



UNIVERSITÉ
DE BISKRA

Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté de la nature, de la vie, des sciences de la terre et de l'univers
Département des Sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence / 2025

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Microbiologie appliquée

Présenté et soutenu par :
Kraba Chourouk & Lannak Iman

Le : mercredi 18 juin 2025

Analyses moléculaires de la sous famille Pezotettiginae à partir des données de BOLD System

Jury :

Titre	Zeroual Samir	MCA	Université de Biskra	Président
Mme.	Medjadba Aicha	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Titre	Ziane laiadi	Pr	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2024/2025

Remerciement

Je tiens d'abord à exprimer ma gratitude envers **Dieu**, le Clément, le Miséricordieux, dont la bienveillance a guidé et soutenu chacune des étapes de ce travail.

Je tiens tout d'abord à exprimer ma profonde gratitude à Madame **Medjadba aïcha**, ma directrice de mémoire, pour son encadrement exceptionnel, ses précieux conseils et sa disponibilité tout au long de ce travail. Son expertise, sa rigueur académique et ses encouragements ont été d'une aide inestimable pour la réalisation de ce mémoire.

Je souhaite également remercier chaleureusement les **membres respectés du jury**, pour avoir accepté d'évaluer ce travail et pour leurs remarques constructives qui ont grandement contribué à l'amélioration de cette recherche. Leurs suggestions avisées ont enrichi ma réflexion et m'ont ouvert de nouvelles perspectives.

Ma reconnaissance s'étend à **l'ensemble des enseignants du département** des sciences de la nature et de la vie qui ont contribué à ma formation académique et m'ont transmis leur savoir avec dévouement.

Un moment empreint d'émotion pour **tout étudiant en master** est celui où il rédige ses remerciements. Ce geste symbolise l'approche de l'aboutissement d'un long parcours, une étape marquante et réjouissante. Les recherches présentées dans ce mémoire ont été conduites au sein de l'université Mohamed Khider de Biskra, et leur réalisation n'aurait pu être possible sans l'appui précieux de nombreuses personnes que je tiens à honorer ici.

Finalement, je souhaite une bonne lecture à tous ceux et à toutes celles qui auront ce document entre les mains un jour ou l'autre.

Dédicace

Au nom d'Allah, le Tout Miséricordieux, le Très Miséricordieux

Louange à Allah par la grâce duquel les bonnes œuvres s'accomplissent, et par Sa faveur que les espoirs et les objectifs se réalisent.

Je dédie ce modeste effort à :

Ma tendre mère

(Qu'Allah la préserve et la protège), mon refuge sûr, la main d'Allah qui ne lâche jamais la mienne. Ce travail n'aurait jamais vu le jour sans tes prières sincères et ta patience inépuisable.

À l'âme de mon père

Votre absence m'a appris que l'amour ne meurt jamais, toi qui as planté en moi les graines du savoir et des bonnes manières, j'espère avoir élevé ainsi ton rang dans les hauteurs du Paradis.

À l'âme de mon grand-père et mon grand-père que dieu vous guérisse

Vous avez été mon soutien et mon réconfort.

À mes grand-mères et ma grande famille

Merci pour votre amour et votre présence qui ont été ma force

À mes frères et ma sœur

AbdeRaoufe ma force et ma fierté

Moudjibe Arrahmene mon confident et complice et mon soutien

AbdArrahmane ma joie et mon rayon de soleil

Namarik Ô joie de mon cœur et bénédiction de ma vie

Mes amis,

Mes compagnons de route et mon soutien à chaque étape, merci pour votre présence et vos encouragements qui ont illuminé mon chemin.

Enfin, à tous ceux qui ont contribué, de près ou de loin, à l'aboutissement de ce parcours. À ceux qui m'ont soutenu par une parole réconfortante, une présence discrète ou une simple pensée bienveillante. Votre encouragement, fût-il le plus modeste, a laissé une empreinte précieuse sur ce chemin. Cette réussite est aussi la vôtre, car chaque mot, chaque geste a tissé l'histoire de cette victoire.

<< Chourouk >>

Dédicace

Après avoir loué Dieu Tout-Puissant, je dédie ce travail modeste à celles et ceux qui, par leur amour, leur soutien ou leur souvenir, ont été les piliers de mon parcours.

À mes chers parents, **Tayeb** et **Razika**, merci d'avoir été la source de ma force et de mon inspiration. Mon père, ta droiture silencieuse et tes prières discrètes m'ont guidé avec sagesse. ma mère, ton amour infini et ta tendresse constante ont soutenu chacun de mes pas.

Votre présence, même silencieuse, a toujours été essentielle. Que Dieu vous protège et vous récompense. Je vous dédie cette réussite avec tout mon amour et ma profonde gratitude.

À mes frères **Abdallah Elmouatasse**, **Mahieddine** et **Chams Eddine**, pour leur présence fraternelle et leur soutien moral constant. À mes sœurs **Aya** et **Ala Errahmene**, pour leur tendresse, leur bienveillance et leur soutien inestimable.

À mon époux **Hammî Abd elHak**, mon soutien indéfectible, mon compagnon fidèle, pour son amour, sa compréhension et sa patience tout au long de ce chemin.

À ma seconde famille, la famille de mon mari, et tout particulièrement **Hocine** et **Akila**, pour leur accueil chaleureux, leur générosité et leur accompagnement sincère.

À la mémoire de mes deux grand-mères chéries, **Safia** et **Khadhra**, dont l'amour et les prières continuent d'habiter mon cœur. Que Dieu leur accorde Sa miséricorde et les accueille en Son vaste paradis.

À mes chères amies, merci du fond du cœur pour les moments de soutien, les sourires sincères et chaque mot bienveillant qui a été un baume tout au long de ce parcours. surtout à mon amie fidèle, **Kraba Chourouk**, qui m'a accompagnée avec son grand cœur et sa sincérité constante, partageant avec moi joies et peines. Elle a été comme une sœur, un refuge à chaque étape.

Et enfin, à ma fille, mon trésor, **Watine**, qui a partagé avec moi en silence ce chemin, grandissant doucement en moi, témoin discret de chaque fatigue, chaque espoir et chaque ambition. Elle a été ma lumière intérieure et ma plus belle force. À vous tous, j'adresse ma gratitude la plus profonde et vous dédie cette réussite de tout cœur.

<< Imane >>

Table de matière

Remerciements	
Dédicaces	
Tableaux.....	I
Liste des figures.....	II
Liste des abréviations	III
Introduction	1

Synthèse bibliographique

Chapitre 01 :*Pezotettiginae*

I.Pezotettiginae	3
I.1. Généralités	3
I.2. Caractéristiques morphologiques.....	3
I.2.1. Le genre <i>Pezotettix</i> Burmeister,1840.....	5
I.2.1.1. <i>Pezotettix giornae</i>	5
I.2.2. Le genre <i>sphynophyma</i>	5
I.2.2.1. <i>Sphynophyma rugulosa</i>	5
I.3. Habitat.....	6
I.4. Répartition géographique	6

Chapitre 02 : Phylogénie et barcode moléculaire

II. Phylogénie et Barcode moléculaire.....	7
II.1. Le DNA Barcoding.....	7
II.1.1 Définition et fondement	7
II.1.2. Principe.....	7
II.1.3. Importance du DNA barcoding	7
II.2. La phylogénie.....	8
II.2.1. Généralités.....	8
II.2.2. L'arbre phylogénétique.....	8
II.2.2.1. Anatomie de l'arbre phylogénétique.....	9
II.2.2.2. Différentes représentations graphiques des arbres phylogénétique.....	9
II.2.2.2. Différents arbres phylogénétique.....	10
II.2.2.4. Construction de l'arbre phylogénétique.....	10
II.2.2.5. Méthode de Construction.....	11

II.3. Délimitation des espèces.....	12
II.3.1. Définition des espèce.....	12
II.3.2.Méthode de délimitation.....	12
II.3.2.1.Méthodes heuristiques.....	12
II.3.2.2. Méthode paramétriques.....	14
II.4. Phylogénie de la sous famille Pezotettiginae.....	14

Partie expérimentale

Chapitre 03 : Matériel et Méthodes

III.Matériel et Méthodes.....	15
III.1. Position phylogénétique de la sous-famille Pezotettiginae au sein de la famille Acrididae...	15
III.1.1 Téléchargement des séquences.....	15
III.1.1.1. BOLDsystems.....	15
III.2. Construction de l'arbre phylogénétique.....	18
III.3. Visualisation et la lecture d'un arbre phylogénétique.....	22
III.4. Relations évolutives au sein de la sous famille Pezotettiginae.....	23
III.5. Délimitation des espèces.....	23
III.5.1. ASAP(Assemble Species Automatic Partitioning).....	23
III.5.2. ABGD(Automatic Barcode Gap Discovery).....	24
III.5.3. mPTP(modèle multi-rate Poisson Processes.....)	25
III.5.4. bPTP(Bayesian Poisson Tree Process.....)	25

Chapitre 04: Résultats et Discussion

IV. Résultat et discussion.....	27
IV.1. Données relatives aux séquences étudiées.....	27
IV.1.1. Séquences de la sous famille Pezotettiginae analysées	27
IV.1.2. Séquences comparatives issues d'autres sous famille de la famille Acrididae.....	31
IV.2. Position phylogénétique de Pezotettiginae au sein de la famille Acrididae.....	32
IV.2.1. Monophylie ou paraphylie de Pezotettiginae.....	36
IV.2.2. Position au sein des Acrididae	37
IV.Reconstruction des relations évolutives intra-groupe de la sous famille Pezotettiginae.....	38
IV.3. Identification et délimitation moléculaire des espèces au sein de la sous-famille Pezotettigina.....	43
Conclusion.....	47
Références bibliographiques.....	48

Liste de tableaux

Tableau 01. Les statistiques relatives à la sous-famille Pezotettiginae.....	3
Tableau 02. Répartition géographique et morphologie chez les espèces du genre <i>Pezotettix</i>	4
Tableau 03. Données taxonomiques et génétiques relatives aux séquences étudiées de la sous-famille Pezotettiginae.....	31
Tableau 04. Données taxonomiques et génétiques relatives aux séquences étudiées de la famille d'Acrididae.....	34

Liste de figures

Figure 01. Morphologie externe de <i>Pezotettix</i>	4
Figure 02. Morphologie externe de <i>Pezotettix giornae</i>	5
Figure 03. Répartition géographique de la sous-famille Pezotettiginae.	6
Figure 04. Exemple d'un arbre phylogénétique.	9
Figure 05. Différents arbres phylogénétiques (a) arbre non raciné (b) arbre raciné.	10
Figure 06. Page d'accueil BOLD version 5.	16
Figure 07. Recherche des séquences de «Pezotettiginae» dans BOLD.	17
Figure 08. Exemple d'un Fichier Format Fasta.	17
Figure 09. Interface de la plateforme NG-Phylogeny.	18
Figure 10. Les étapes de construction de l'arbre phylogénétique.	19
Figure 11. Les logiciels choisis pour la réalisation des étapes de construction de l'arbre phylogénétique.	21
Figure 12. La fenêtre de configuration de « workflow ».	22
Figure 13. Fenêtre des résultats d'analyse sur le serveur Galaxy.	23
Figure 14. Interface de plateforme ASAP.	24
Figure 15. Interface de plateforme ABGD.	24
Figure 16. Interface de plateforme mPTP.	25
Figure 17. Interface de plateforme bPTP.	26
Figure 18. Arbre phylogénétique du Mr Bayes déduit pour la famille des Acrididae. L'arbre est enraciné sur <i>Tmethis cisti</i> comme outgroup.	34
Figure 19. Arbre phylogénétique du maximum de vraisemblance (ML) déduit pour la famille des Acrididae. L'arbre est enraciné sur <i>Tmethis cisti</i> comme outgroup.	36
Figure 20. Arbre phylogénétique du Mr Bayes déduit pour la sous famille Pezotettiginae. L'arbre est enraciné sur <i>oedipoda munita</i> comme outgroup.	41
Figure 21. Arbre phylogénétique du maximum de vraisemblance déduit pour la sous famille Pezotettiginae. L'arbre est enraciné sur <i>oedipoda munita</i> comme outgroup.	43
Figure 22. Résultats de l'analyse de délimitation des Pezotettiginae sur l'arbre phylogénétique : Les barres de couleur à droite de chaque clade représentent les mOTUs obtenus par les méthodes de délimitation : ASAP et ABGD, bPTP et mPTP et Bptp (les partitions obtenus par l'ASAP, ABGD et PTP sont totalement compatible avec les BINs du system BOLD).	44

Liste de abréviations

BOLD: Barcode of Life Data Systems.

COI: Cytochrome Oxidase I.

bp: Base Pair.

BIN: Barcode Index Number.

ML: Maximum Likelihood.

BI: Bayesian Inference.

NJ: Neighbor-Joining.

MP: Maximum Parsimony.

GTR: General Time Reversible.

ABGD: Automatic Barcode Gap Discovery.

ASAP: Assemble Species by Automatic Partitioning.

GMYC: Generalized Mixed Yule Coalescent.

PTP: Poisson Tree Processes.

bPTP: Bayesian Poisson Tree Processes.

mPTP: multi-rate Poisson Tree Processes.

BFD: Bayes Factor Delimitation.

OSF : Orthoptera Species File.

NCBI : National Center for Biotechnology Information.

FASTA : Format de fichier pour les séquences d'ADN ou de protéines.

NG-Phylogeny: Next Generation Phylogeny.

MrBayes : Mister Bayesian Inference Profram.

PhyML: Phylogenetic Estimation using Maximum Likelihood .

iTOL: Interactive Tree of Life.

ADN: Acide Désoxyribonucléique.

UPGMA: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Me.

BMGE: Block Mapping and Gathering with Entropy.

Introduction

La sous-famille *Pezotettiginae* (Brunner von Wattenwyl, 1893), classée au sein de la famille des *Acrididae* (ordre des Orthoptères), constitue un petit groupe taxonomique mais fascinant d'acridiens, elle est représentée principalement par le genre type *Pezotettix* (Burmeister, 1840). Historiquement, cette sous-famille a été marquée par une nomenclature complexe, avec des synonymes tels que *Pezotettigini* et *Platyphymata* (Cigliano et al., 2025). Actuellement, seuls deux genres sont reconnus comme valides : *Pezotettix* et *Sphenophyma* (Uvarov, 1934 ; Cigliano et al., 2025), reflétant une diversité morphologique et écologique encore méconnue.

Initialement, le genre *Pezotettix* était classé parmi les *Catantopinae*, un groupe hétérogène de genres aux caractéristiques disparates (Uvarov, 1970). Cependant, les études phylogénétiques récentes (Chapco, 2013) ont montré que *Pezotettix* devait être reclassé dans une sous-famille distincte, les *Pezotettiginae*, une perspective désormais adoptée par les références majeures telles que le Orthoptera Species File (OSF, version 5.0) et (Defaut et Morichon, 2015).

Malgré ces avancées, les *Pezotettiginae* demeurent un groupe insuffisamment étudié, avec des lacunes persistantes concernant leur évolution, leur diversité génétique et leur rôle écologique. Les méthodes traditionnelles de taxonomie morphologique, bien que fondamentales, montrent leurs limites face à la complexité des relations phylogénétiques au sein de ce groupe. L'émergence d'outils moléculaires, tels que le barcoding ADN et les analyses phylogénétiques, offre désormais une opportunité unique d'éclaircir ces relations et de résoudre des questions taxonomiques de longue date. Dans ce contexte, comment les données génétiques, notamment celles issues du gène mitochondrial COI, peuvent-elles permettre de mieux comprendre la diversité, les relations évolutives et la position systématique de ce groupe au sein des *Acrididae* ?

Cette recherche s'inscrit dans une démarche visant à comprendre la structure phylogénétique et la taxonomie des espèces de *Pezotettiginae*, en s'appuyant sur les données génétiques disponibles dans la base de données BOLD Systems. À travers l'analyse des séquences du gène mitochondrial COI, considéré comme un marqueur standard dans les études de barcoding moléculaire du règne animal, ce travail vise à découvrir où se situe la sous-famille *Pezotettiginae* au sein de la famille des *acrididae*, à reconstruire les relations phylogénétiques entre les espèces de ce groupe, à identifier leurs lignées majeures et à évaluer l'efficacité d'un ensemble de méthodes de délimitation des espèces.

Notre travail est structuré en deux grandes parties : l'une bibliographique, l'autre expérimentale.

- La partie bibliographique comprend deux chapitres :
 - Le premier chapitre est consacré aux généralités sur la sous-famille Pezotettiginae, abordant sa systématique, sa répartition et ses caractéristiques principales.
 - Le deuxième chapitre propose un aperçu sur la phylogénie moléculaire et le concept de DNA barcoding, en exposant les bases théoriques et les outils méthodologiques utilisés dans ce domaine.
- La partie pratique se compose également de deux chapitres :
 - Le troisième chapitre décrit en détail le matériel utilisé et les méthodes appliquées, incluant les étapes de collecte, de traitement des données et d'analyse phylogénétique.
 - Le quatrième et dernier chapitre présente les résultats obtenus, issus de l'analyse des arbres phylogénétiques et des différentes méthodes de délimitation d'espèces, suivis de leur interprétation et discussion.

Enfin, le mémoire se termine par une conclusion générale et des perspectives de recherche.

Première partie :
Synthèse bibliographique

Chapitre 01 :
Pezotettiginae

I. Pezotettiginae

I.1. Généralités

La sous-famille Pezotettiginae, décrite par Brunner von Wattenwyl en 1893, appartient à la famille des Acrididae dans l'ordre des Orthoptera. Elle est représentée par un groupe restreint de criquets dont le genre type : *Pezotettix* Burmeister, 1840, constitue la référence taxonomique principale du groupe. Le statut nomenclatural de Pezotettiginae est marqué par une diversité de synonymes historiques, parmi lesquels figurent Pezotettigini, Pezotettiges et Platyphymata, qui ont été employés dans la littérature entomologique au fil des décennies. Ces noms ont été établis par Brunner von Wattenwyl lui-même, bien que certains soient aujourd'hui considérés comme non valides (Tableau 01) (Cigliano et al., 2025 ; Brunner, 1893 ; Bolivar, 1876).

Tableau 01. Les statistiques relatives à la sous-famille Pezotettiginae (Cigliano et al., 2025).

