolutive** de fonctions effectrices similaires, malgré des lignées distinctes.
- **Implications évolutives** : Les distances phylogénétiques plus faibles (0.02–0.09) par rapport à celles des PKS indiquent une **sélection diversifiante ciblée**, propre aux effecteurs, permettant une **évasion flexible des réponses immunitaires végétales**.

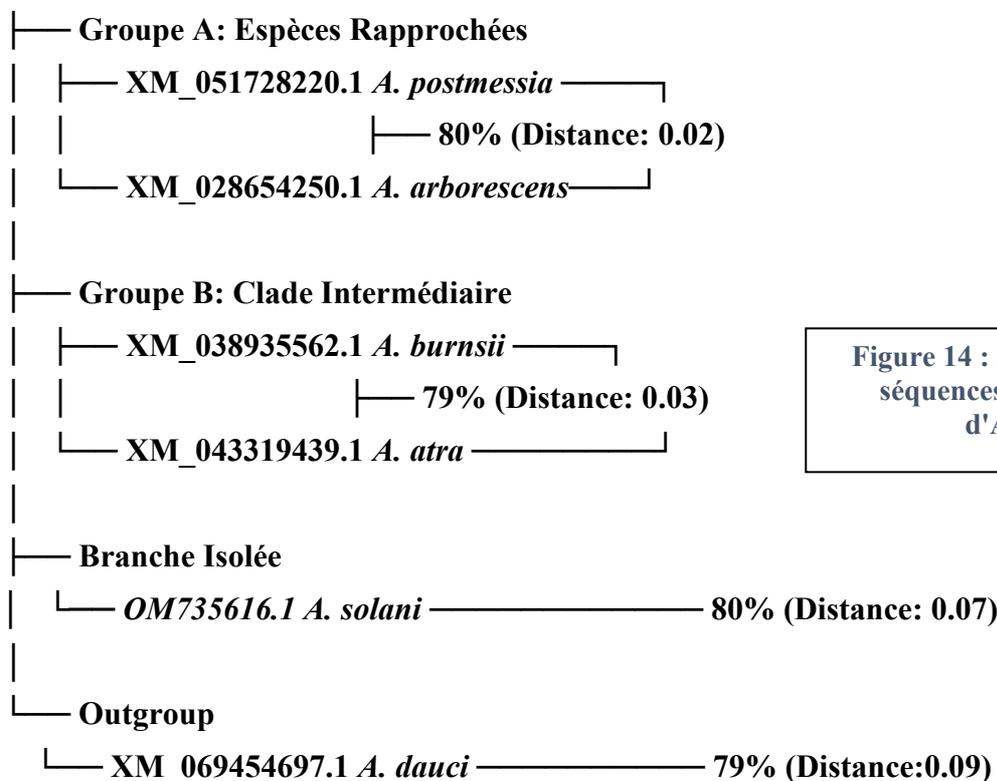


Figure 14 : Arbre phylogénétique des séquences de l'Effecteur CEP112 d'*Alternaria Solani*

IV. Analyse Phylogénétique Comparative :

1. Matrice des Distances Évolutives :

Le gène PKS est plus diversifié entre espèces mais hautement structuré (bootstrap élevé), traduisant une évolution ancienne avec conservation sélective des fonctions toxiques.

Résultats et Discussion

Le gène **CEP112** est **plus conservé entre espèces** mais avec une **phylogénie plus instable** (bootstrap moyen), suggérant **une évolution fonctionnelle rapide**, probablement sous l'effet de **pressions immunitaires spécifiques des hôtes**.

Tableau 8: Comparaison des paramètres évolutifs

Paramètre	CEP112	PKS	Signification Biologique
Distance minimale	0.02	0.01	Séquences quasi-identiques
Distance maximale	0.09	0.56	Divergence modérée pour CEP112
Distance moyenne	0.05	0.28	Conservation supérieure en CEP112
Support bootstrap	79-80%	98-99%	Topologie PKS très fiable

2. Analyse Phylogénétique Comparative Intégrative :

L'analyse comparative des caractéristiques évolutives des gènes **PKS** et **CEP112** met en lumière deux trajectoires fonctionnelles bien distinctes au sein du genre *Alternaria*, traduisant des stratégies divergentes mais complémentaires de pathogénie.

Tout d'abord, la **conservation intraspécifique de parfaite (100 %)** observée pour les deux gènes souligne leur importance fonctionnelle respective. Cependant, la **conservation interspécifique** est plus élevée pour le gène **PKS** (91–97 %) que pour **CEP112** (80–96 %), indiquant que les polykétide synthases, responsables de la biosynthèse des toxines hôte-spécifiques, sont soumises à une **pression purifiante forte**, visant à maintenir leur intégrité structurelle et catalytique. En revanche, **CEP112**, gène effecteur impliqué dans la suppression de l'immunité de l'hôte, présente une variabilité plus marquée entre espèces, reflet d'une **adaptation évolutive plus récente et ciblée** aux systèmes de défense des plantes hôtes.

Sur le plan de la **composition nucléotidique**, **CEP112** se distingue par un contenu en GC significativement plus élevé (59,4 % contre 51,0 % pour PKS), suggérant une **optimisation transcriptionnelle**. Cette richesse en bases G et C pourrait favoriser la stabilité de l'ARNm et une traduction plus efficace, surtout lors des phases précoces d'infection où une expression rapide des effecteurs est cruciale.

Les distances évolutives maximales renforcent cette différenciation : **PKS** atteint une distance maximale de 0,56, traduisant une **divergence importante entre espèces** (notamment en fonction des hôtes cibles et des niches écologiques), tandis que **CEP112** reste contenu à 0,09, ce qui reflète une **différenciation fonctionnelle plus fine** et probablement soumise à des **pressions hôte-spécifiques plus récentes ou fluctuantes**.

Résultats et Discussion

En termes de **pression sélective**, les données confirment un **régime purifiant** pour PKS, où les mutations sont fortement contre-sélectionnées, assurant la stabilité du cluster toxique. CEP112, au contraire, évolue sous une **pression balancée**, combinant conservation de motifs essentiels à la fonction effectrice et variabilité facilitant l'évasion immunitaire.

La **distribution phylogénétique** renforce cette opposition : **PKS** est principalement observé au sein du **complexe *A. alternata***, ce qui suggère une **origine évolutive spécifique**, tandis que **CEP112** est distribué plus largement à travers le **genre *Alternaria***, témoignant d'une **fonction plus universelle mais adaptative**.

Enfin, les **valeurs de bootstrap** indiquent que l'arbre phylogénétique des PKS est **hautement robuste (98 %)**, traduisant une évolution plus ancienne, linéaire et stable. À l'inverse, le support moyen pour CEP112 est de 80 %, traduisant une **topologie plus instable**, en cohérence avec un gène soumis à des **événements d'évolution convergente ou de diversification rapide**.

Tableau 9: Comparaison évolutive PKS vs CEP112

Caractéristique	Gène PKS	Gène CEP112	Interprétation Évolutive
Conservation intraspécifique	100%	100%	Stabilité fonctionnelle
Conservation interspécifique	91-97%	80-96%	PKS plus conservé
Composition GC moyenne	51.0%	59.4%	CEP112 optimisé pour l'expression
Distance évolutive max	0.56	0.09	Régimes de sélection différents
Pression sélective	Purifiante	Balancée	Optimisation fonctionnelle
Distribution phylogénétique	Complexe <i>alternata</i>	Genre <i>Alternaria</i>	Origines évolutives distinctes
Support bootstrap moyen	98%	80%	Topologies robustes

3. Discussion des analyses génomiques :

Le gène *AsCEP112* a été sélectionné comme cible d'analyse pour *A. solani* en raison de son rôle fonctionnel récemment caractérisé dans la pathogénicité de l'espèce. Classé parmi les effecteurs candidats, *AsCEP112* est fortement exprimé au cours de l'infection. Sa suppression génétique, réalisée par mutagenèse ciblée, a entraîné une réduction significative du pouvoir

Résultats et Discussion

pathogène, une baisse de la sporulation ainsi qu'une diminution de la capacité de pénétration dans les tissus végétaux, indiquant son implication directe dans les mécanismes infectieux (Wang et al., 2022A). Ce profil en fait un marqueur pertinent pour l'étude des interactions hôte-pathogène spécifiques à *A. solani*.

En parallèle, les clusters de gènes codant pour les polykétide synthases (PKS) chez *A. alternata* ont été retenus en raison de leur rôle bien établi dans la production de toxines hôte-spécifiques (HST). Ces toxines, essentielles à la nécrotrophie, sont responsables de la déstructuration cellulaire chez la plante hôte. La forte conservation génomique de ces clusters, mise en évidence dans plusieurs souches indépendantes, atteste de leur rôle central dans la stratégie pathogène du champignon (Tsuge et al., 2013 ; Harimoto et al., 2008). Leur stabilité fonctionnelle en fait des éléments modèles pour l'étude des mécanismes moléculaires de virulence conservée chez les champignons phytopathogènes nécrotrophes.

L'analyse comparative *in silico* met en évidence une conservation très élevée (98–99 %) des clusters de gènes codant pour les polykétide synthases (PKS) chez *Alternaria alternata*. Cette homogénéité génomique, observée entre différentes souches représentatives, reflète une pression de sélection purificatrice particulièrement forte. Elle tend à préserver la fonctionnalité des enzymes PKS, qui occupent un rôle clé dans la biosynthèse des toxines hôte-spécifiques (HST). Ces métabolites secondaires sont directement impliqués dans la nécrose des tissus végétaux, favorisant ainsi la colonisation efficace de l'hôte (Tsuge et al., 2013 ; Harimoto et al., 2008).

En revanche, l'analyse du gène *AsCEP112*, identifié chez *A. solani*, révèle une variabilité interspécifique modérée (80 à 96 % d'identité nucléotidique). Ce degré de divergence suggère un mode évolutif plus plastique, probablement associé à une coévolution dynamique avec les défenses immunitaires des plantes hôtes, notamment celles des Solanacées. Le contraste observé entre la stabilité génomique des PKS et la variabilité des effecteurs comme *AsCEP112* illustre deux stratégies évolutives distinctes mais complémentaires : une virulence toxique conservée d'un côté, et une capacité d'adaptation immunitaire accrue de l'autre (Wang et al., 2022).