Rang	Noms total	Valide	Invalide
Sous-famille	4	1	3
Tribu	0	0	0
Genre	7	2	5
Espèces	27	10	17

La sous-famille Pezotettiginae inclut seulement deux genres valides reconnus: *Pezotettix* Burmeister 1840 et *Sphenophyma* Uvarov, 1934 (Chapco, 2013). Le genre principal, *Pezotettix* Burmeister, 1840, a également été désigné sous divers noms synonymes, dont *Pegotettix*, *Pelecycleis*, *Pelecyclus*, *Pezotettis* et *Platyphyma*. En outre, le genre *Sphenophyma*, décrit par Uvarov en 1934, inclut notamment l'espèce *Sphenophyma rugulosa* (Bolívar, 1876), soulignant la diversité taxonomique et les révisions synonymiques associées à ce groupe.

I.2. Caractéristiques morphologiques

Les Pezotettiginae se distinguent par un ensemble de caractéristiques morphologiques spécifiques. L'un des traits les plus notables est la présence d'un tubercule nettement carré situé entre les hanches antérieures. Ce sont généralement de petites espèces, à la coloration dominante grise ou brune, ce qui leur permet un bon camouflage dans les habitats secs. Elles sont typiquement localisées en plaine et se rencontrent rarement au-delà de 300 mètres d'altitude (Bonifait, 2024).

I.2.1. Le genre *Pezotettix* Burmeister, 1840

Se distingue par un prosternum orné d'un tubercule en forme d'écusson aplati. Les individus présentent une coloration allant du brun jaunâtre au brun noir tacheté. Les tegmina

(ailes antérieures) sont courts, ovales et fortement réduits, ce qui classe l'espèce comme squamiptère. Il s'agit d'un petit criquet, le mâle mesurant entre 11 et 14 mm, et la femelle entre 13 et 17 mm. On observe fréquemment des individus en accouplement. Une autre particularité est la présence de deux taches brunes, plus ou moins nettes, sur la face interne des fémurs postérieurs (Figure01). Contrairement à d'autres membres de la sous-famille, *Pezotettix* fréquente de préférence les milieux humides, notamment les prairies mésophiles (Chopard, 1922; Chopard, 1943; Derreumaux, 2014., Louveaux et *al.*, 2023).



Figure 01. Morphologie externe de *Pezotettix* (Louveaux et *al.*,2023).

Le genre *Pezotettix* comprend beaucoup d'espèces et des études morphologiques approfondies sont nécessaires pour identifier les espèces confondues. Il semble qu'il existe des espèces à cerques pointus et des espèces à cerques élargis (Uvarov, 1934).

Selon Cigliano et *al.* (2025), ce genre est actuellement constitué de neuf espèces validées parmi lesquelles *P. giornaie* et *P. anatolica* se distinguent par leur large répartition géographique et l'abondance des travaux scientifiques qui leur sont consacrés (Tableau 02).

Tableau 02. Répartition géographique et morphologie chez les espèces du genre *Pezotettix*

Espèces	Type de cerque	Localité de découverte	Références
<i>Pezotettix giornaie</i> (Rossi, 1794)	pointus	Italie	(Louveaux et <i>al.</i> , 2025)
<i>Pezotettix platycerca</i> (Stål, 1876)	élargis	Lebanon: Beirut	(Uvarov, 1934)
<i>Pezotettix curvicerca</i> Uvarov, 1934	pointus	Palestine	(Uvarov, 1934)
<i>Pezotettix judaica</i> Uvarov, 1934	élargis	Palestine	(Uvarov, 1934)
<i>Pezotettix anatolica</i> Uvarov, 1934	élargis	L'ouest d'Anatolie, Syrie	(Uvarov, 1934)
<i>Pezotettix lagoi</i> Jannone, 1936	élargis	Grèce (mont Profitis)	(Dirsh, 1949; OSF)
<i>Pezotettix cotti</i> Dirsh, 1949	élargis	lebanon	(Dirsh, 1949)
<i>Pezotettix cypria</i> Dirsh, 1949	élargis	Cyprus	(Dirsh, 1949)
<i>Pezotettix sorbinii</i> Massa & Fontana, 1998	élargis	proche de Amman	(Katbeh-Bader, 2001)

1.2.1.1. *Pezotettix giornae*

Décrite initialement par Pietro Rossi en 1794 sous le nom de *Gryllus giornae* et a fait l'objet de multiples études taxonomiques et morphologiques. Il s'agit d'une petite espèce trapue, voire ventrue, qui est parfois confondue avec des jeunes. Elle présente une coloration grise ou brunâtre. Les antennes sont courtes. Une bande sombre est souvent présente sur la tête, en arrière de l'œil, et prolongée sur les lobes latéraux du pronotum. Le tubercule prosternal est en forme d'écusson de section carrée. Les tegmina sont ovales, très courts et sans bande claire. Les ailes sont réduites à la moitié des tegmina. La face interne des fémurs postérieurs présente deux ou trois taches noires, également visibles sur la carène supérieure. Les tibias sont testacés, bleuâtres à l'apex, parfois rouge (Figure02). Le mâle a des cerques coniques et aigus à l'apex, un peu aplatis latéralement (Chopard, 1943 ; Chopard, 1951 ; Louveaux et *al.*, 2023).

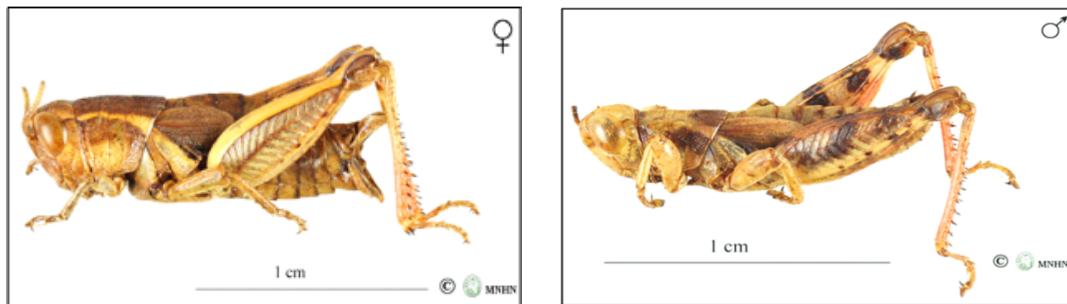


Figure 02. Morphologie externe de *Pezotettix giornae* (Louveaux et *al.*, 2023).

1.2.2. Le genre *Sphenophyma*

D'après Uvarov (1934), ce genre est proche à *Pezotettix Burmeister*, 1840 et *Paraconophyma* (Uvarov, 1921) de la sous famille Cathantopinae, mais différant des deux par la forme du tubercule prosternal qui est bas, transversal, en forme de coin émoussé, avec l'apex légèrement concave. La carène pronotale médiane fortement surélevée et le corps rugueux, ce qui le rapproche superficiellement d'un petit membre de la sous-famille des Pamphaginae. Antennes filiformes, légèrement aplaties à la base. Les Organes génitaux externes mâles du même type que chez *Pezotettix giornae*. Femelle plaque sous-génitale légèrement épaissie, avec l'apex proéminent, bilobé. Une seule espèce d'Asie centrale est connue (Uvarov, 1934 ; Bei-Bienko et Mishchenko, 1951).

1.2.2.1. *Sphenophyma rugulosa*

Il est certain que *Sphenophyma rugulosa* ne peut être considérée comme congénère des autres espèces regroupées dans le genre *Pezotettix*. La différence réside principalement dans la structure du tubercule prosternal qui, chez *Pezotettix*, est fortement incliné vers l'arrière, de sorte que sa face postérieure n'est pas visible lorsque l'insecte est observé de dessous ; de plus, le bord du tubercule est beaucoup plus arrondi chez *Pezotettix* que chez *Sphenophyma*. L'aspect

général de *Sphenophyma* est celui d'un *Pamphagidé* en raison de sa carène pronotale élevée et de son corps rugueux (Annexes 01). Il existe une affinité considérable entre *Sphenophyma* et les criquets des montagnes indiennes du genre *Paraconophyma*, mais les différences dans la structure de la tête, du pronotum et du prosternum sont très importantes (Uvarov, 1934 ; Bei-Bienko et Mishchenko, 1951).

I.3. Habitat

Les espèces appartenant à la sous-famille des Pezotettiginae occupent principalement des habitats ouverts, secs et ensoleillés, qui sont typiques des environnements méditerranéens et semi-arides. Ces espèces se développent sur des substrats rocheux ou sableux, où la végétation est clairsemée, composée essentiellement de graminées et de légumineuses. Ces espèces jouent un rôle écologique important en tant que consommateurs primaires et proies pour de nombreux prédateurs (oiseaux, reptiles, petits mammifères). Il a été démontré que leur sensibilité aux perturbations environnementales fait d'eux d'excellents indicateurs de l'état de conservation des milieux naturels (Chopard, 1943 ; Defaut, 1999 ; Chapco, 2013).

I.4. Répartition géographique

La Figure 03 représente une distribution principalement circum-méditerranéenne de la sous-famille des Pezotettiginae. Les données biogéographiques indiquent une forte représentation de ce taxon dans le sud de l'Europe, en Afrique du Nord et en Asie occidentale. Plus précisément, les occurrences s'étendent de la péninsule Ibérique au Caucase, englobant des régions telles que l'Italie, les Balkans, la Grèce, la Turquie et une partie significative du Moyen-Orient, notamment l'Iran. En Afrique, la répartition couvre le Maghreb (Maroc, Algérie, Tunisie) et s'étend jusqu'en Libye. Cette distribution géographique suggère une préférence écologique marquée pour les zones méditerranéennes et semi-arides, caractérisées par un climat à hivers doux et étés chauds et secs (Chopard, 1943 ; Cigliano et al., 2025).



Figure 03. Répartition géographique de la sous-famille Pezotettiginae (Cigliano et al., 2025).

Chapitre 02 :

Phylogénie et barcode moléculaire

II. Phylogénie et barcode moléculaire

II.1. Le DNA barcoding

II.1.1. Définition et fondements

Le Barcoding moléculaire est un principe relativement récent proposé par Hebert (2003), il s'agit d'une méthode taxonomique qui utilise un ou plusieurs marqueurs génétiques courts standardisés dans l'ADN d'un organisme pour l'identifier comme appartenant à une espèce particulière. Cette approche méthodique permet l'identification d'échantillons d'ADN inconnus en les comparant à une bibliothèque de référence (Moritz et Cicero, 2004 ; Zhu et *al.*, 2022)

Le Barcode DNA ou code-barre ADN désigne un fragment d'acide désoxyribonucléique standard présent chez tous les organismes vivants. La séquence de ce fragment d'ADN présente une homologie remarquable entre individus d'une même espèce, facilitant ainsi l'identification espèces-spécifique par la connaissance de cette séquence unique.

Souvent le fragment étudié, chez les animaux, correspond à un gène du génome mitochondrial qui code pour la première sous-unité de la cytochrome oxydase (COI), une protéine impliquée dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Étant donné que chaque cellule contient de nombreuses mitochondries, le gène COI est présent en de multiples copies, facilitant ainsi son séquençage (Puillandre, 2008). Ce gène était déjà utilisé couramment, notamment pour des analyses phylogénétiques (Hebert et *al.*, 2003 ; Frézal et Leblois, 2008).

II.1.2. Principe

L'identification moléculaire des espèces repose sur le concept du code-barres ADN consiste à :

- Séquençage d'un marqueur génétique standardisé, tel que le gène COI chez les animaux.
- Comparaison de la séquence obtenue avec celles contenues dans des bases de données de référence, comme BOLD ou GenBank.
- Identification de l'espèce basée sur la similarité entre la séquence analysée et les séquences de référence (Hebert, 2003 ; Puillandre, 2025).

II.1.3. Importance du DNA barcoding

Le DNA barcoding s'est imposé comme un outil puissant en biologie pour l'identification rapide et précise des espèces, en particulier dans les groupes taxonomiques complexes ou mal connus. Il constitue un complément précieux à la taxonomie morphologique traditionnelle, en offrant une méthode standardisée, reproductible et applicable à toutes les étapes de la vie des

organismes, y compris les stades larvaires ou fragmentaires. De plus, les séquences obtenues peuvent être intégrées à des analyses phylogénétiques ou génétiques plus larges. Toutefois, cette approche présente également certaines limites. Les phénomènes d'hybridation et d'introgession, les risques de contamination de l'ADN, ainsi que les erreurs liées aux technologies de séquençage peuvent affecter la fiabilité des résultats. En outre, la capacité discriminante du marqueur utilisé, notamment le gène COI, peut varier selon les groupes taxonomiques, ce qui peut limiter la résolution dans certains cas (Hebert et *al.*, 2003; DeSalle et Goldstein, 2019).

II.2. La phylogénie

II.2.1. Généralités

La phylogénie, (mot formé à partir du grec ancien phylo-, famille, tribu ; geny, ascendance) en tant que discipline scientifique, se définit comme l'étude de l'histoire évolutive des organismes vivants. La similarité entre des organismes existant à différents niveaux, par exemple en termes de caractéristiques morphologiques ou moléculaires, suggère des relations et une ascendance commune à un moment donné de l'histoire (Christensen et Olsen, 2018).

La phylogénie moléculaire est une discipline bioinformatique fondamentale qui vise à reconstruire les relations de parenté entre des séquences de nucléotides ou d'acides aminés. Elle permet ainsi d'étudier deux types de phénomènes : Les relations de parenté entre les espèces qui portent les séquences en question et l'évolution du génome (Lopez et *al.*, 2002).

Pour reconstruire les relations évolutives entre les organismes à partir de séquences génétiques (ADN, ARN, protéines), la phylogénie moléculaire utilise différentes méthodes d'inférence qui nécessitent de nombreux outils bioinformatiques pour pouvoir traiter toutes les informations. On peut citer notamment MEGA, PHYLIP, PhyML, MacClade, Phylogeny.fr, MrBayes, etc. Chacun de ces outils est adapté à des besoins spécifiques, comme la rapidité, la précision ou l'analyse temporelle. Le choix de l'outil dépend de l'objectif de l'étude et de la qualité et de la quantité des données. Les outils modernes offrent une grande précision, tandis que certains logiciels permettent d'effectuer des analyses rapides et accessibles aux débutants (Choudhuri, 2014).

II.2.2. L'arbre phylogénétique

Un arbre phylogénétique (cladogramme) est un outil de représentation scientifique qui permet de décrire la relation de parenté entre différentes espèces ou groupes d'espèces biologiques. Les espèces les plus apparentées ne se différencient que progressivement au niveau

des dernières ramifications de l'arbre, tandis qu'une origine commune éloignée est représentée par un placement sur des branches significativement divergentes (Darlu et Tassy, 1993).

II.2.2.1. Anatomie de l'arbre phylogénétique

L'arbre phylogénétique se compose de plusieurs composants qui représentent les relations évolutives entre différentes espèces :

- Nœuds : point de divergence représentant un ancêtre commun hypothétique.
- Racine : Point de départ de l'arbre (s'il est enraciné), ancêtre commun à tous les taxons de l'arbre.
- Nœud interne : ancêtres communs à certains sous groups.
- Branches : lignes reliant les ancêtres aux descendants, indiquent l'évolution et le temps ou la distance génétique.
- Feuilles : extrémités représentant les espèce ou groupes actuels (organismes étudiés) (Figure 04) (Choudhuri, 2014).

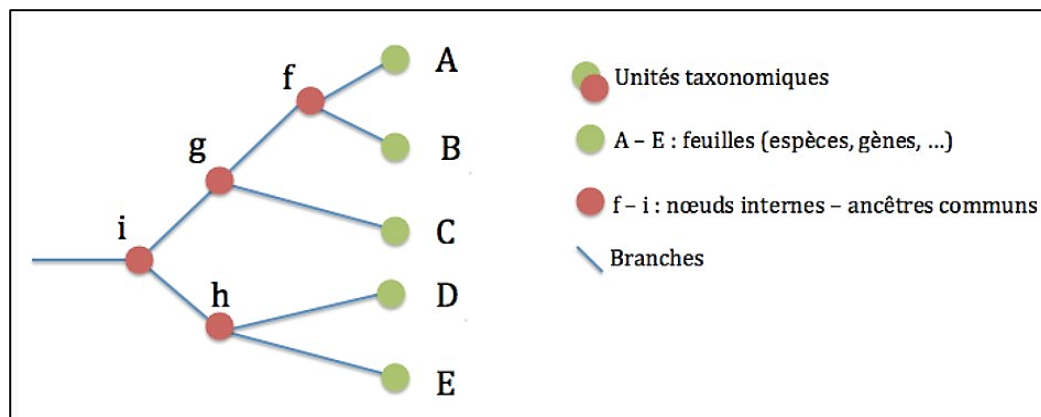


Figure 04. Exemple d'un arbre phylogénétique (Taguan, 2015).

L'arbre phylogénétique permet de lire plusieurs informations importantes :

- a. Groupe monophylétique (clade) :** caractérisé par une descendance commune de tous ses membres. Il partage aussi une branche commune. De nombreux groupes monophylétique différent sont contenus dans un arbre phylogénétique (Darlu et Tassy, 1993).
- b. Groupes polyphylétiques :** Ne renferme pas tous les descendants d'une espèce ancestrale et, par conséquent, n'a pas d'histoire propre ce n'est pas un groupe naturel (Darlu et Tassy, 1993).

II.2.2.2. Différentes représentations graphiques des arbres phylogénétiques

L'arbre phylogénétique est représenté sous trois formes différent par le type d'information qu'ils transmettent, notamment concernant les distances et le temps évolutif :

- a. Phylogramme** : est un arbre phylogénétique où la longueur des branches est proportionnelle à la quantité de changement évolutif (Christensen et Olsen, 2018).
- b. Cladogramme** : est un arbre schématique qui montre uniquement les relations de parenté sans échelle de temps ou de mutations (Christensen et Olsen, 2018).

II.2.2.3. Différents arbres phylogénétiques

Les arbres phylogénétiques peuvent être racines ou non, selon qu'ils intègrent ou non une orientation temporelle de l'évolution :

a. Arbre raciné

Possède un nœud racine unique, ce nœud racine représente l'ancêtre commun le plus récent de tous les taxons étudiés. la racine donne une direction temporelle à l'évolution et permet de distinguer les groupes ancestraux des dérivés (Figure 06b) (Yang, 2006).

b. Arbre non raciné

Il est important de noter que cette représentation ne tient compte que des relations entre les organismes, indépendamment de la direction de l'évolution temporelle. En conséquence, l'analyse des relations évolutives des groupes par rapport au temps en utilisant un arbre non raciné s'avère ardue (Figure 05a) (Yang, 2006).