Résultats et Discussion

Une analyse fine de la composition nucléotidique met en évidence un taux de GC élevé ($\approx 59,4\%$) au sein du gène *AsCEP112*, sensiblement supérieur à la moyenne génomique ($\sim 51\%$) rapportée pour le genre *Alternaria*. Ce biais de composition, caractérisé par un ratio AT/GC inférieur à 1, pourrait refléter une adaptation transcriptionnelle spécifique, favorisant une expression régulée de ce gène en phase infectieuse. Bien qu'aucune étude n'ait encore établi de lien direct entre ce profil et son expression, une telle configuration est souvent associée à des gènes impliqués dans des fonctions adaptatives (Wang et al., 2022).

À l'opposé, les clusters PKS de *A. alternata* présentent un profil de composition équilibré (GC $\approx 51\%$), aligné avec le contenu global du génome. Ce profil homogène est interprété comme le résultat d'une pression de sélection conservatrice visant à préserver des fonctions métaboliques cruciales (Tsuge et al., 2013 ; Harimoto et al., 2008).

Ainsi, ces observations confortent l'idée de deux régimes évolutifs divergents. Une conservation structurale stricte des clusters PKS chez *A. alternata*, favorisant une stratégie de pathogénie directe par nécrose. Une diversification adaptative du gène *AsCEP112* chez *A. solani*, compatible avec une spécialisation immunitaire souple.

La présente étude repose exclusivement sur des analyses *in-silico*, basées sur les génomes de référence Z7 (*A. alternata*) et NL03003 (*A. solani*), sélectionnés pour la qualité de leur assemblage, l'exhaustivité de leur annotation et leur représentativité phylogénétique au sein du genre *Alternaria* (Gai et al., 2021). Bien que cette approche offre une base robuste pour l'exploration des déterminants génétiques associés à la virulence, elle demeure limitée par l'absence de validation fonctionnelle expérimentale, nécessaire pour confirmer les hypothèses formulées à partir des données bioinformatiques.

Afin de pallier ces insuffisances et de confirmer les hypothèses formulées à partir des données bioinformatiques, plusieurs stratégies expérimentales complémentaires sont recommandées :

Résultats et Discussion

- Analyse de l'expression génique en conditions infectieuses par RNA-Seq ou RT-qPCR, afin de valider l'induction des gènes étudiés au cours du processus infectieux (**Gai et al., 2023**).
- Mutagenèse ciblée par la technologie CRISPR/Cas9, méthode déjà appliquée avec succès à *A. alternata*, permettant de démontrer de manière causale la contribution d'un gène à la virulence (**Wenderoth et al., 2017**).
- Essais pathogéniques in planta, indispensables pour établir un lien fonctionnel entre l'expression génique et le pouvoir infectieux de l'isolat .

Enfin, des approches intégrées de type « omique » (transcriptomique globale, analyses épigénétiques, modélisation structurale des protéines) pourraient enrichir l'analyse en dévoilant les réseaux de régulation sous-jacents et les mécanismes de spécialisation adaptative (**Gai et al., 2023**).

Conclusion

Conclusion

Ce travail a permis d'explorer de manière intégrative la diversité morphologique et génomique des espèces du genre *Alternaria* impliquées dans l'alternariose de la tomate (*Solanum lycopersicum*) et de la pomme de terre (*Solanum tuberosum*). En combinant des observations microscopiques, une analyse bioinformatique comparative et une reconstruction phylogénétique, cette étude met en lumière deux stratégies de virulence distinctes mais convergentes :

- *Alternaria alternata* repose majoritairement sur la production de toxines hôte-spécifiques (HST), codées par des clusters PKS ultra-conservés, traduisant une forte pression de sélection purifiante et une spécialisation pathogénique marquée.
- À l'inverse, *Alternaria solani* mobilise principalement des effecteurs protéiques sécrétés, tels que *AsCEP112*, témoignant d'une plasticité évolutive accrue et d'une stratégie d'évasion immunitaire plus subtile.

Cette complémentarité évolutive illustre la remarquable capacité d'adaptation du genre *Alternaria*, qui combine spécialisation génomique et diversification fonctionnelle pour s'adapter à ses hôtes. Les résultats obtenus offrent des perspectives concrètes en phytoprotection, notamment :

- le développement de marqueurs moléculaires spécifiques aux pathotypes.
- la mise en œuvre de stratégies de lutte ciblée fondées sur l'interférence avec les gènes de virulence.
- et l'amélioration de la sélection variétale assistée par biotechnologie.

Néanmoins, les données générées dans ce travail sont issues exclusivement d'analyses *in-silico*. Pour confirmer les hypothèses fonctionnelles formulées, des validations expérimentales telles que la mutagenèse dirigée, les analyses transcriptomiques (RNA-Seq) ou les tests pathogéniques sur plantes hôtes seront indispensables.

En somme, ce mémoire fournit une base scientifique robuste pour approfondir la compréhension des mécanismes de pathogénie chez *Alternaria spp.*, et ouvre des pistes prometteuses pour l'amélioration des stratégies de lutte phytosanitaire, cruciales pour la protection durable des cultures de tomate et de pomme de terre, deux espèces d'importance économique majeure.