L'obtention d'un arbre enraciné est idéale, mais la plupart des algorithmes de reconstruction d'arbres phylogénétiques produisent des arbres non enracinés (Choudhuri, 2014).

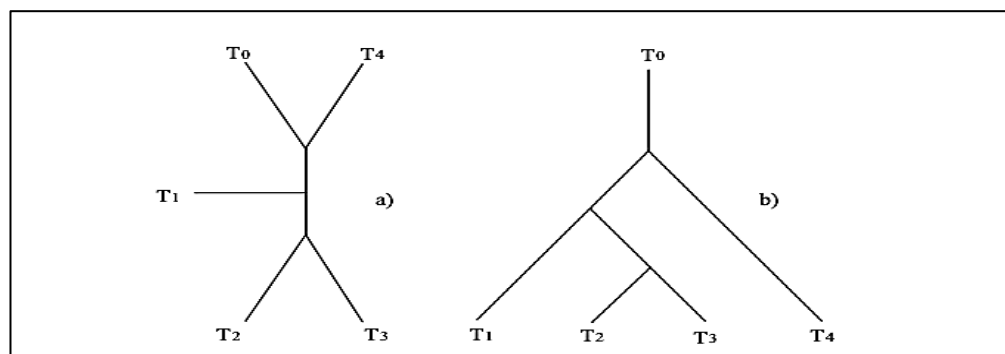


Figure 05. Différents arbres phylogénétiques (a) arbre non raciné (b) arbre raciné (Darlu et Tassy, 1993).

II.2.2.4. Construction de l'arbre phylogénétique

La construction d'un arbre phylogénétique comprend les étapes suivantes :

1. Sélection du marqueur moléculaire approprié (gènes/protéines/ADN mitochondrial) ;

2. Alignement de séquences multiples ;
3. Sélection d'un modèle d'évolution ;
4. Construction de l'arbre phylogénétique ;
5. Évaluation de la fiabilité de l'arbre (Choudhuri, 2014)

II.2.2.5. Méthode de Construction

Les méthodologies d'inférence des arbres phylogénétiques sont catégorisées en deux groupes distincts :

a. Méthodes basées sur la distance : Elles utilisent la matrice de distance évolutive, on trouve :

- La méthode UPGMA (méthode arithmétique des groupes de paire non pondérés) qui est une méthode de matrice de distance la plus simple, elle utilise le clustering séquentiel pour construire un arbre phylogénétique enraciné.
- La NJ (neighbor-joining), créée par Naruya Saitou et Masatoshi Nei en 1987, est un algorithme de clustering agglomératif dont une matrice initiale de distance est construite sur des mesures de similarité entre les séquences. Les utilisateurs choisissent des métriques de distance appropriées en fonction des caractéristiques des données de séquence et de la question de recherche. Puis, un arbre est créé sur la base de la matrice initiale. La matrice de distance est ensuite mise à jour en fusionnant les deux nœuds les plus éloignés. Un nouveau nœud reliant ces deux clusters est alors créé dans l'arbre. Cette étape est répétée jusqu'à ne laisser qu'un seul cluster (Delsuc et *al.*, 2005; Zou et *al.*, 2024).

b. Méthode basée sur les caractères : Ces méthodes sont généralement caractérisées par leur capacité à générer un nombre considérable d'arbres hypothétiques basés sur un algorithme spécifique, En outre, ces méthodes induisent un arbre optimal selon certains critères bien définis, on cite : (Bawono et Heringa, 2014; Zou et *al.*, 2024) :

- La parcimonie maximale (MP) : Cette méthode a été proposée par James S. par Farris et Walter M. Fitch en 1970-1971 est un algorithme basé sur le principe du rasoir d'Occam, qui vise à déduire l'arbre évolutif en minimisant le nombre d'étapes évolutives nécessaires pour expliquer l'ensemble des données.
- La méthode du maximum de vraisemblance (ML) proposée pour la première fois par Felsenstein au début des années 1980, c'est une méthode basée sur des modèles évolutionnaires est sélectionné en fonction des caractéristiques des données séquentielles

étudiées. Les modèles JC69, K80, TN93, HKY85 et GTR sont couramment utilisés. Le modèle JC69 postule que toutes les substitutions de nucléotides se produisent avec une probabilité égale. Le modèle TN93 postule que les transitions et les transversions se produisent à des rythmes distincts. Le modèle GTR postule que la production de tous les nucléotides s'effectue à des fréquences distinctes. Une recherche dans l'espace arborescent est effectuée pour optimiser les paramètres de substitution et les longueurs de branche. La topologie présentant la valeur ML la plus élevée est sélectionnée comme arbre évolutif optimal. (Zou et *al.*, 2024)

- L'inférence bayésienne (IB) Proposée par Bruce Rannala et Yang (2020), a changé la façon d'analyser les séquences génomiques. À la différence des méthodes ML, les méthodes Bayésiennes utilisent des distributions statistiques pour quantifier l'incertitude des paramètres. Un modèle évolutif approprié est d'abord sélectionné pour la séquence étudiée, et les informations a priori sont raisonnablement définies sur la base des connaissances et de l'expérience professionnelles (Bawono et Heringa, 2014; Zou et *al.*, 2024).

II.3. Délimitation des espèces

II.3.1. Définition

La délimitation des espèces est le processus de détermination des taxons c'est-à-dire des groupes d'organismes individuels, qui constituent des différentes populations d'une même espèce. Ainsi la délimitation des espèces permet de distinguer les groupes d'organismes qui constituent des espèces différentes (Rannala et Yang, 2020).

II.3.2. Méthodes de délimitation

Les méthodes de délimitation des espèces se divisent en deux grandes catégories ; heuristiques et paramétriques :

II.3.2.1. Méthodes heuristiques

Ce sont des approches rapides, souvent basées sur des seuils de divergence génétique. Elles ne reposent pas sur des modèles statistiques explicites (Rannala et Yang, 2020).

a. ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery): L'Automatic Barcode Gap Discovery (ABGD) est une méthode statistique qui a pour objet la délimitation des espèces en se basant sur la distribution des distances génétiques intra- et inter-spécifiques cette approche s'inscrit

dans le cadre de l'hypothèse d'existence d'un « barcode gap », c'est-à-dire d'une différence significative entre les distances génétique intra-espèce et inter-espèce (Puillandre *et al.*, 2012).

b. ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning): ASAP est un programme C autonome. Les utilisateurs peuvent utiliser ASAP soit via une interface graphique complète. Cet algorithme hiérarchique fusionne les séquences jusqu'à ce qu'un seul groupe contienne toutes les séquences. La première partition contient plusieurs groupes de séquences et la dernière un seul. Les groupes plus grands sont créés par fusion. Chaque partition est caractérisée par sa probabilité d'être une espèce unique. Ces deux métriques sont combinées dans une crible rapide (Puillandre *et al.*, 2021).

c. GMYC (acronyme de Generalized Mixed Yule Coalescent): GMYC simple dans sa version initiale, est une méthode très répandue permettant de délimiter les espèces à partir de données de séquence. Elle utilise un arbre ultramétrique et tente de détecter la transition dans l'arbre où le schéma de ramification passe d'une spéciation (une lignée par espèce) à une attribution au processus de coalescence intra-espèce (plusieurs lignées par espèce). Par conséquent, pour que cette méthode fonctionne, l'arbre fourni doit être entièrement résolu (sans aucune multiplication) et ultramétrique (toutes les extrémités ont le même âge) (Fujisawa et Barraclough, 2013).

d. PTP (Poisson Tree Process) : Le modèle PTP (Poisson Tree Process) est une méthodologie qui permet d'identifier et de classer les espèces biologiques à l'aide de phylogénies non ultramétriques. Dans le cadre de la modélisation du taux de spéciation, l'ultramétrie ne s'avère pas nécessaire, car la méthode de calcul s'effectue par le biais du nombre de substitutions. Le modèle PTP se caractérise par sa simplicité, sa rapidité et sa robustesse. Elle permet le calcul du nombre d'espèces d'un ensemble de séquences de requêtes placées dans une branche spécifique de la phylogénie de référence. (Zhang *et al.*, 2013).

e. bPTP (Bayesian Poisson Tree Processes): Cette méthode de délimitation des espèces à partir de données moléculaires s'appuie sur un arbre phylogénétique. Il s'agit d'une extension bayésienne du modèle Poisson Tree Processes (PTP) qui modélise les substitutions génétiques comme un processus de Poisson le long des branches de l'arbre et les limites entre espèces sont identifiées par des changements significatifs dans le taux de substitutions (Kolaczyk, 1999).

f. mPTP (multi-rate Poisson Tree Processes) : Il s'agit d'une extension du modèle PTP (Poisson Tree Processes) qui permet de délimiter des espèces à partir de données génétiques.

Cette extension prend en compte les taux de substitution hétérogènes entre les branches de l'arbre phylogénétique (Kapli et al., 2017).

II.3.2.2. Méthodes paramétriques

Les méthodes paramétriques pour délimiter les espèces reposent sur un modèle probabiliste de génération de données biologiques telles que les arbres généalogiques et les séquences d'ADN. Ces méthodes cherchent à modéliser les processus de spéciation, de coalescence génétique et d'évolution des séquences d'ADN. Le modèle principal est la coalescence multi-espèces avec évolution neutre. En formulant la délimitation des espèces comme un problème d'inférence statistique dans ce cadre, les méthodes traditionnelles en inférence statistique peuvent être utilisées (Rannala et Yang, 2020)

a. **Bayes Factor Délimitation (BFD)** : Elle permet d'évaluer les hypothèses de délimitation des espèces en se basant sur des facteurs de Bayes. Cette méthode combine des analyses de coalescence multi-espèces avec des comparaisons bayésiennes et permet ainsi de déterminer le modèle de délimitation le plus soutenu par les données (Grummer et al., 2014).

II.4. Phylogénie de la sous famille Pezotettiginae

La phylogénie de la sous-famille Pezotettiginae (Orthoptera : Acrididae) demeure peu étudiée, avec une rareté notable de données moléculaires spécifiques à ce groupe. Les études phylogénétiques disponibles sur les Acrididae se focalisent généralement sur d'autres sous-familles plus largement réparties ou d'importance économique (Petit, 2005). Cependant, certaines études ont abordé la position taxonomique de genres tels que *Pezotettix* (Louveaux et al., 2023). Par exemple, une analyse phylogénétique a suggéré que le genre *Pezotettix* devrait être placé dans une sous-famille distincte, Pezotettiginae, plutôt que dans les Catantopinae, comme précédemment classé (Chapco, 2013). Des études plus larges sur la famille des Acrididae ont été menées, utilisant des génomes mitochondriaux et des gènes nucléaires pour tester la monophylie de la famille et comprendre les relations évolutives entre les sous-familles (Chapco et Litzenberger, 2002; Song et al., 2018).

Cette lacune souligne la nécessité de recherches approfondies, notamment l'intégration de données moléculaires, pour clarifier les relations évolutives au sein des Pezotettiginae.

Deuxième partie :
Partie expérimentale

Chapitre 03 :

Matériel et méthodes

III. Matériel et méthodes

Ce chapitre présente de manière détaillée le matériel employé ainsi que les protocoles méthodologiques mises en œuvre pour la reconstruction phylogénétique de la sous-famille *Pezotettiginae*. Il présente également les approches employées pour la délimitation des espèces, en s'appuyant sur l'analyse du gène COI, reconnu comme marqueur standard en barcoding moléculaire. L'ensemble de l'étude repose sur l'utilisation d'outils bioinformatiques spécialisés et de méthodes phylogénétiques modernes. L'objectif est de fournir un cadre rigoureux permettant de clarifier les relations évolutives avec les autres sous familles d'*acrididae* et même au sein de ce groupe encore peu étudié.

III.1. Position phylogénétique de la sous-famille *Pezotettiginae* au sein de la famille *Acrididae*

III.1.1. Téléchargement des séquences

Dans le cadre de la reconstruction d'un arbre phylogénétique, la collecte des séquences d'ADN est une étape cruciale. Plusieurs bases de données en ligne offrent la possibilité aux chercheurs et aux passionnés de rassembler des informations précieuses pour cette tâche. Nous avons choisi a opté pour l'utilisation de la banque de données suivante :

III.1.1.1. Boldsytems

Le Barcode of Life Data Systems (BOLD) Version 5 (<https://boldsystems.org>) se présente comme une plateforme web qui fournit un environnement intégré pour l'assemblage et l'utilisation des codes-barres de l'ADN et d'autres données de séquence. Cette base de données en ligne a pour vocation de collecter et de gérer les spécimens, les données de distribution et les données moléculaires. Elle dispose également d'outils analytiques pour soutenir leur validation. Depuis sa création en 2005, BOLD a connu des développements considérables, étendant ses fonctionnalités initiales pour offrir un éventail d'outils avancés. Ces fonctionnalités supplémentaires incluent la gestion des données, la validation des informations, la visualisation des résultats et la publication des données scientifiques. La version 5 de BOLD (Figure 06) introduit des améliorations notables dans les processus de collecte et d'analyse des données, tout en enrichissant l'outil de nouvelles fonctionnalités avancées en matière de diffusion, de citation et d'annotation des données (Ratnasingham *et al.*, 2024).

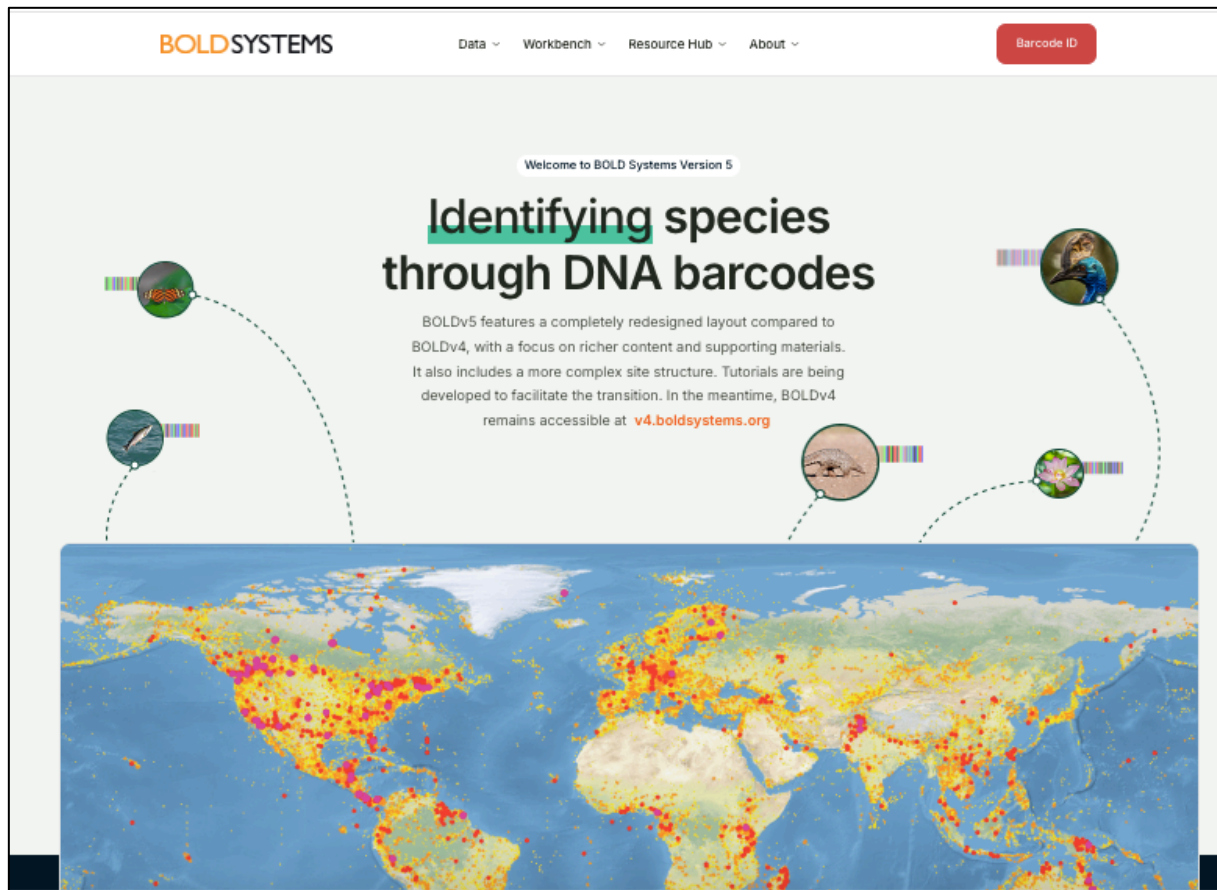


Figure 06. Page d'accueil BOLD version 5 (Ratnasingham et *al.*, 2024).

Dans le cadre de notre recherche, nous avons procédé à la recherche de séquences de Pezotettiginae au moyen de la plateforme Boldsytems. Les étapes générales que nous avons suivies peuvent être résumées comme suit :

- c. Allez sur le site de Boldsytems (<https://boldsystems.org>), en cliquant sur le bouton Portail de données ;
- d. Ensuite dans la barre de recherche, entrez le mot-clé Pezotettiginae COI et appuyer sur entrée ou cliquez sur le bouton de recherche. Cette recherche permettra de trouver les séquences du gène COI (Cytochrome Oxydase I) liées à la sous-famille Pezotettiginae (Figure 07).
- e. Pour télécharger les séquences de tous les enregistrements de la sous famille Pezotettiginae dans un seul fichier, cliquer sur Fasta (Le format de fichier FASTA (ou format Pearson) est utilisé pour stocker une ou plusieurs séquences, d'ADN, d'ARN ou de protéines. Ces séquences sont classiquement représentées dans un format convivial, devenu un standard en bioinformatique. Une séquence en format FASTA commence avec une ligne simple de description de la séquence débute par un

« > » et attribue un nom ou un identifiant unique à la séquence, les lignes suivantes correspondent à la séquence elle-même) (NCBI, 2021; Hoogstrate et *al.*, 2020).