Références Bibliographiques

Références bibliographiques

- Agrios, G. N. (2005). *Plant Pathology* (5th ed.). Elsevier Academic Press.
- Akagi, Y., Otani, H., & Kodama, M. (2009). Host-selective toxins and pathogenicity of *Alternaria alternata* causing brown spot of Japanese pear. *Phytopathology*, 99(7), 837–845.
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410.
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1972). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi* (3rd ed.). Burgess Publishing Co.
- Bradnam, K. R., Fass, J. N., Alexandrov, A., Baranay, P., Bechner, M., Birol, I., ... & Korf, I. F. (2013). Assemblathon 2: evaluating de novo methods of genome assembly in three vertebrate species. *GigaScience*, 2(1), 10.
- Cai, Q., He, B., Kogel, K.-H., & Jin, H. (2018). Crosskingdom RNA trafficking and environmental RNAi: Nature's blueprint for modern crop protection strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 46, 58–64.
- Dang, H. X., Pryor, B., Peever, T., & Lawrence, C. B. (2015). The *Alternaria* genomes database: a comprehensive resource for a fungal genus comprised of saprophytes, plant pathogens, and allergenic species. *BMC Genomics*, 16, 239.
- Gai, Y., Ma, H., Chen, Y., Li, L., Cao, Y., Wang, M., Sun, X., Jiao, C., Riely, B. K., & Li, H. (2021A). Chromosome-scale genome sequence of *Alternaria alternata* causing *Alternaria* brown spot of citrus.
- Gai, Y., Niu, Q., Kong, J., Li, L., Liang, X., Cao, Y., Zhou, X., Sun, X., Ma, H., Wang, M., Shrivastava, N., Li, H., & Jiao, C. (2023B). Genomic and transcriptomic characterization of *Alternaria alternata* during infection. *Agronomy*, 13(3), Article 809.
- Gilchrist, C. L. M., Booth, T. J., van Grieken, L., Medema, M. H., & Chooi, Y. H. (2021). cblaster: a remote search tool for rapid identification and visualisation of homologous gene clusters. *Bioinformatics Advances*, 1(1), vbab016.
- Harimoto, Y., Tanaka, A., Tsuge, T., & Otani, H. (2008). Expression profiles of genes encoded by the supernumerary chromosome controlling AM toxin biosynthesis and pathogenicity in the apple pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21(12), 1533–1546.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549.
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., ... & Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21), 2947–2948.
- Mahmoudi, R. (2023). Scope of onsite, portable prevention diagnostic strategies for

Références bibliographiques

Alternaria infections in medicinal plants. *Biosensors*, 13(7), 701.

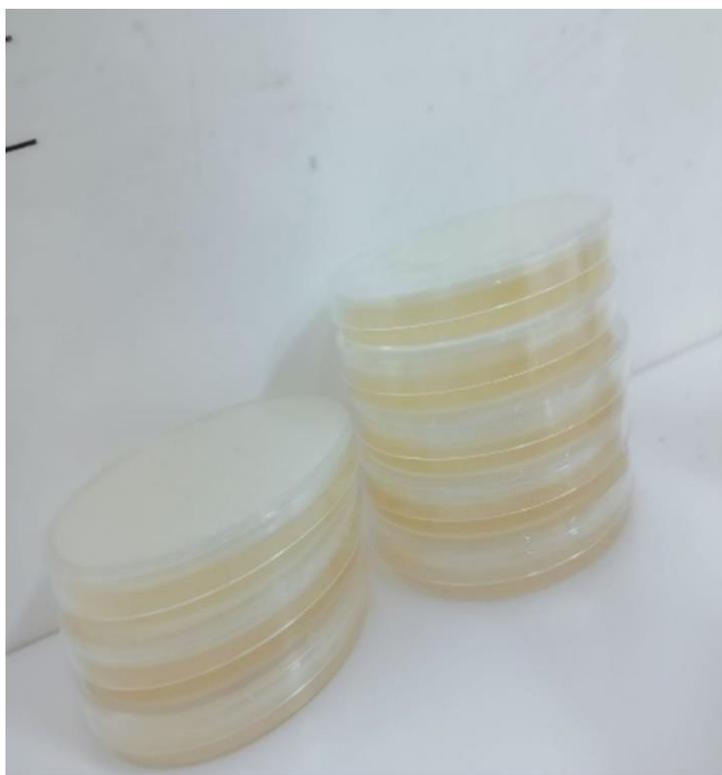
- Meena, M., Gupta, S. K., Swapnil, P., Zehra, A., Dubey, M. K., & Upadhyay, R. S. (2017). *Alternaria* toxins: Potential virulence factors and genes related to pathogenesis. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1451.
- Plotkin, J. B., & Kudla, G. (2011). Synonymous but not the same: the causes and consequences of codon bias. *Nature Reviews Genetics*, 12(1), 32–42.
- Simão, F. A., Waterhouse, R. M., Ioannidis, P., Kriventseva, E. V., & Zdobnov, E. M. (2015). BUSCO: assessing genome assembly and annotation completeness with single copy orthologs. *Bioinformatics*, 31(19), 3210–3212.
- Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp.: from general saprophyte to specific parasite. *Trends in Plant Science*, 8(10), 427–430.
- Tsuge, T., Harimoto, Y., Akimitsu, K., Ohtani, K., Kodama, M., Akagi, Y., ... & Yamamoto, M. (2013). Host selective toxins produced by the plant pathogenic fungus *Alternaria alternata*. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(1), 44–66.
- Wang, C., Zhang, D., Cheng, J., Zhao, D., Pan, Y., Li, Q., Zhu, J., Yang, Z., & Wang, J. (2022A). Identification of effector CEP112 that promotes the infection of necrotrophic *Alternaria solani*. *BMC Plant Biology*, 22, 466.
- Wang, J., Xiao, S., Zheng, L., Pan, Y., Zhao, D., Zhang, D., Li, Q., Zhu, J., & Yang, Z. (2022B). Multiomic approaches reveal novel lineage specific effectors in the potato and tomato early blight pathogen *Alternaria solani*. *Phytopathology Research*, 4, 29.
- Wang, M., Fu, H., Shen, X.-X., Ruan, R., Rokas, A., & Li, H. (2019C). Genomic features and evolution of the conditionally dispensable chromosome in the tangerine pathotype of *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Pathology*, 20(10), 1425–1438.
- Wenderoth, M., Seither, K., & Fischer, R. I. (2017). Establishment of CRISPR/Cas9 in *Alternaria alternata*. *Fungal Genetics and Biology*, 101, 55–60.
- Wolters, P. J., Faino, L., van den Bosch, T. B. M., Evenhuis, B., Visser, R. G. F., Seidl, M. F., & Vleeshouwers, V. G. A. A. (2018). Gapless genome assembly of the potato and tomato early blight pathogen *Alternaria solani*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 31(7), 692–694.
- Woudenberg, J. H. C., Groenewald, J. Z., Binder, M., & Crous, P. W. (2013). *Alternaria* redefined. *Studies in Mycology*, 75, 171–212.
- Xiao, S., Wang, J., Bai, Z., Pan, Y., Li, Q., Zhao, D., Zhang, D., Yang, Z., & Zhu, J. (2024). *Alternaria solani* effectors AsCEP19 and AsCEP20 reveal novel functions in pathogenicity and conidiogenesis. *Microbiology Spectrum*, 12(8), e04214-23.
- Zhao, J., Ma, G.-P., Liu, Y.-Y., & Wu, X.-H. (2018). *Alternaria* species infecting potato in southern China. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40(2), 261–271