Process ID	Marker Code	Sample ID	Country/Ocean	Phylum	Class	Order	Family	Subfamily	Genus	Species	Subspecies
BCEMI1343-25	COI-5P	RM3_963	Greece	Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Pezotettix	Pezotettix giornae	
BCEMI1344-25	COI-5P	RM3_964	Greece	Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Pezotettix	Pezotettix giornae	
BCEMI1411-25	COI-5P	RM3_1031	Greece	Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Pezotettix	Pezotettix giornae	
GBMOR1932-19	COI-3P	JX244389	Spain	Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Pezotettix	Pezotettix giornae	
GBMOR1933-19	COI-5P	JX244358	Spain	Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Pezotettix	Pezotettix giornae	
GBMOR1934-19	COI-5P	JX033912		Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Pezotettix	Pezotettix giornae	
GBMOR2014-19	COI-5P	JX033913		Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Sphenophyma	Sphenophyma rugulosa	
GBMOR5924-19	COI-5P	KM384834		Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Pezotettix	Pezotettix giornae	
GBMOR814-13	COI-5P	KC261370		Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Pezotettix	Pezotettix anatolica	
GBORT992-15	COI-5P	GBOL14133	Croatia	Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Pezotettix	Pezotettix giornae	
GMBSB693-18	COI-5P	BIUG41257-G10	Bulgaria	Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Pezotettix	Pezotettix giornae	
GMLBA1263-21	COI-5P	BIUG63986-A09	Lebanon	Arthropoda	Insecta	Orthoptera	Acrididae	Pezotettiginae	Pezotettix	Pezotettix anatolica	

Figure 07. Recherche des séquences de «Pezotettiginae» dans BOLD (Ratnasingham et *al.*, 2024).

- f. De la même manière, d'autres séquences du gène COI sont téléchargées depuis BoldSystem pour représenter les sous-familles suivantes : Oedipodinae, Calliptaminae, Catantopinae, Gomphocerinae, Acridinae et Egnatiinae. Les espèces correspondantes sont présentées dans l'annexe Ces séquences au format Fasta ont été intégrées au fichier précédemment préparé.
- g. Le logiciel Bloc-notes tant qu'un outil essentiel pour modifier et lire rapidement des fichiers texte, a été utilisé comme lecteur de ce fichier (Figure 08).

```

>GBMIX3172-16|Oedipoda miniata|-5P Greece
CACTTTATATTTTATATTTGGAGCATGAGCTGGAATAGTAGGAACATCAATAAGCATAATTATTCGAGCAGAATTAGGTCACACAGGTTCAATTAATGAGAG
TGATCAAATTTAATGTAATTATTACAGCCATGCATTGTAATAATTTTATATAGTAATACCTATTATAAATGGTGGATTGGTAATTGACTTGTCCT
ATTAATAATTGGAGCACCAGATATAGCATTCCGCGAATAAATAATAAGCTTCTGATTATTACCACATCACTAACTCTTTAATTGCCTCCTCAATAGT
TGATAGAGGTGCTGGTACTGGGTGAACAGTTTATCCACCCTTGGCGGAGCAATTGCTCATGGAGGAGCCTCAGTAGATTAGCTATTTTTCTTCACTT
AGCAGGTATTTCACTATTTTAGGAGCAGTAAATTTCAATCAACAGTAATTAATATACGGTCAGAAAGAATAACATTAGATCAAACACCTTATTTGTTTG
ATCAGTAGCAATTAAGTCACTTTTATTACTTTTCAATACAGTATTAGCTGGAGCAATTACAATATTATAAAGTACCGAAATTTAAATACCTCCTTCTT
TGATCCTGCTGGTGGTGGAGATCCAATTCTATATCAACATTTATTT
>BCEMI1343-25|p_giornae|-5P Greece
TACTTTTACTTCTTATTTGGTGCATGGGCTGGAATAGTAGGAACATCAATAAGATTACTTATTCGGGCTGAATTAGGACAACAGGATCATTAAATGGAGA
TGACCAAATTTACAATGTGATTATTACAGCACATGCATTGTAATAATTTCTTTATAGTAATACCTATTATAAATGGGGGATTGGAAATGACTTGTTCC
ATTAATAATTGGGGCACCTGATATAGCTTTTCTCGAATAAATAATAAGTTTTGATTATTACCACATCTTTAACCTTCTTCTACATCTTCCATAGT
GGATAATGGAGCTGGGACAGGGTGGACAGTTTACCCCTTGGAGGTGCAATTGCACATGGAGGTGCTTCAGTTGATTAGCTATTTTTCACTTCATTT
AGCTGGTGTTCATCAATCTTAGTGCAGTTAATTTTATCAACAGCAATTAATATACGATCAGAAAGAATAAATTTAGATCAAACACCTTATTTGTTTG
ATCAGTAGCTATTACTGCCACTTTTACTATTATCCCTCCAGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAATTTAAATACCTCCTTCTT
TGATCCTGCTGGAGGAGGTGACCAATTCTATATCAACATTTATTT
>BCEMI1344-25|p_giornae|-5P Greece
TACTTTTACTTCTTATTTGGTGCATGGGCTGGAATAGTAGGAACATCAATAAGATTACTTATTCGGGCTGAATTAGGACAACAGGATCATTAAATGGAGA
TGACCAAATTTACAATGTGATTATTACAGCACATGCATTGTAATAATTTCTTTATAGTAATACCTATTATAAATGGGGGATTGGAAATGACTTGTTCC
ATTAATAATTGGGGCACCTGATATAGCTTTTCTCGAATAAATAATAAGTTTTGATTATTACCACATCTTTAACCTTCTTCTACATCTTCCATAGT
GGATAATGGAGCTGGGACAGGGTGGACAGTTTACCCCTTGGAGGTGCAATTGCACATGGAGGTGCTTCAGTTGATTAGCTATTTTTCACTTCATTT
AGCTGGTGTTCATCAATCTTAGTGCAGTTAATTTTATCAACAGCAATTAATATACGATCAGAAAGAATAAATTTAGATCAAACACCTTATTTGTTTG
ATCAGTAGCTATTACTGCCACTTTTACTATTATCCCTCCAGTTTTAGCTGGAGCTATTACTATATTATAACAGACCGAAATTTAAATACCTCCTTCTT
TGATCCTGCTGGAGGAGGTGACCAATTCTATATCAACATTTATTT
    
```

Figure 08. Exemple d'un Fichier Format Fasta.

Afin d'établir une racine pour l'arbre phylogénétique, nous avons intégré un groupe externe (out-group) aux séquences téléchargées. L'out-group doit entretenir une relation évolutive suffisamment proche avec le groupe étudié pour permettre un enracinement pertinent, tout en étant moins étroitement lié que les relations existantes entre les espèces incluses dans l'analyse(DeSalle et *al.*, 2023). Il joue un rôle déterminant en permettant d'établir la direction de l'évolution. En effet, il constitue un point de référence permettant d'identifier les états ancestraux et dérivés des caractères (Hennig, 1999). On a choisi l'espèce *Tmethis cisti* pour servir de groupe externe dans cette construction. Il s'agit d'une espèce de la famille Pamphagidae

III.2. Construction de l'arbres phylogénétiques

La construction des arbres phylogénétiques spécifique à la sous famille Pezotettiginae a été réalisée à l'aide de la plateforme NG-Phylogeny (Figure 09) qui peut être consultée à l'adresse suivante : <https://ngphylogeny.fr/>.

NGPhylogeny.fr est un outil en ligne spécialisée dans la reconstruction et l'analyse phylogénétique à partir de séquences biologiques, telles que l'ADN ou les protéines. Cette plateforme propose une suite intégrée de logiciels bioinformatiques dédiés à l'alignement, à la reconstruction d'arbres phylogénétiques et à leur visualisation. Le choix de ces outils dépendra principalement de la taille du jeu de données et de l'application (Lemoine et *al.*, 2019).

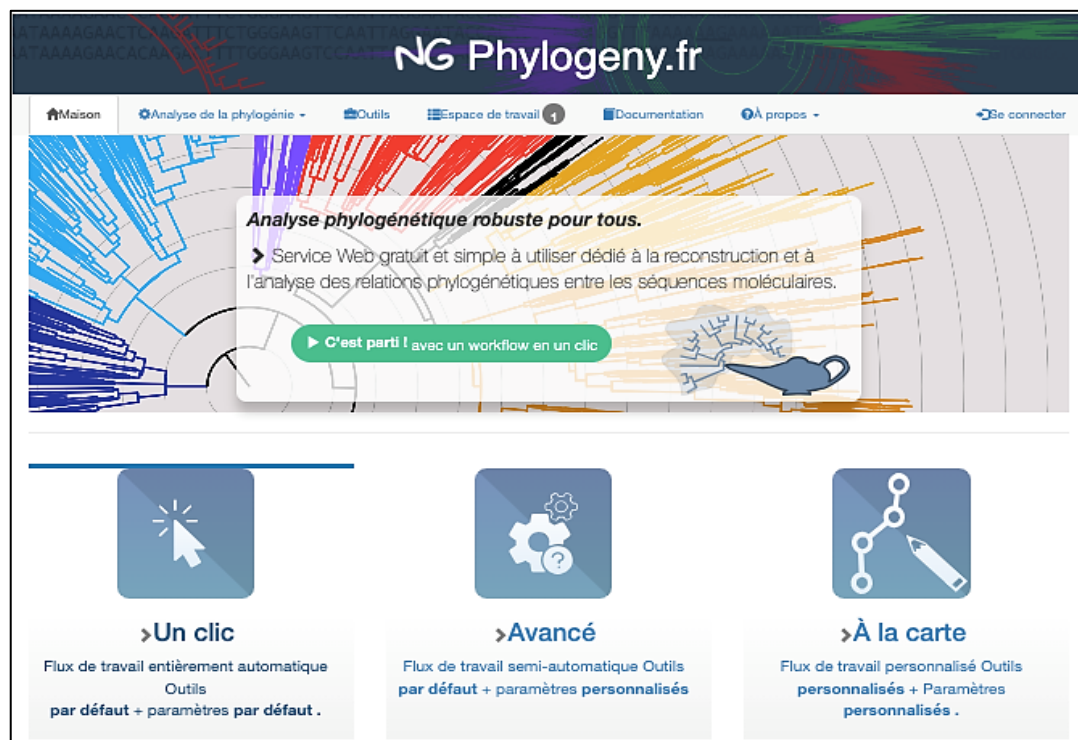


Figure 09. Interface de la plateforme NG-Phylogeny.

Une fois l'accès à la plateforme **NG-Phylogeny**, la démarche à suivre a consisté en une série d'étapes qui constituent le processus classique de construction d'un arbre phylogénétique, dont voici le détail :

- Nous avons choisi phylogeny analysis, plusieurs types de workflows sont disponibles, il se distinguent principalement par les outils exécutés à chaque étape et leurs paramètres. Il existe ainsi des « workflows » entièrement automatiques, reposant sur des outils et paramètres par défaut, des « workflows » structurés mais personnalisables, utilisant des outils standards avec des paramètres spécifiques, ainsi que des « workflows » entièrement personnalisés, permettant de sélectionner librement parmi l'ensemble des outils et paramètres disponibles. Ces « workflows » peuvent être composés de n'importe quelle combinaison d'étapes, en fonction des besoins spécifiques de l'analyse phylogénétique (Figure 09). Ce dernier type de « workflows » est celui choisi pour créer nos arbres phylogénétiques ce qui consiste à cliquer sur l'option à la carte, la fenêtre qui est apparue à l'écran présente les quatre étapes de construction de l'arbre : (Multiple Alignment, Alignment Curation, Tree Inference, Tree Rendering).
- Chaque étape comprend des sous menus à partir desquels nous pouvons choisir les logiciels que nous souhaitons utiliser (Figure10).

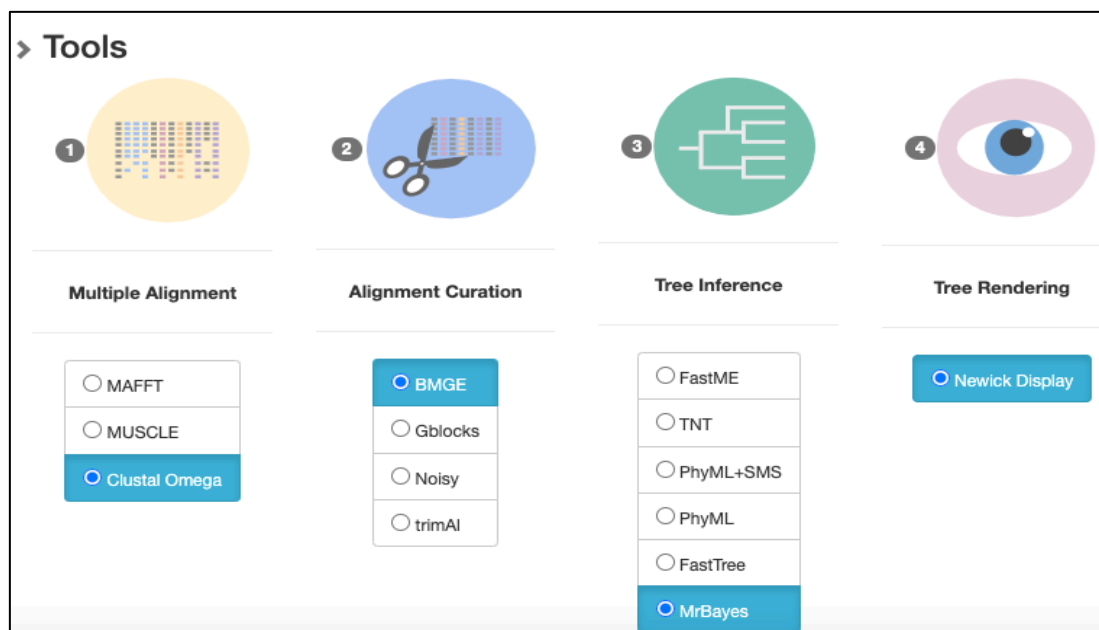


Figure 10. Les étapes de construction de l'arbre phylogénétique.

Le point de départ pour les analyses phylogénétiques est l'alignement Multiple, qui est une procédure efficace pour la comparaison de séquences d'ADN. Il permet d'identifier et de mettre en évidence les régions similaires et les régions divergentes (Darlu et *al.*, 1976 ; Olivier

et Lemoine, 2022), pour réaliser cette étape on a choisi Oméga Clustal qui constitue la version la plus récente de la suite Clustal. Cette dernière a été conçue pour des alignements rapides et précis de grandes nombre de séquences (comprenant au minimum cent mille séquences (Sievers et *al.*, 2011).

Les régions mal alignées peuvent fausser la topologie des arbres, donc pour améliorer la qualité des analyses en aval et sélectionner des régions informatives adaptées à l'inférence phylogénétique (Criscuolo et Gribaldo, 2010), on a établi un nettoyage des séquences alignées comme deuxième étape, on a sélectionné, parmi les outils existants, le BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy) un tel logiciel capable d'effectuer un découpage biologiquement pertinent sur un alignement multiple de séquences d'ADN, de codons ou d'acides aminés sans ambiguïté (Criscuolo et Gribaldo, 2011).

Pour l'étape suivante qui est l'inférence d'arbre, on a réalisé deux méthodes de construction des arbres phylogénétiques basées sur les caractères, elles génèrent un grand nombre d'arbres hypothétiques basés sur un algorithme et induisent ensuite un arbre optimal, ces méthodes sont :

- ✓ **Méthode du maximum de vraisemblance (ML)**, une telle méthode caractérisée par une cohérence statistique, la robustesse et la possibilité de comparer différents arbres et d'exploiter pleinement les données originales dans un cadre statistique (Zou et *al.*, 2024). Pour cette construction on a choisi l'outil PhyML (Figure 11), ce logiciel basé sur le principe du maximum de vraisemblance est conçu pour mettre en œuvre une heuristique rapide et précise. Son objectif est d'estimer les phylogénies par maximum de vraisemblance à partir de séquences d'ADN et de protéines. Il met à la disposition de l'utilisateur un éventail d'options, parmi lesquelles le bootstrap non paramétrique et l'estimation de divers paramètres évolutifs, afin de procéder à des analyses phylogénétiques exhaustives sur de vastes ensembles de données en un temps de calcul raisonnable (Guindon et *al.*, 2005).
- ✓ **Méthode d'inférence bayésienne (BI)** : La supériorité de l'inférence bayésienne réside dans sa capacité à traiter de grands ensembles de données à une vitesse de calcul supérieure à celle des méthodes de vraisemblance maximale et à mesurer la confiance des arbres grâce aux probabilités postérieures (Zou et *al.*, 2024). En principe, les étapes mentionnées précédemment s'appliquent de manière identique aux deux méthodes d'inférence des arbres, cette fois ci, on sélectionne l'outil

MrBayes (Figure 11), c'est un logiciel largement utilisé pour l'inférence phylogénétique bayésienne. Il s'agit d'une approche itérative qui permet de dériver un arbre évolutif pour une collection d'espèces dont les séquences d'ADN sont connues (Kuan *et al.*, 2018).

La dernière étape est la visualisation de l'arbre après sa construction, on sélectionne donc l'outil Newick display pour obtenir un arbre phylogénétique au format Newick, une manière de décrire un arbre phylogénétique sous forme de texte lisible par les logiciels, comme Newick Display, iTOL, FigTree, etc (Ogoniak *et al.*, 2024). Ce format permettant ainsi une représentation graphique claire et interprétable des relations évolutives entre les séquences analysées (Cardonal *et al.*, 2008).

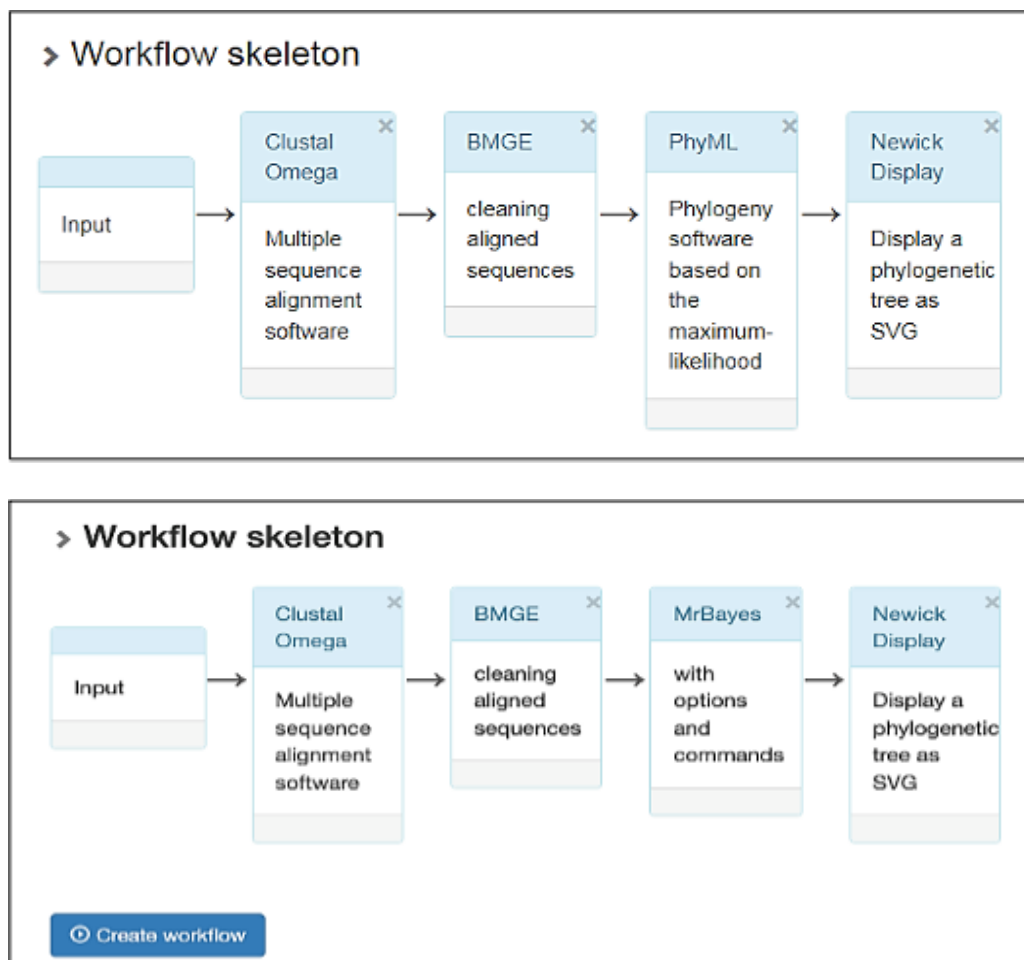


Figure 11. Les logiciels choisis pour la réalisation des étapes de construction de l'arbre phylogénétique.

Ensuite nous avons cliqué sur la commande Create Workflow (Figure 12), ce qui a fait apparaître une fenêtre qui nous a permis d'ajouter le fichier en entrée contenant nos données, l'ensemble des séquences peut être aussi soumis à l'aide d'un collage du contenu de fichier

dans la zone appropriée. Tous les « workflows » utilisent un fichier FASTA en entrée, de préférence non aligné, et produisent plusieurs catégories des fichiers d'alignement de séquences.

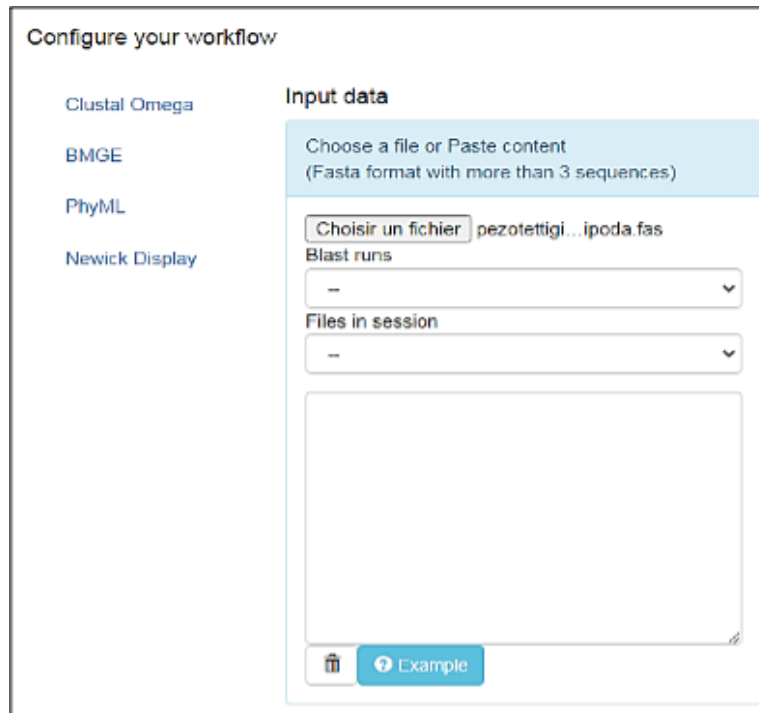


Figure 12. La fenêtre de configuration de « workflow ».

Enfin on a cliqué sur la touche Submit trouvée en bas de la fenêtre pour lancer l'analyse sur le serveur Galaxy. Les résultats sont obtenus en moins de 5 minutes. Ils servent par la suite à définir les méthodes de délimitation.

III.3. Visualisation et la lecture d'un arbre phylogénétique

On a utilisé l'outil iTOL qui est un serveur disponible en ligne pour l'affichage, manipulation et l'annotation d'arbres phylogénétiques, accessible avec n'importe quel navigateur Web moderne. La version 5 d'iTOL introduit un moteur d'affichage d'arbres entièrement nouveau, ainsi que de nombreuses nouvelles fonctionnalités (Figure 13). iTOL permet de manipuler les arbres de diverses manières, et des fonctions d'édition de base permettent de supprimer ou de déplacer interactivement des nœuds individuels ou des clades entiers. Les clades peuvent également être élagués ou réduits, manuellement ou automatiquement, en fonction de divers paramètres (Letunic et Bork, 2021).

Dans le cadre de cette étude, nous avons choisi d'enraciner manuellement l'arbre, et adopté une représentation graphique de type rectangulaire à l'aide du panneau de contrôle intégré. Enfin, l'arbre a été exporté sous forme d'image et de fichier au format Newick.

Newick Display	17.	All tree images	✓	+ ⚙ > ↓ 🌐	.tar	
	16.	Tree image	✓	+ ⚙ > ↓ 🌐	.svg	
MrBayes	15.	Mr Bayes consensus partitions	✓	+ ⚙ > ↓ 🌐	.bct	
	14.	Mr Bayes trees with probs	✓	+ ⚙ > ↓ 🌐	.bct	
	13.	Mr Bayes Consensus tree	✓	+ ⚙ > ↓ 🌐	.nhx	Viewer ITol
	12.	Mapping between short sequence id and names	✓	+ ⚙ > ↓ 🌐	.bct	
	11.	Mr Bayes All Runs Outputs	✓	+ ⚙ > ↓ 🌐	.tar	
	10.	Mr Bayes run1 results	✓	+ ⚙ > ↓ 🌐	.nhx	Viewer ITol
	9.	Mr Bayes command file	✓	+ ⚙ > ↓ 🌐	.bct	
	8.	Reformatted alignment for mrbayes	✓	+ ⚙ > ↓ 🌐	.bct	

Figure 13. Fenêtre des résultats d'analyse sur le serveur Galaxy.

III.4. Relations évolutives au sein de la sous-famille Pezotettiginae

Afin de mieux clarifier les relations évolutives au sein de ce groupe encore insuffisamment étudié, nous avons appliqué le même protocole méthodologique précédent, en n'utilisant que les séquences des taxons appartenant à cette sous famille. *Oedipoda miniata* a été choisi comme groupe externe (outgroup).

III.5. Délimitation des espèces

Dans cette étude, nous avons adopté une démarche méthodique et rigoureuse pour obtenir une connaissance approfondie de la diversité de la sous famille Pezotettiginae et permettre une classification précise. Pour ce faire, nous avons mis en œuvre diverses approches et méthodes, dont des analyses taxinomiques et phylogénétiques. Ces méthodes comprennent l'utilisation d'approches phylogénétiques, c'est-à-dire basées sur la filiation entre les espèces, ainsi que des approches intégratives, combinant plusieurs types de données. Dans le cadre de notre étude, nous avons mis en œuvre quatre méthodes de délimitation. Parmi les méthodes examinées, deux sont fondées sur la distance génétique (ASAP et ABGD), tandis que deux autres s'appuient sur l'arbre phylogénétique (bPTP et mPTP et PTP).

III.5.1. ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning)

Pour réaliser cette procédure, l'accès à la plateforme s'est effectué par le lien suivants : <https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap/asapold.html> . Puis les étapes ci-décrites sont suivies :

- Nous avons téléchargé le fichier au format multiFASTA contenant les séquences déjà alignées (une matrice de distance peut être aussi acceptées).
- Nous avons laissé les réglages par défaut et cliqué sur Go pour démarrer la délimitation. Le temps de réalisation peut varier selon la taille des séquences et les paramètres choisis (Figure 14).
- Après, on clique sur **view /save boxes subsets graph here** pour obtenir les résultats.

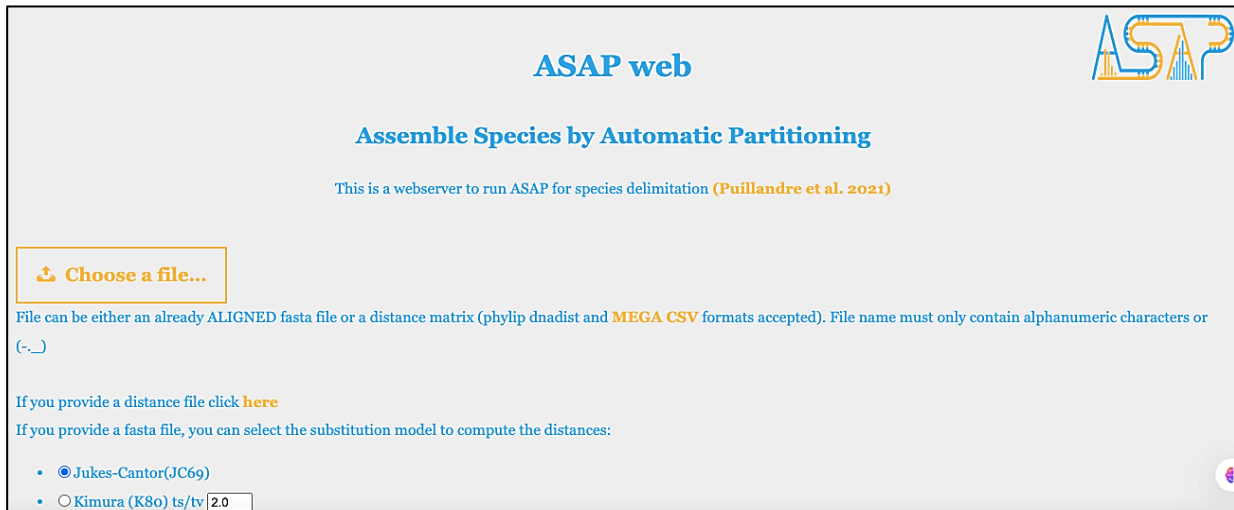


Figure 14. Interface de plateforme ASAP.

III.5.2. ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery)

Nous avons accédé à la plateforme en utilisant le lien suivant :

<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/abgd/abgdold.html>.

Le fichier d'alignement au format FASTA a été utilisé comme fichier d'entrée. Tous les paramètres ont été laissés par défaut, puis l'analyse a été lancée en cliquant sur le bouton "Go" (Figure 15).

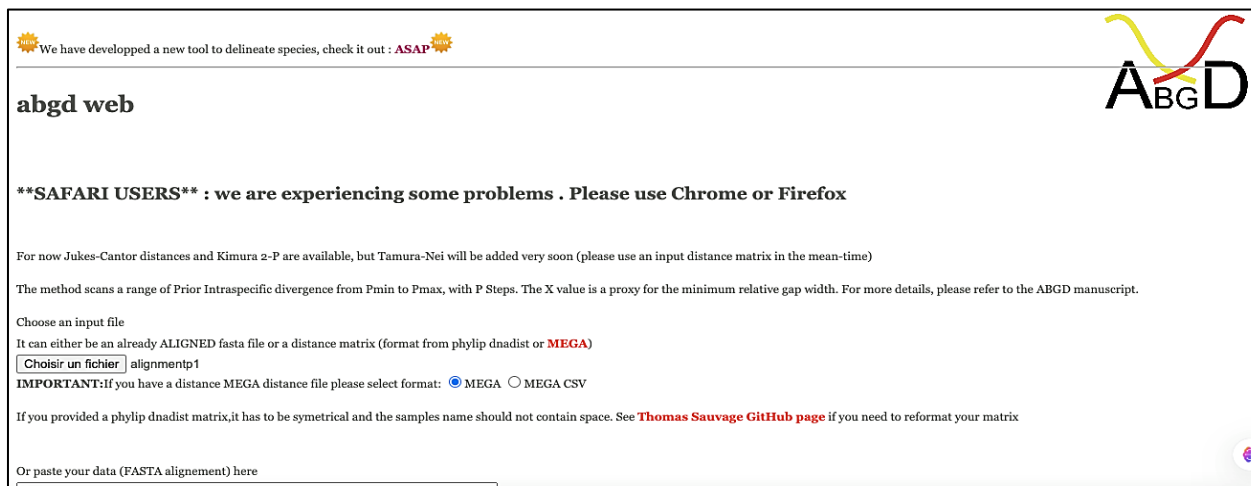


Figure 15. Interface de plateforme ABGD.

III.5.3. mPTP (modèle multi-rate Poisson Processes)

La délimitation des espèces a été réalisée à l'aide de la plateforme en ligne mPTP : <https://mptp.h-its.org/#/tree>. Un fichier d'arbre phylogénétique au format Newick d'un arbre ML a été importé via l'interface dédiée (Figure 15). À cette étape, un avertissement précis que certaines fonctions avancées ne sont pas disponibles sur cette version du service. L'arbre utilisé peut-être enraciné ou non, selon les exigences de l'analyse.

Dans notre cas, l'Outgroup *Oedipoda miniata*, est spécifié par son Process ID. Ensuite, nous avons cliqué sur (model sélection) pour sélectionner le modèle mPTP et démarrer le processus de délimitation.

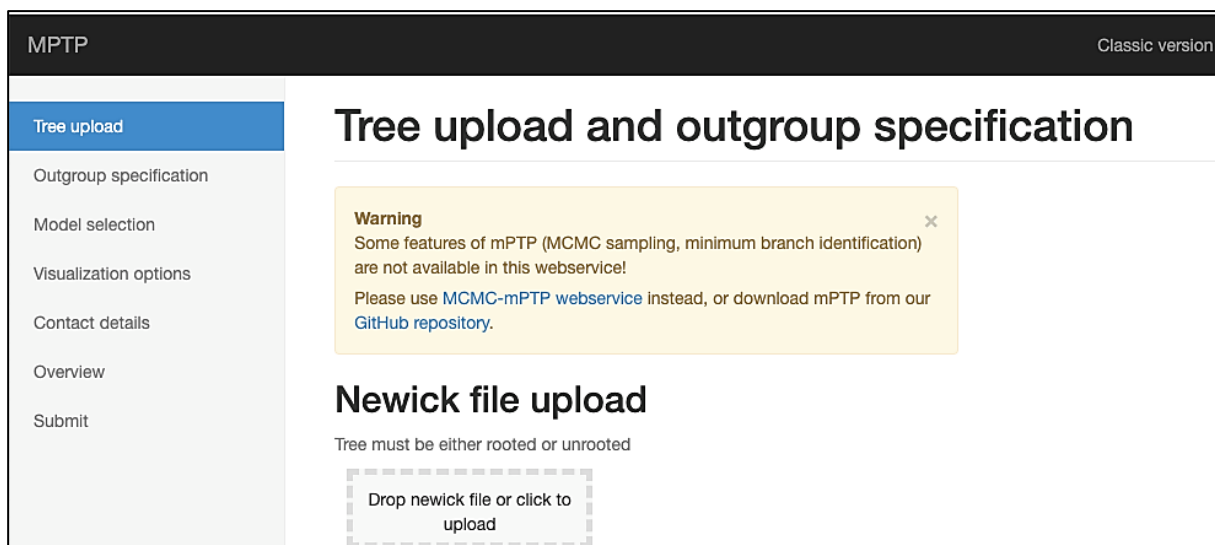


Figure 16. Interface de plateforme mPTP.

III.5.4. bPTP (Bayesian Poisson Tree Processes)

Nous avons accédé à la plateforme en utilisant le lien suivant : <https://species.h-its.org/> (Figure 16). Ensuite, nous avons importé le fichier de l'arbre phylogénétique au format Newick d'un arbre ML et sélectionné l'option (Rooted) puis saisi le nom du groupe externe *Oedipoda miniata*. Par ailleurs, nous avons intégré notre adresse Gmail et avons cliqué sur le bouton « Submit » pour lancer la procédure.

bPTP web server GMYC web server About PTP and bPTP The Exelixis Lab

BPTP SPECIES DELIMITATION

bPTP web server

Look up jobs

Help

About PTP and bPTP

PTP paper

Download PTP and bPTP

SERVER STATUS

Free cluster nodes: 8

Total cluster nodes: 10

bPTP server: a Bayesian implementation of the PTP model for species delimitation
with PhyloMap for visualization

Please cite: [A General Species Delimitation Method with Applications to Phylogenetic Placements. Zhang, Jiajie, Kapli, P., Pavlidis, P., and Stamatakis, A. *Bioinformatics* \(Oxford, England\)\(2013\), 29 \(22\): 2869-2876](#)

bPTP is an updated version of the original maximum likelihood PTP (maximum likelihood PTP search result is part of the bPTP results), it adds Bayesian support (BS) values to delimited species on the input tree. Higher BS value on a node indicates all descendants from this node are more likely to be from one species. Note this web server only allows a single phylogenetic tree as input - to run on multiple trees (from Bayesian analysis or bootstrap), please download the [bPTP and PTP standalone](#).

If you are not familiar with Bayesian analysis, please [read this](#) first.

The server will only accept Newick format or NEXUS format with no annotations on the tree.
Here is an [example of Newick format](#) and an [example of NEXUS format](#).

Special note on taxa name: A valid taxa name should only contains letters, numbers, _ and -; and should NOT be pure numbers. Any other characters, in particular space, \$, #, %, (and), will cause errors!

My phylogenetic input tree, if input file contains multiple trees, only the first tree will be used:

pezo newick.txt

My tree is:

If unrooted, the tree will be rooted at the longest branch.

Figure 17. Interface de plateforme bPTP.

Chapitre 04 :

Résultats et discussion

IV. Résultats et discussion

Ce chapitre expose de manière approfondie les résultats issus à partir de diverses procédures scientifiques, telles que le téléchargement, le traitement des séquences, la construction des arbres phylogénétiques selon le marqueur moléculaire analysé, ainsi que la délimitation des espèces, accompagnés de leur analyse et discussion.

Ces résultats fournissent une base solide pour approfondir la compréhension de la phylogénie et de l'évolution des taxons étudiés dans leur environnement naturel.