Annexes

Annexes

- Gardening Know How. Early blight (*Alternaria*) on tomato leaf spots and yellow leaves.
- Rutgers Plant Pest Advisory. Collar rot and *Alternaria* stem rot of tomato.
- University of Wisconsin Vegetable Pathology. Potato early blight caused by *Alternaria solani*: symptoms and management.
- ITCMI Algeria. *Guide de plantation de la pomme de terre*.
- ResearchGate. (2021). Synteny and collinearity analysis of genome of *Alternaria alternata* Z7 and five *Alternaria* genomes using NCBI BLASTN.

Coté pratique :



Annexe 1



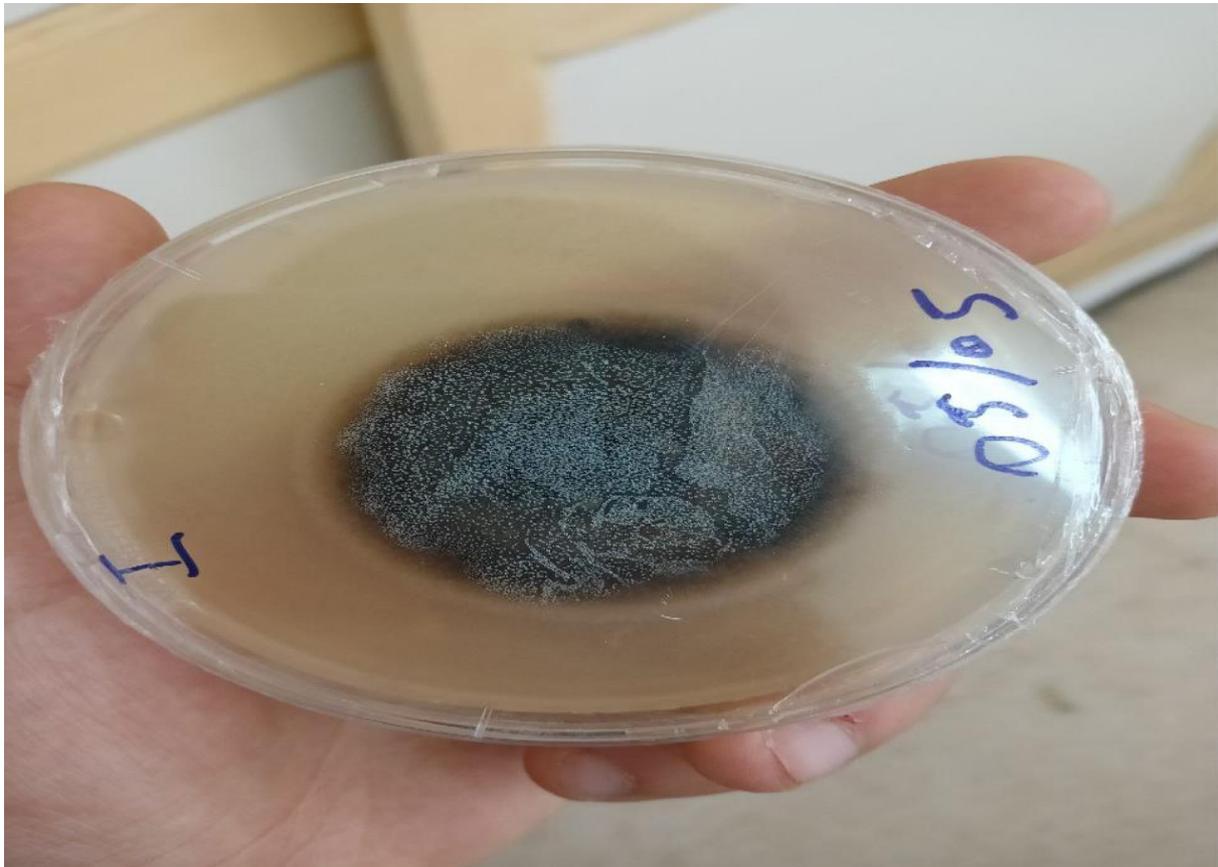
Annexe 2



Annexe 3



Annexe 4



Annexe 5

Coté Bioinformatique :

The screenshot shows the NCBI Genomes website interface. At the top, it says "National Library of Medicine National Center for Biotechnology Information". Below that is a search bar with the text "Search NCBI...". The main heading is "Genome" with a sub-heading "Search by taxonomic name or ID, Assembly name, BioProject, BioSample, WGS or Nucleotide accession". There is a search input field with a "Search" button. Below the search bar, there are example search terms: "Homo sapiens", "GCF_000001405.40", "PRJNA459243", "SAMN15960293", "WFKY01", "GRCh38.p14", "NC_000913.3".

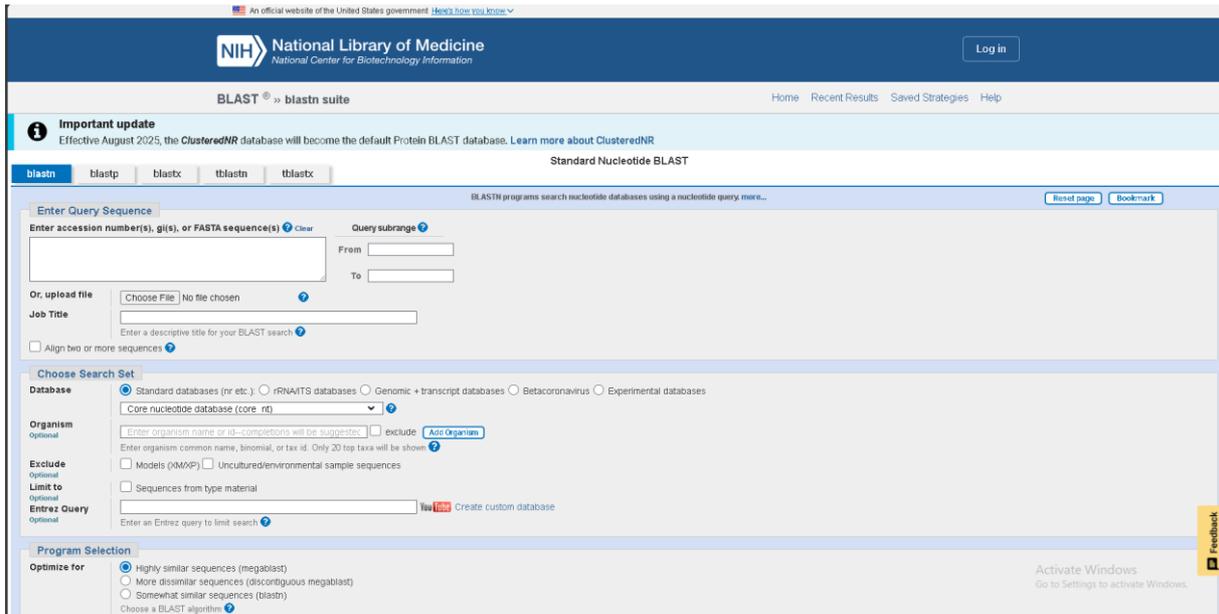
Below the search bar, there is a section titled "Genomic data available from NCBI Datasets" with a link to learn more. To the right of this section is a box labeled "All Genomes" containing three circular statistics:

Category	Value
Total	3.05M
Reference	40.95K
Annotated	2.46M

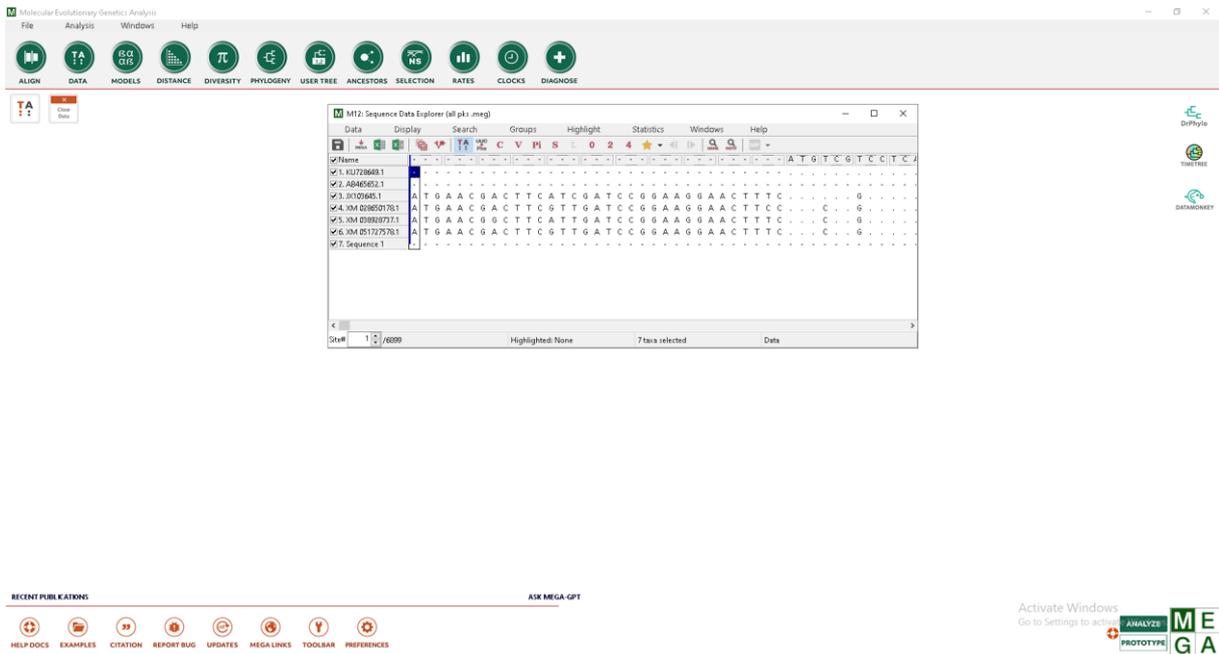
On the left side of the "All Genomes" box, there are three categories: Eukaryota, Archaea, and Bacteria, each with a corresponding icon. At the bottom right of the page, there is a "Feedback" button and a "Windows" notification.

Annexe 6

Annexes



Annexe 7



Annexe 8

Annexes

all pks_nucleotide-composition.txt

```

1
2 Data Filename: all pks_mseg
3 Data Title: 57 pks complete allignment
4 Nucleotide Frequencies
5 Sites Used: All selected
6 All frequencies are given in percent.
7 Domain: Data
8
9 T(0) C A G Total T-1 C-1 A-1 G-1 Pos #1 T-2 C-2 A-2 G-2 Pos #2
10 KU728649.1 23.7 26.9 23.1 26.4 6833 26.4 26.5 27.7 19.4 2283 26.1 30.3 18.1 25.5 2285 19.
11 AB465652.1 22.1 24.4 29.4 24.1 340 15.9 31.0 25.4 17.7 113 22.8 21.9 25.9 26.3 114 27.
12 JX103645.1 24.7 25.1 24.3 24.9 6879 27.4 25.2 28.4 19.1 2492 27.9 29.5 20.1 25.7 2293 19.
13 XM 028650178.1 24.4 26.1 24.4 25.0 6783 26.8 25.5 28.4 19.3 2240 27.6 29.4 20.3 22.7 2261 19.
14 XM 038928737.1 24.6 25.1 24.5 24.8 6783 27.3 25.1 28.5 19.2 2240 27.6 29.7 20.2 22.5 2261 19.
15 XM 051727578.1 24.4 26.2 24.3 25.0 6783 27.0 25.4 28.4 19.2 2240 27.6 29.7 20.1 22.6 2261 19.
16 Sequence 1 0.0 0.0 0.0 0.0 0 0.0 0.0 0.0 0.0 0 0.0 0.0 0.0 0.0 0 0.0
17 Avg. 24.3 26.3 24.2 25.2 4917.3 26.9 25.6 28.3 19.2 1638.3 27.3 29.6 19.9 23.2 1639.3
18

```

Annexe 9

Inferred Ancestral Sequences

Ancestral states were inferred using the Maximum Likelihood method [1] and TN93 model [2]. The tree shows a set of possible nucleotides (states) at each ancestral node based on their inferred likelihood at site 1. The set of states at each node is ordered from most likely to least likely, excluding states with probabilities below 5%. The initial tree for the heuristic search was selected by choosing the tree with the superior log-likelihood between a Neighbor-Joining (NJ) tree [3] and a Maximum Parsimony (MP) tree. The NJ tree was generated using a matrix of pairwise distances computed using the Tamura-Nei (1993) model [2]. The MP tree had the shortest length among 10 MP tree searches, each performed with a randomly generated starting tree. The analytical procedure encompassed 6 coding nucleotide sequences using 1st, 2nd, 3rd, and non-coding positions with 6,899 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA6 [2, 4] utilizing up to 4 parallel computing threads.

1. Nei M. and Kumar S. (2000). Molecular Evolution and Phylogenetics. Oxford University Press, New York.
2. Tamura K. and Nei M. (1993). Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution* 10:512-526.
3. Saitou N. and Nei M. (1987). The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Annexe 10

Annexes

Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) interface showing the Sequence Data Explorer window. The window displays a multiple sequence alignment of CEP112 complete alignment sequences. The alignment is shown in a grid format with columns representing nucleotide positions and rows representing individual sequences. The sequences are labeled with accession numbers and sequence identifiers.

Recent Publications: ASK MEGA GPT

Activate Windows: Go to Settings to activate Windows.

Annexe 11

Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) interface showing the Text File Editor and Format Converter window. The window displays the nucleotide composition data for CEP112 complete alignment sequences. The data is presented in a table format with columns for nucleotide counts and percentages.

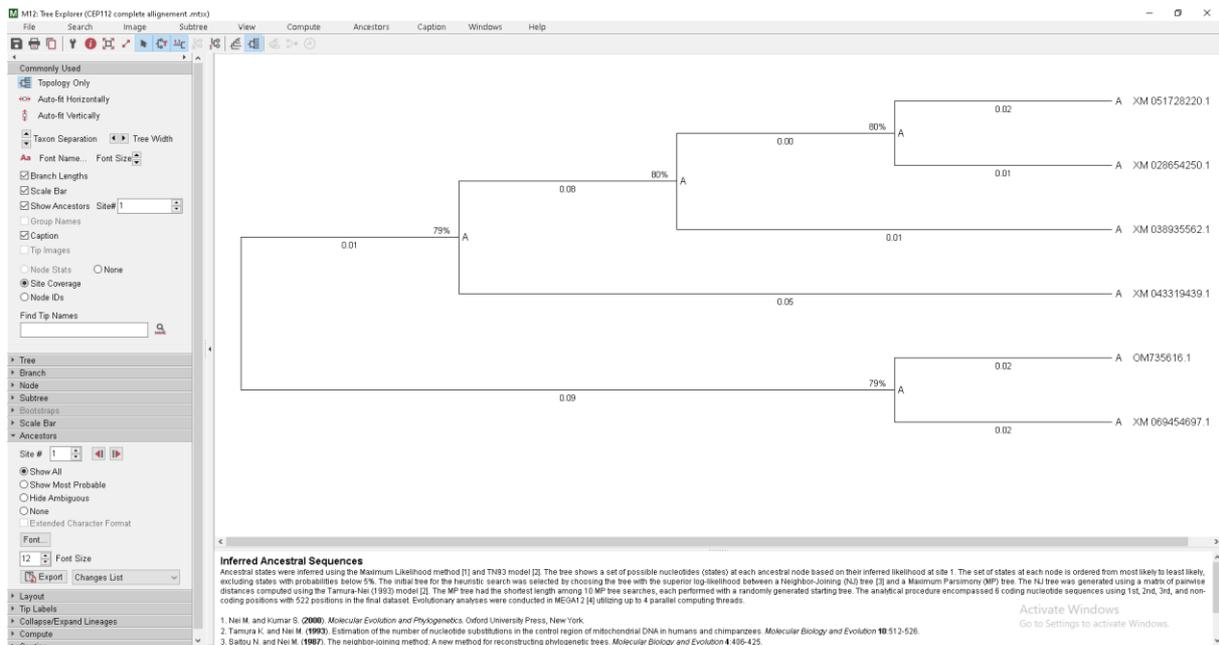
	T(%)	C	A	G	Total	T-1	C-1	A-1	G-1	Pos #1	T-2	C-2	A-2	G-2	Pos #2	T
735516.1	21.4	33.1	20.7	24.8	513	21.2	34.1	25.9	38.8	170	23.3	31.4	29.1	16.3	172	19.9
051728220.1	20.2	32.9	21.2	25.7	420	15.0	13.6	30.0	41.4	140	20.0	33.6	30.0	16.4	140	25.7
069454697.1	20.3	36.0	19.3	24.4	414	18.2	14.6	28.5	38.7	137	23.7	33.8	28.1	14.4	139	18.8
018953582.1	20.0	33.3	21.0	25.7	420	15.0	13.6	30.0	41.4	140	20.0	34.3	30.0	15.7	140	25.0
04319439.1	19.7	38.1	19.4	22.8	417	19.4	15.8	27.3	37.4	139	21.6	36.0	29.3	12.9	139	18.0
028654250.1	19.5	34.0	20.3	26.0	420	15.0	13.6	29.3	42.1	140	19.3	35.0	29.3	16.4	140	24.3
sequence 1	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0	0.0	0.0	0.0	0	0.0
g.	20.2	34.5	20.4	24.9	372	17.4	14.2	28.4	40.0	123.7	21.4	33.9	29.3	15.4	124.3	21.1

Recent Publications: ASK MEGA GPT

Activate Windows: Go to Settings to activate Windows.

Annexe 12

Annexes



Annexe 13

République Algérienne Démocratique et Populaire Ministère de l'Enseignement Supérieur
et de la Recherche Scientifique Université Saad Dahleb - Blida 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département Sciences Biologiques

Mémoire de fin d'études

Présenté en vue de l'obtention d'un diplôme de : Master 2

Spécialité : Génétique

Thème :

**Caractérisation morphologique et analyse génomique in silico
d'Alternaria spp :
étude de la virulence de l'alternariose de la tomate et de la
pomme de terre**

Présenté par :

HAZLOUNE YOUNES

ZERROUK OUALID

Soutenu le 10/07/2025 devant le jury composé de :

Présidente	Dr. SIFI M	MCA
Promotrice	Dr. BELKHITER S	MCB
Examinatrice	Dr. BENMANSOUR N	MCB