IV.1. Données relatives aux séquences étudiées

IV.1.1 Séquences de la sous-famille *Pezotettiginae* analysées

La base de données Boldsystème nous permet de rechercher et de télécharger plusieurs séquences génétiques des différentes espèces de la sous famille *Pezotettiginae* (Tableau 03, Annexe 01). Les données analysées ont porté sur un total de 99 spécimens, correspondant à 99 Séquences génétiques publiées dont certaines sont disponibles également dans la base de données GenBank.

Les spécimens des séquences analysées proviennent de neuf pays d'Europe et du Proche-Orient ce qui permet une évaluation à la fois taxonomique et biogéographique : le Liban, le Portugal, l'Espagne, la Bulgarie, la Croatie, la Macédoine du Nord, la France, la Turquie et la Grèce.

Les séquences COI-5P obtenues varient entre 550 bp et 1152 bp, avec une majorité située entre 651 bp et 658 bp, correspondant à la taille standard du code-barres ADN utilisé pour l'identification des espèces animales. Les séquences les plus longues (ex. 1152 bp) pourraient inclure des portions supplémentaires du gène mitochondrial ou avoir été fusionnées à d'autres régions.

Parmi ces enregistrements, 96 ont été assignés à un code BIN (Barcode Index Number), tandis que 27 présentaient une identification au niveau de l'espèce. L'analyse a révélé l'existence de six BINs (unités taxonomiques opérationnelles) distincts attribuées par le système BOLD, correspondant à trois espèces différentes : *Pezotettix giornae* et *Pezotettix anatolica* ainsi qu'une espèce non identifiée. En principe, chaque BIN regroupe généralement les individus appartenant à une même espèce biologique, même si celle-ci n'a pas encore été formellement décrite. Ces BINs facilitent l'identification, la comparaison et la délimitation des espèces à partir de données moléculaires, en particulier du gène COI chez les animaux. Ces résultats

mettent en lumière une diversité génétique potentielle, bien que le nombre d'espèces identifiées demeure restreint (Ratnasingham et Hebert, 2013).

Malgré que l'identification de plusieurs BINs révèle une diversité génétique notable, mais également une superposition de BIN entre différentes espèces (ex. *P. giornae* et *Pezotettiginae* non identifiés) peut être marquée, suggérant soit une faible divergence génétique, soit des limites taxonomiques floues au sein de ce groupe.

Tableau 03. Données taxonomiques et génétiques relatives aux séquences étudiées de la sous-famille *Pezotettiginae*

	Process ID	Taille du marqueur COI-5P	Bold code (Bin ID)	Code GenBank	Localité	Taxon étudié
1	BCEMI1343-25	658 bp	BOLD:AAP4567	/	Grèce	<i>P. giornae</i>
2	BCEMI1344-25	658 bp	BOLD:AAP4567	/	Grèce	<i>P. giornae</i>
3	BCEMI1411-25	658 bp	BOLD:AAP4567	/	Grèce	<i>P. giornae</i>
4	GBMOR1934-19	600 bp	BOLD:ADT1526	JX033912	/	<i>P. giornae</i>
5	GBMOR2014-19	607 bp	/	JX033913	Turquie	<i>Sphenophyma rugulosa</i>
6	GBMOR5924-19	1152 bp	/	KM384834	/	<i>P. giornae</i>
7	GBMOR814-13	715 bp	BOLD:ACH7398	KC261370	Turquie	<i>P. giornae</i>
8	GBORT992-15	607 bp	BOLD:ADU6459	/	Croatie	<i>P. giornae</i>
9	GMBSB693-18	651 bp	BOLD:AAP4567	/	Bulgarie Sofia	<i>P. giornae</i>
10	GMLBA1263-21	654 bp	BOLD:ACH7398	/	Liban : Metn Liban	<i>P. anatolica</i>
11	GMLCL6127-23	653 bp	BOLD:ACH7398	/	Liban Nord	<i>P. anatolica</i>
12	GMLWD10309-23	654 bp	BOLD:ACH7398	/	Liban Sud	<i>P. anatolica</i>
13	GMLWD10362-23	654 bp	BOLD:ACH7398	/	Liban Sud	<i>P. anatolica</i>
14	GMLWD10363-23	659 bp	BOLD:ACH7398	/	Liban Sud	<i>P. anatolica</i>
15	GMLWD10364-23	653 bp	BOLD:ACH7398	/	Liban Sud	<i>P. anatolica</i>
16	GMLWD10419-23	655 bp	BOLD:ACH7398	/	Liban Sud	<i>P. anatolica</i>
17	GMLWD10480-23	653 bp	BOLD:ACH7398	/	Liban Sud	<i>P. anatolica</i>
18	GMLWD10481-23	654 bp	BOLD:ACH7398	/	Liban Sud	<i>P. anatolica</i>
19	GMLWD10542-23	657 bp	BOLD:ACH7398	/	Liban Sud	<i>P. anatolica</i>
20	IBIOR037-17	658 bp	BOLD:AEO7437	OR974583	Portugal Béja	<i>P. giornae</i>
21	IBIOR038-17	658 bp	BOLD:AEO7437	OR974543	Portugal Béja	<i>P. giornae</i>
22	IBIOR103-17	658 bp	BOLD:AEO7437	OR974709	Portugal : Setúbal	<i>P. giornae</i>
23	IBIOR306-22	658 bp	BOLD:AEO7436	OR974802	Portugal : Bragançe	<i>P. giornae</i>
24	PORTH372-10	658 bp	BOLD:ADU6459	JF838919- SUPPRESSED	Macédoine du Nord	<i>P. giornae</i>

25	PORTH417-10	622 bp	BOLD:AAP4567	/	Bulgarie	<i>P. giornae</i>
26	UMAAD1007-21	652 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
27	UMAAD1103-21	651 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
28	UMAAD1105-21	652 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
29	UMAAD1106-21	652 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
30	UMAAD1220-21	651 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
31	UMAAD1224-21	651 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
32	UMAAD1226-21	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
33	UMAAD1229-21	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
34	UMAAD1233-21	652 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
35	UMAAD1353-21	651 bp	BOLD:AEK3129	/	France Herault	Pezotettiginae
36	UMAAD1354-21	652 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
37	UMAAD1356-21	651 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
38	UMAAD1357-21	652 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
39	UMAAD1362-21	652 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
40	UMAAD1555-21	652 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
41	UMAAD1556-21	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
42	UMAAD284-21	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
43	UMAAD332-21	651 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
44	UMAAD394-21	652 bp	BOLD:AEK3129	/	France Herault	Pezotettiginae
45	UMAAD460-21	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
46	UMAAD461-21	651 bp	BOLD:AEK3129	/	France Herault	Pezotettiginae
47	UMAAD462-21	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
48	UMAAD865-21	641 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
49	UMAAl1060-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
50	UMAAl1109-22	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
51	UMAAl1115-22	651 bp	BOLD:AEK3129	/	France Herault	Pezotettiginae
52	UMAAl1118-22	550 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
53	UMAAl1309-22	655 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
54	UMAAl138-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
55	UMAAl139-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
56	UMAAl140-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
57	UMAAl141-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
58	UMAAl1585-22	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
59	UMAAl1593-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
60	UMAAl1595-22	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
61	UMAAl1601-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
62	UMAAl1607-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
63	UMAAl161-22	655 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae

64	UMAAI162-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
65	UMAAI163-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
66	UMAAI164-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
67	UMAAI165-22	655 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
68	UMAAI1785-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
69	UMAAI206-22	655 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
70	UMAAI208-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
71	UMAAI2261-22	669 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
72	UMAAI2263-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
73	UMAAI2292-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
74	UMAAI3262-22	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
75	UMAAI487-22	655 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
76	UMAAI609-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
77	UMAAI915-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
78	UMAAI916-22	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
79	UMAAI977-22	655 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
80	UMAANK1127-23	651 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
81	UMAANK1247-23	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
82	UMAANK1275-23	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
83	UMAANK1277-23	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
84	UMAANK1294-23	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
85	UMAANK1309-23	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
86	UMAANK1527-23	658 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
88	UMAANK1534-23	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
89	UMAANK1537-23	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
90	UMAANK1545-23	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
91	UMAANK1559-23	651 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
92	UMAANK1563-23	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
93	UMAANK1604-23	652 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
94	UMAANK1635-23	652 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
95	UMAANK1636-23	653 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
96	UMAANK1673-23	651 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
97	UMAANK1676-23	652 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
98	UMAANK1695-23	654 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae
99	UMAANK951-23	651 bp	BOLD:AAP4567	/	France Herault	Pezotettiginae

IV.1.2. Séquences comparatives issues d'autres sous-familles de la famille Acrididae

La même base de données a également été exploitée pour rechercher et télécharger plusieurs séquences génétiques appartenant à des sous-familles d'Acrididae et de *Tmethis cisti* comme outgroupe (Tableau 04), L'analyse a porté sur un total de 38 spécimens couvrant une grande diversité taxonomique et correspondant aux séquences génétiques publiées de Calliptaminae, Oedipodinae, Catantopinae, Gomphocerinae et Acridinae. Ces séquences ont permis la construction d'un arbre phylogénétique des Acrididae, afin de déterminer la position phylogénétique des Pezotettiginae au sein de cette famille. Certaines entrées ne comportent toutefois pas de code GenBank ou de BIN, ce qui pourrait indiquer une séquence non publiée ou en attente de validation.

Tableau 04. Données taxonomiques et génétiques relatives aux séquences étudiées de la famille d'Acrididae.

	Process ID	Taille du marqueur	Bold code (Bin ID)	Code GenBank	Localité	Taxon étudié
1	ANBIO158-19	658 bp	BOLD:AGP9749	/	United Kingdom (GB)	<i>Omocestus-viridulus</i>
2	FBORT220-09	658 bp	BOLD:AGP9749	GU706168	Germany (DE)	<i>Omocestus-viridulus</i>
3	ANBIO291-19	658 bp	BOLD:AGP9749	/	United Kingdom	<i>Chorthippus-brunneus</i>
4	FBORT104-09	658 bp	BOLD:AGR5822	GU706143	Germany	<i>Stenobothrus-lineatus-</i>
5	FBORT125-09	602 bp	BOLD:AGR5822	GU706102	Germany	<i>Stenobothrus-nigromaculatus</i>
6	FBORT230-09	658 bp	BOLD:AAF3671	HM422219	Germany	<i>Chorthippus-pullus</i>
7	AALOR090-17	658 bp	BOLD:AAC3399		Italy (IT)	<i>Chorthippus</i>
8	FBORT089-09	590 bp	BOLD:AAC3399	GU706069	Germany	<i>Pseudochorthippus-parallelus</i>
9	ANBIO142-19	658 bp	BOLD:AAC5779	/	United Kingdom	<i>Chorthippus-brunneus</i>
10	FBORT075-09	658 bp	BOLD:AAC5779	HQ955715	Germany	<i>Gomphocerippus-rufus</i>
11	FBORT248-09	636 bp	BOLD:AAC5779		Germany	<i>Chorthippus-mollis</i>
12	FBORT074-09	658 bp	BOLD:AAC5779	HQ955714	Germany	<i>Gomphocerippus-rufus</i>
13	ANBIO294-19	658 bp	BOLD:AAC5779	/	United Kingdom	<i>Omocestus-viridulus</i>
14	FBORT070-09	658 bp	BOLD:AGP9082	GU706074	Germany	<i>Gomphocerus-sibiricus</i>
15	FBORT087-09	658 bp	BOLD:AAC3397	HQ955722	Germany	<i>Chorthippus-dorsatus</i>
16	MAORT442-11	658 bp	BOLD:AAJ1691	KJ672115	Pakistan (PK)	<i>Acrida-willemsei</i>
17	GCEP086-18	658 bp	BOLD:ACN8433	/	Ghana (GH)	<i>Acrida-bicolor</i>
18	IBIOR088-17	658 bp	BOLD:AAP6089	OR974525	Portugal (PT)	<i>Truxalis-nasuta</i>
19	GBMH3125-07	402 bp	/	DQ230738		<i>Duroniella-fracta</i>

20	FBORT499-13	658 bp	BOLD:AEI2886	/	Germany	<i>Sphingonotus-caerulans</i>
21	FBORT102-09	658 bp	BOLD:AEI2886	GU706137	Germany	<i>Sphingonotus-caerulans</i>
22	FBORT142-09	633 bp	BOLD:AAC9181	GU706103	Germany	<i>Oedipoda-caerulescens</i>
23	FBORT144-09	586 bp	BOLD:AAC9181	GU706104	Germany	<i>Oedipoda-caerulescens</i>
24	ATISA5019-16	220 bp	/	/	Malaysia (MY)	<i>Xenocatantops</i>
25	CTISA6539-16	280 bp	/	/	Malaysia	<i>Xenocatantops</i>
26	CTISA5928-16	220 bp	/	/	Malaysia	<i>Xenocatantops</i>
27	GBMOR2014-19	607 bp	/	JX033913		<i>Sphenophyma-rugulosa</i>
28	GBA8027-12	1151 bp	/	GU326338	Morocco (MA)	<i>Calliptamus-barbarus</i>
29	GBMOR1417-15	530 bp	BOLD:AAE7613	KM207194	Algeria (DZ)	<i>Calliptamus-barbarus</i>
30	GBMOR1207-14	1446 bp	BOLD:ACQ0538	GQ355947	France (FR)	<i>Calliptamus-barbarus</i>
31	GBMOR1206-14	1398 bp	BOLD:ACQ2361	GQ355954	France	<i>Calliptamus-siciliae</i>
32	GBMOR1170-14	1318 bp	BOLD:ACG9657	GQ355951	Algeria	<i>Calliptamus-wattenwylanus</i>
33	GBMOR1212-14	1318 bp	BOLD:ACG9657	GQ355952	Morocco	<i>Calliptamus-wattenwylanus</i>
34	GBMOR1209-14	1425 bp	BOLD:ACG9657	GQ355953	France	<i>Calliptamus-wattenwylanus</i>
35	GBMIX3318-16	658 bp	BOLD:AGB1775	/	Germany	<i>Calliptamus-italicus</i>
36	GBMOR1210-14	1380 bp	BOLD:ACQ2225	GQ355955	France	<i>Paracaloptenus-bolivar</i>
37	GMKMZ1911-15	531 bp	BOLD:ABA8562	/	Kenya	<i>Catantops-momboensis</i>
38	KINS2615-11	4658 bp	BOLD:ABA8562	/	Kenya	<i>Catantops-momboensis</i>
39	GBAAW52688-24	824 bp	BOLD:AGD0050	PP377911	Morocco	<i>Tmethis-cisti</i>

La taille de la majorité des marqueurs est comprise entre 590 et 658 pb, ce qui correspond à la taille standard du code-barres ADN (gène COI) utilisé dans les analyses phylogénétiques. Cette variabilité peut être attribuée à des différences dans les protocoles de séquençage ou dans la qualité des données disponibles pour chaque spécimen.

Les origines géographiques sont également diversifiées : les spécimens proviennent principalement d'Europe (Allemagne, Royaume-Uni, France, Italie, Portugal, etc.), mais aussi d'Afrique (Maroc, Algérie, Ghana, Kenya) et d'Asie (Pakistan, Malaisie). Cette représentation géographique large est précieuse pour l'analyse phylogénétique, car elle permet une comparaison des séquences à la fois intra- et intercontinentales, renforçant ainsi la robustesse des inférences évolutives.

IV.2. Position phylogénétique de Pezotettiginae au sein de la famille Acrididae

L'arbre phylogénétique de la famille Acrididae reconstruit à partir des séquences du gène mitochondrial COI-5P, en utilisant les méthodes du Maximum de vraisemblance (ML) et Bayésienne (MrBayes), permet de clarifier la position évolutive de la sous-famille Pezotettiginae au sein de la famille des Acrididae (Figure 18 et 19).



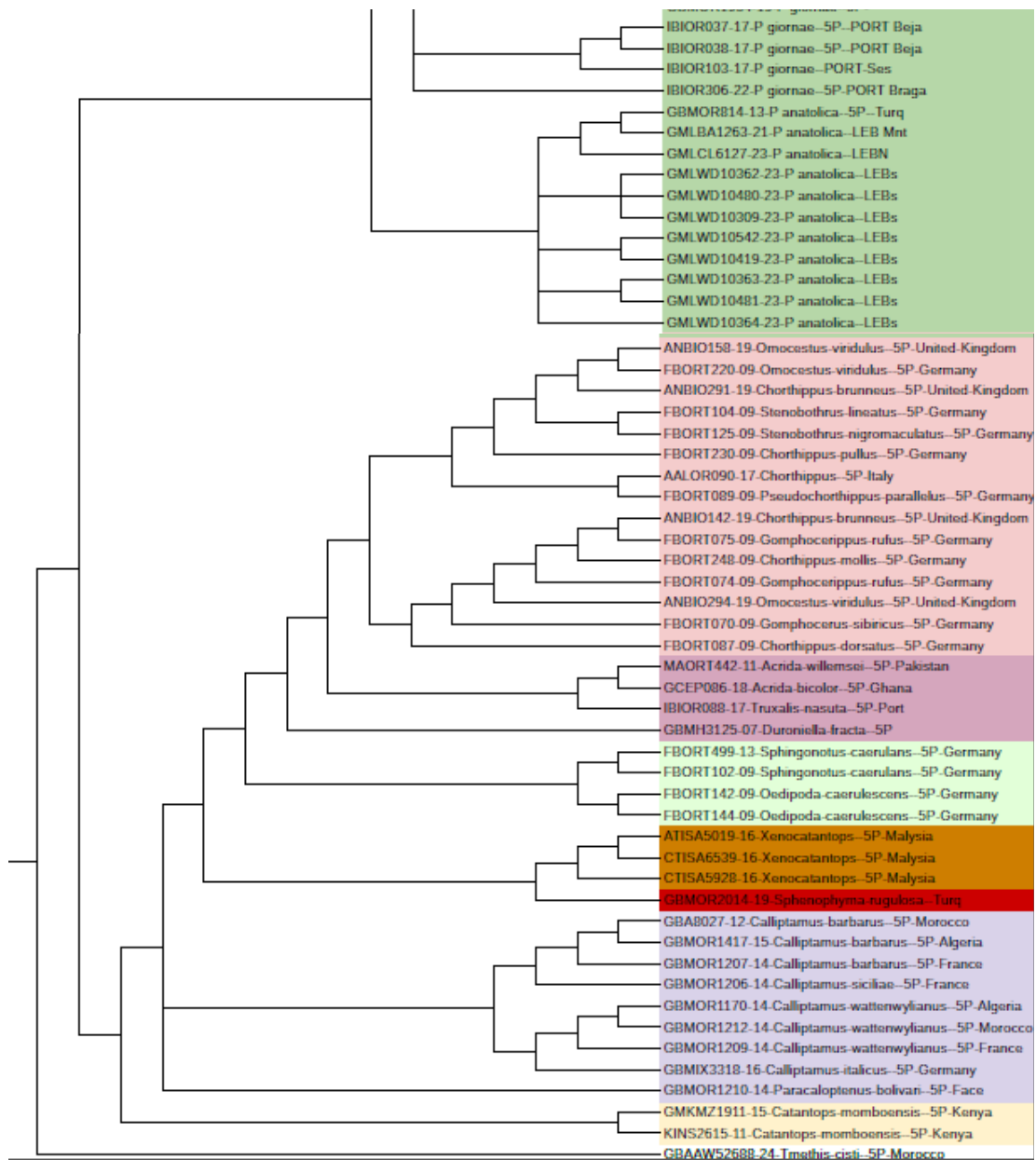
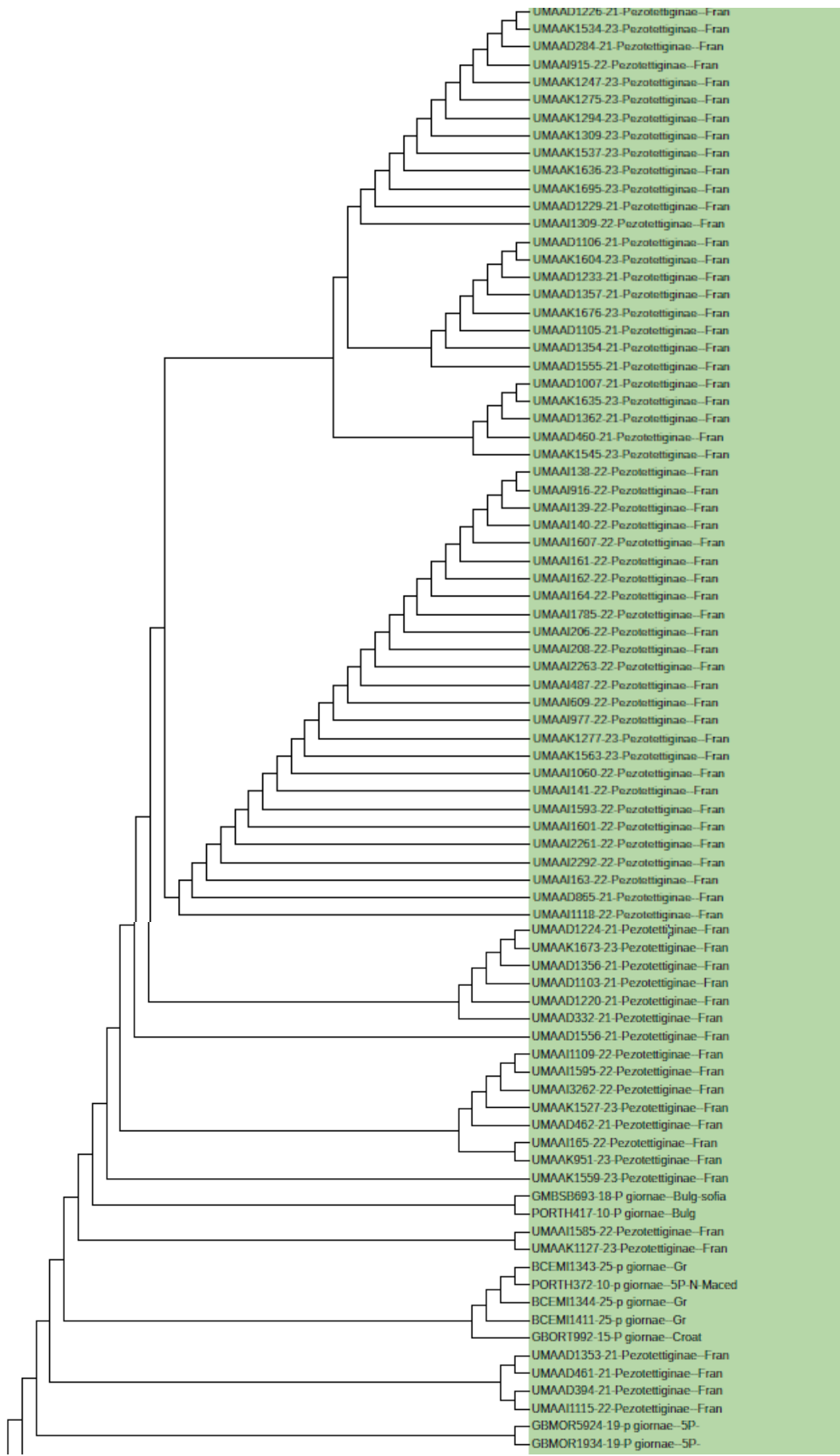


Figure 18. Arbre phylogénétique du Mr Bayes déduit pour la famille des Acrididae. L'arbre est enraciné sur *Tmethis cisti* comme outgroup.



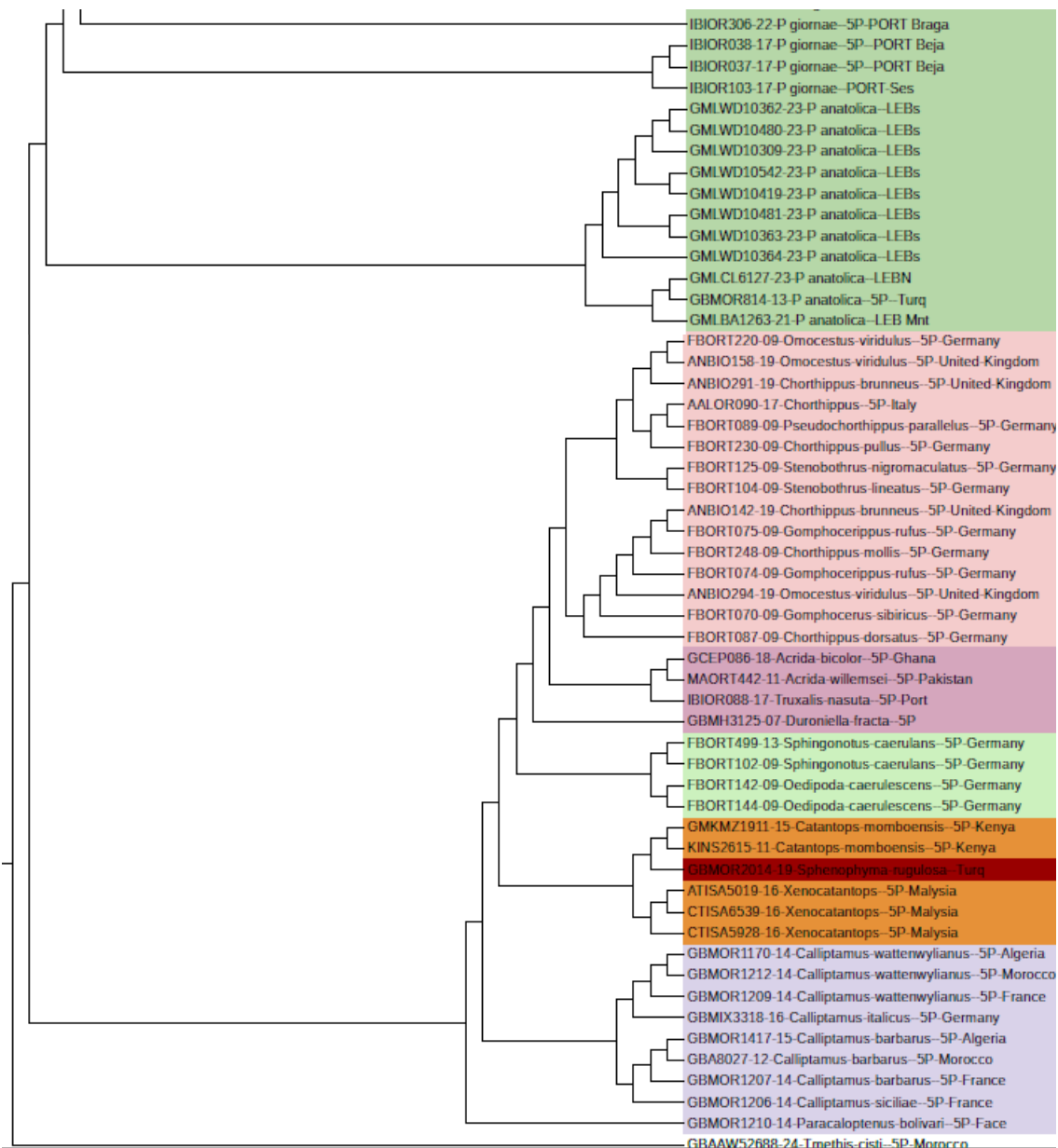


Figure 19. Arbre phylogénétique du maximum de vraisemblance (ML) déduit pour la famille des Acrididae. L'arbre est enraciné sur *Tmethis cisti* comme outgroup.

IV.2.1. Monophylie ou paraphylie de Pezotettiginae

Les deux arbres révèlent que les différents spécimens de la sous famille Pezotettiginae identifiés comme *Pezotettix giornae*, *P. anatolica* ou simplement «Pezotettiginae» (issus principalement de France, Liban, Turquie, Grèce, Portugal, etc.) forment un clade distinct et bien soutenu, ce qui suggère une monophylie claire de la sous-famille. Ce regroupement est renforcé par la stabilité des BIN des séquences étudiées.

Bien que la sous-famille Pezotettiginae apparaisse comme monophylétique dans les deux arbres, le genre *Sphenophyma* (représenté par l'espèce *Sphenophyma rugulosa*) n'est pas inclus dans le même clade que les autres descendants de la sous-famille, mais se retrouve positionné

plus éloigné, voire à proximité de certains représentants d'autres sous-familles. Elle est aux seins de la sous famille cathantopinae. Il semble que cette espèce partage un ancêtre commun avec les catantopinae mais pas de clade direct avec Pezotettiginae, ce qui montre que la relation entre Pezotettiginae et *Sphenophyma* reste à clarifier. Cela pourrait être dû à la convergence génétique et morphologique entre les de *Sphenophyma rugulosa* et les Catantopinae notamment le genre *Xenocatantops*.

Il est possible que *Sphenophyma rugulosa* ne soit pas correctement placé dans Pezotettiginae d'un point de vue phylogénétique, et que son inclusion dans cette sous-famille soit basée uniquement sur des critères morphologiques, qui peuvent être convergents ou trompeurs. Cette hypothèse plaide pour une révision taxonomique du genre (Uvarov, 1934).

De plus, le gène mitochondrial COI, bien qu'efficace pour identifier les espèces, il peut être moins performant pour résoudre les relations phylogénétiques profondes ou intergenres et une approche multilocus (incluant gènes nucléaires) renforcerait les inférences phylogénétiques est nécessaire (Meyer et Paulay, 2005 ; Susko et Roger, 2012).

Des événements comme l'introgession, la conservation de séquences ancestrales ou un taux d'évolution variable peuvent fausser la reconstruction de certains groupes. *Sphenophyma* pourrait représenter une lignée ancienne de Pezotettiginae, qui a divergé précocement et accumulé davantage de mutations, ce qui explique son éloignement phylogénétique. Sa position externe ne remet pas nécessairement en cause son appartenance à la sous-famille, mais suggère une divergence plus ancienne que celle observée entre *Pezotettix giornae* et *P. anatolica* (Chapco, 2013).

De même la présence d'un seul spécimen de *Sphenophyma* dans l'analyse (Turquie) limite la robustesse de l'interprétation.

IV.2.2. Position au sein des Acrididae

D'après des deux arbres construits, Le clade Pezotettiginae est situé en position externe par rapport aux grandes sous-familles étudiées :

- ✓ **Calliptaminae** (*Calliptamus spp.*),
- ✓ **Oedipodinae** (*Oedipoda, Sphingonotus*),
- ✓ **Acridinae** (*Acrida, Truxalis*),
- ✓ **Gomphocerinae** (*Chorthippus, Gomphocerus, Omocestus*),
- ✓ **Catantopinae** (*Catantops, Xenocatantops*).

Cette position relativement basale ou périphérique suggère que les Pezotettiginae pourraient représenter une lignée ancienne ou isolée dans l'évolution des Acrididae, se différenciant nettement des autres sous-familles par leur séquence COI (Song *et al.*, 2015 ; Song *et al.*, 2018).

Les deux méthodes placent Pezotettiginae à proximité de Gomphocerinae, mais des différences subtiles dans les relations exactes peuvent exister ce qui pourrait refléter des variations dans les supports statistiques. La proximité avec Gomphocerinae dans les deux arbres suggère que Pezotettiginae pourrait partager un ancêtre commun avec ces groupes. Certaines études moléculaires suggèrent une affinité morpho-génétique générale entre Catantopinae incluant potentiellement Pezotettiginae, Calliptaminae, et d'autres sous-familles (Chapco, 2013).

D'après les études de Liu *et al.* (2008) Sukhikh *et al.* (2019), les Acrididae constituent la famille de sauterelles la plus diversifiée. De nombreuses tentatives pour élucider les relations phylogénétiques au sein de cette famille n'ont pas permis d'obtenir une image claire, notamment en raison du nombre limité de marqueurs moléculaires utilisés et leurs relations phylogénétiques nécessitent des recherches plus approfondies.

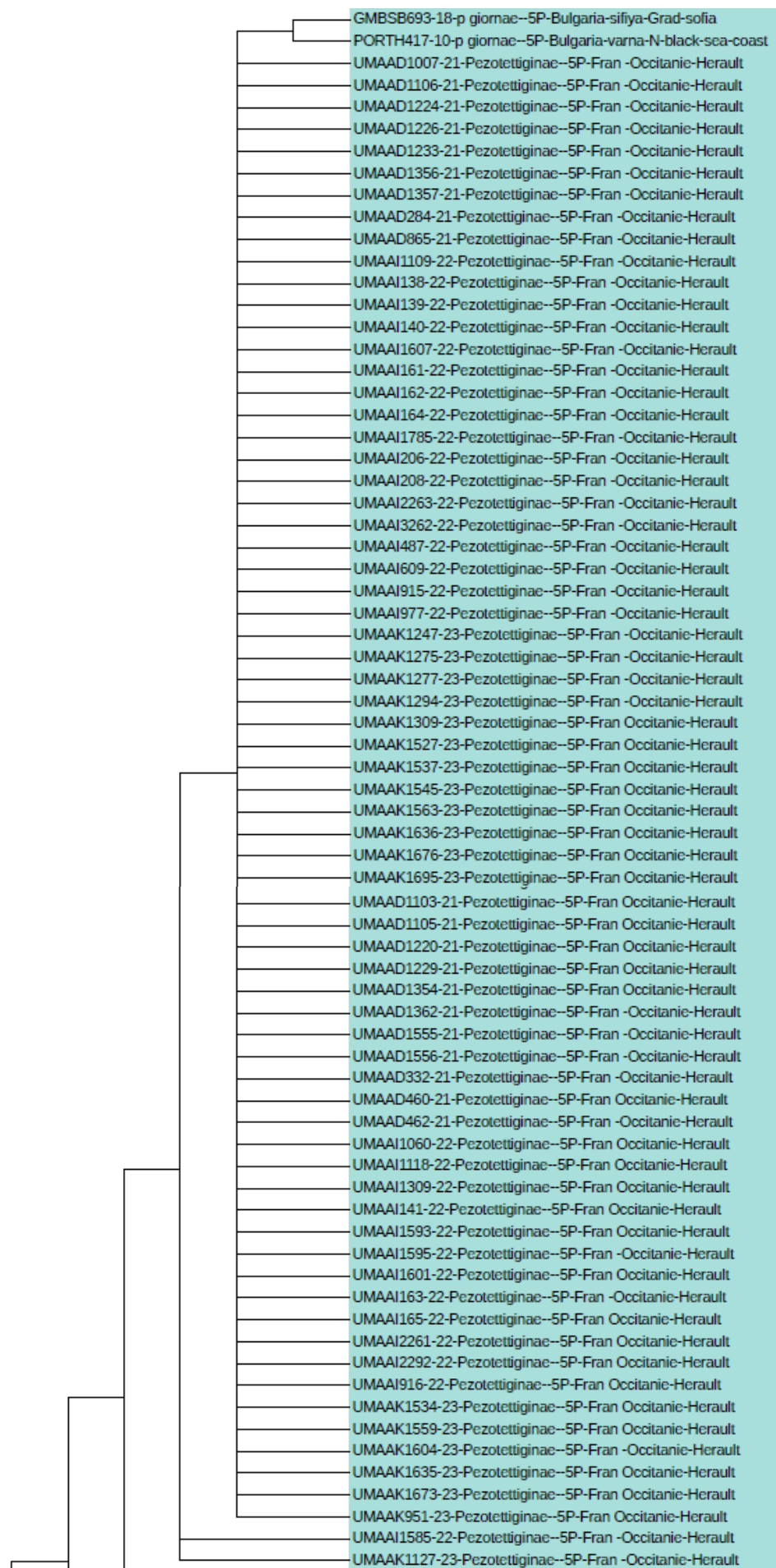
IV.3. Reconstruction des relations évolutives intra-groupe de la sous-famille Pezotettiginae

Afin d'analyser de manière approfondie les relations évolutives entre les différents descendants de Pezotettiginae, on a construit un arbre phylogénétique de de cette sous famille à partir des séquences du gène mitochondrial COI-5P, en utilisant également les méthodes du Maximum de vraisemblance (ML) et Bayésienne (MrBayes) (Figure 19 et 20), ces arbres permettent de noter que :

- *Sphenophyma rugulosa* prend une position basale et isolée et est placé à l'extérieur de l'ensemble des autres feuilles de l'arbre, séparé par une branche longue, ce qui indique une divergence génétique importante. Cela confirme ce qui a été observé par Uvarov (1934) et que *Sphenophyma rugulosa* ne fait pas partie du genre *Pezotettix*. Son inclusion dans Pezotettiginae est donc contestable d'un point de vue moléculaire.
- Les spécimens identifiés comme *P. anatolica*, majoritairement issus du Liban (séparation géographique nette) forme un clade monophylétique distinct (Clade A) génétiquement différencié de *P. giornae*. Cela soutient la validité de *P. anatolica* comme espèce distincte.

- Bien qu'un clade principal (Clade B) fortement structuré autour de *Pezotettix giornae* contenant les spécimens identifiés comme *Pezotettiginae* ou *P. giornae* apparaissent dans les deux arbres phylogénétiques (MrBayes, ML), une analyse attentive de leur distribution montre qu'ils se répartissent avec une structuration géographique modérée en plusieurs sous-groupes génétiquement distincts, parfois plus proches entre eux qu'avec *P. anatolica* :
- Deux sous-groupes portugais, un triplet et un isolé (IBIOR103-17, IBIOR038-17, IBIOR037-17) et (IBIOR306-22) indiquent une certaine différenciation locale, peut-être intra-régionale ;
- Un sous-groupe probablement d'origine espagnole (GBMOR1934-19, GBMOR5924-19). Les deux spécimens se regroupent entre eux, suggérant une origine géographique partagée. ;
- Un sous-groupe français homogène identifiés comme *Pezotettiginae* constitué de quatre séquences bien regroupées (5PUMA AI1115-22, UMAAD394-21, UMAAD461-21, UMAAD1353-21) ;
- Un sous-groupe balkanique distinct contenant les spécimens de Grèce, Croatie et Macédoine (GBORT992-15, PORTH372-10, BCEMI1411-25, BCEMI1344-25, BCEMI1343-25) ce qui montre une cohérence régionale forte ;
- Un sous-groupe identifié comme *Pezotettiginae* contenant le reste des séquences française regroupé avec deux séquences bulgares (PORTH417-10, GMBSB693-18) indiquant soit une origine génétique partagée ou une sous-résolution du marqueur COI (Meyer et Paulay, 2005 ; Susko et Roger, 2012).

Nos analyses moléculaires mettent en évidence une structuration génétique complexe au sein de *Pezotettix giornae*, laquelle se divise en plusieurs sous-groupes régionaux distincts. Cette structuration coïncide globalement avec les BINs attribués à la sous-famille par le système BOLD, suggérant une paraphylie potentielle de *P. giornae*. Cette configuration est compatible avec la présence de taxons cryptiques ou d'espèces proches insuffisamment différenciées sur le plan morphologique.



Clade A

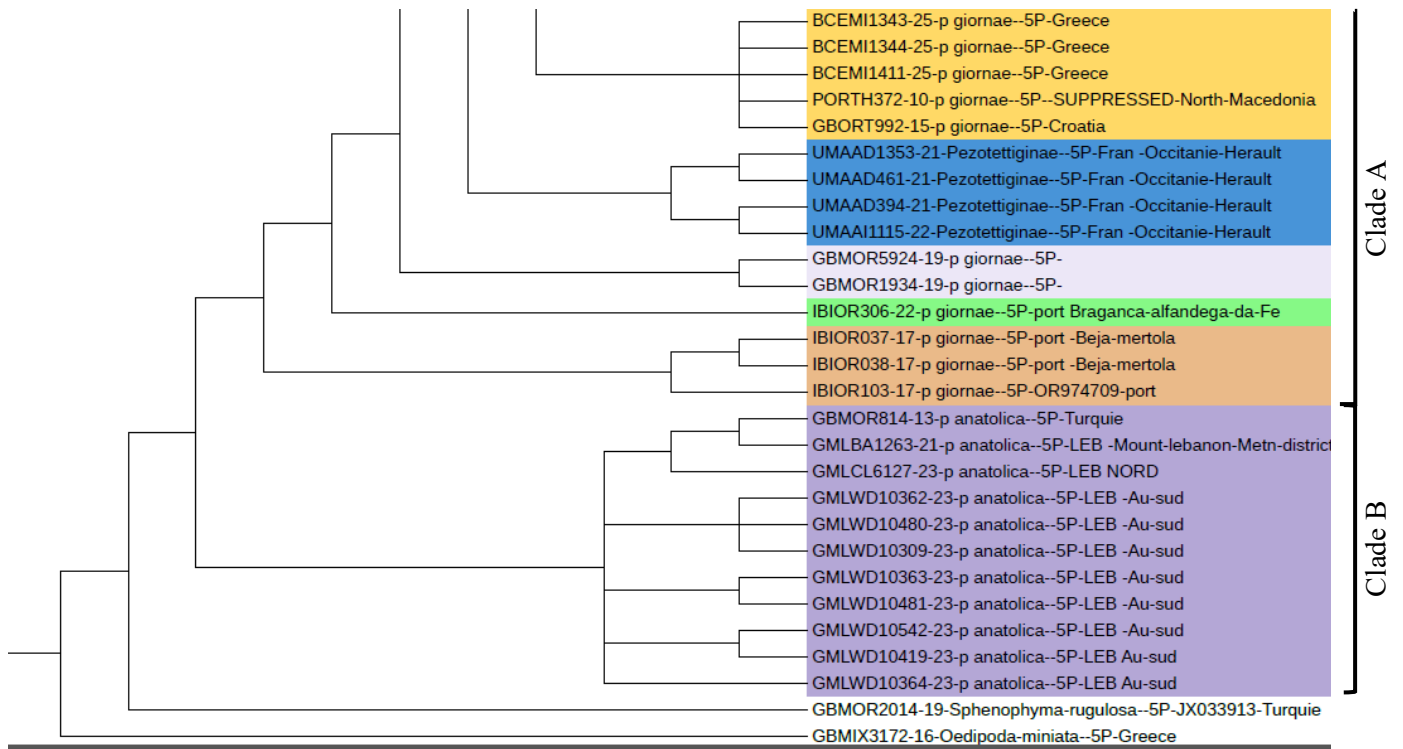
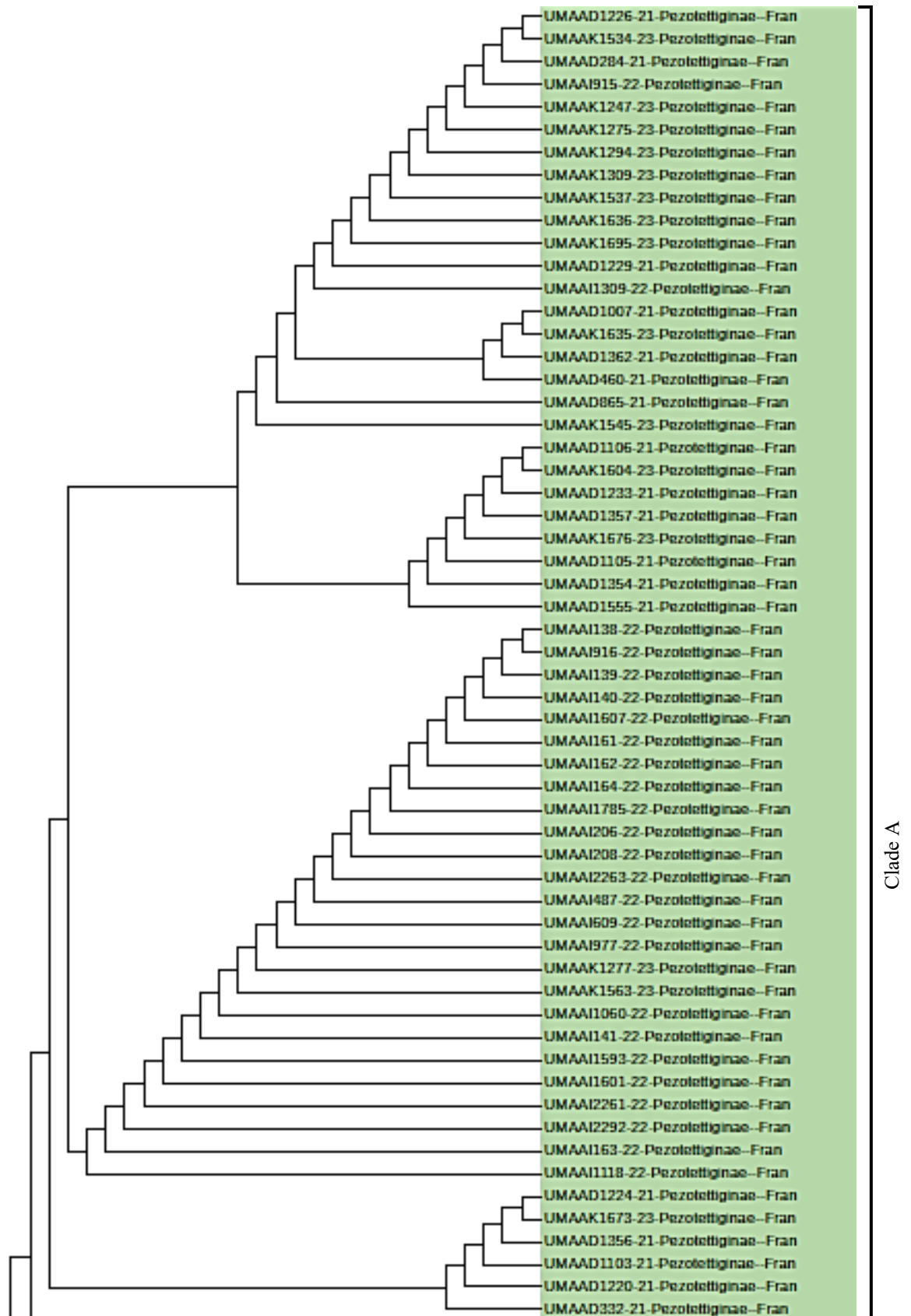


Figure 20. Arbre phylogénétique du Mr Bayes déduit pour la sous famille Pezotettiginae.

L'arbre est enraciné sur *oedipoda munita* comme outgroupe.



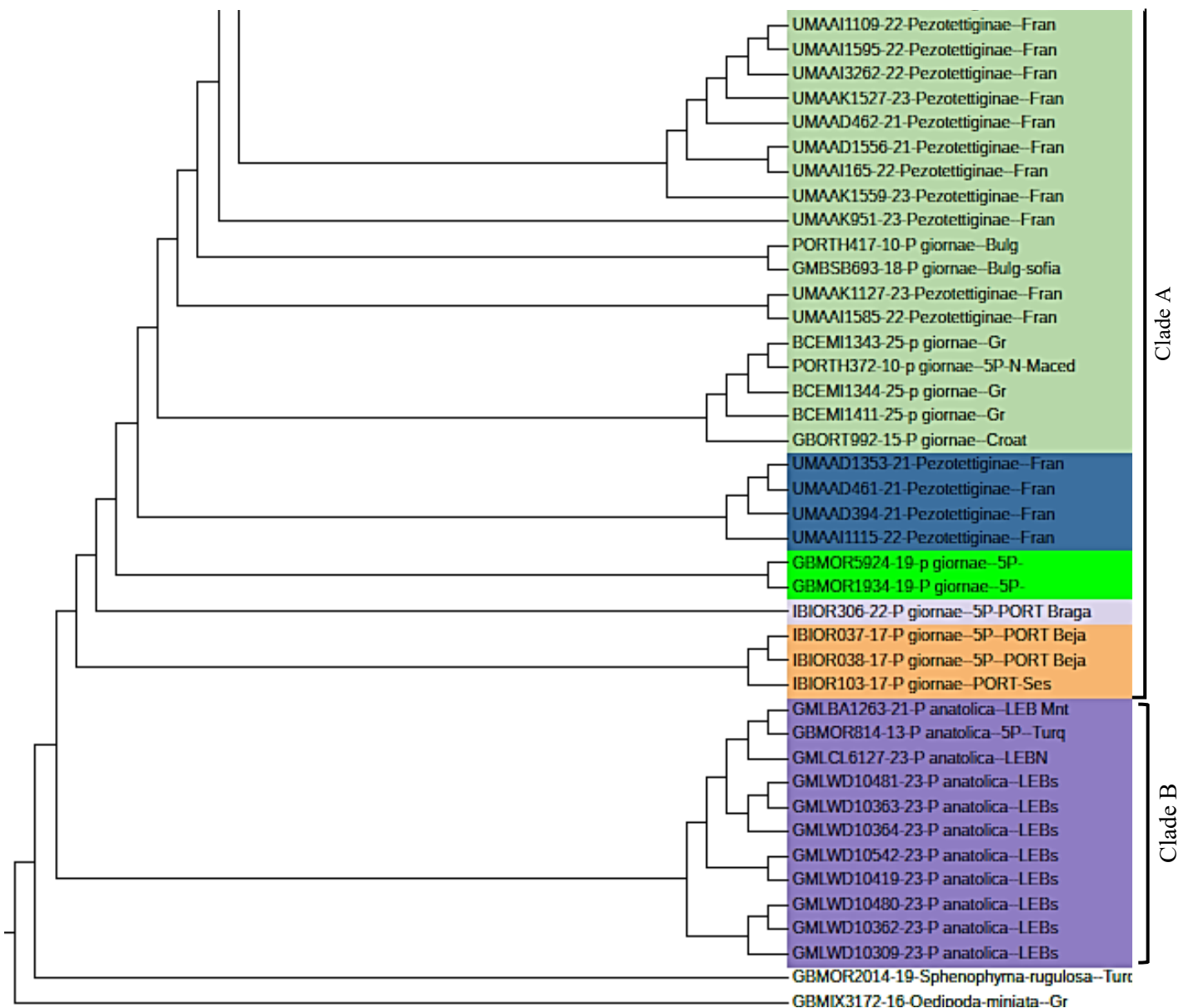


Figure 21. Arbre phylogénétique du maximum de vraisemblance déduit pour la sous famille Pezotettiginae. L'arbre est enraciné sur *oedipoda munita* comme outgroup.

IV.4. Identification et délimitation moléculaire des espèces au sein de la sous-famille Pezotettiginae

La configuration des arbres phylogénétiques suggère la possible présence de taxons cryptiques ou d'espèces proches insuffisamment différenciées morphologiquement, ce qui justifie le recours à des méthodes de délimitation moléculaire. Dans ce contexte, cinq méthodes ont été appliquées : ASAP, ABGD, PTP, mPTP et bPTP (Annexes 02-06). La figure ci-dessous illustre les résultats obtenus par ces approches, représentés sous forme de barres placées aux extrémités de l'arbre phylogénétique.

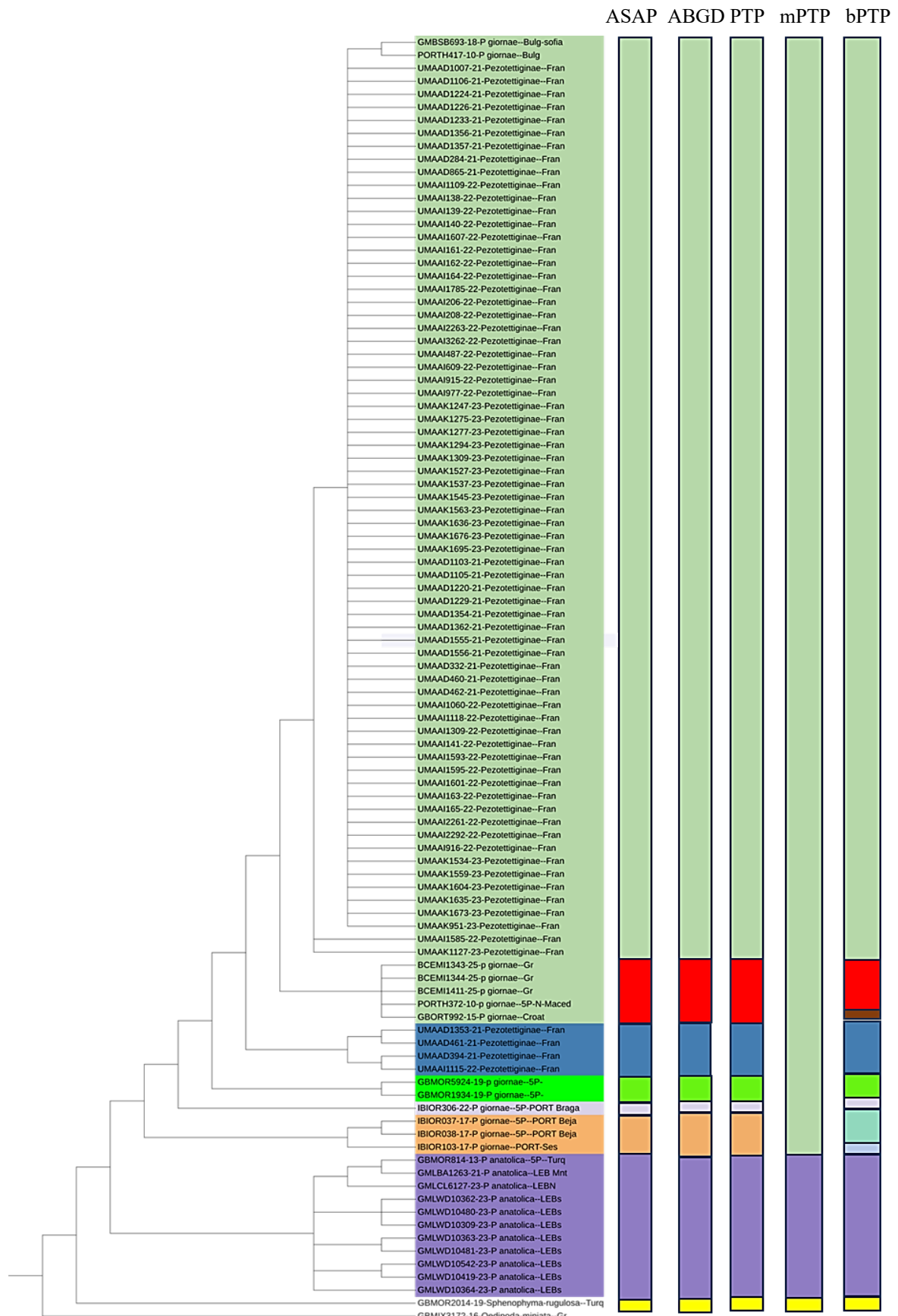


Figure 22. Résultats de l'analyse de délimitation des Pezotettiginae sur l'arbre phylogénétique : Les barres de couleur à droite de chaque clade représentent les mOTUs obtenus par les méthodes de délimitation : ASAP et ABGD, bPTP et mPTP et Bptp (les partitions obtenus par l'ASAP, ABGD et PTP sont quasi-totalement compatibles avec les BINs du system BOLD).

Les délimitations proposées ont ensuite été comparées aux identifications issues des arbres phylogénétiques, permettant une évaluation croisée de la structure évolutive du groupe étudié. Les résultats issus des différentes méthodes de délimitation d'espèces montrent une variabilité notable selon l'approche utilisée. Les méthodes ASAP, ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery) et PTP (Poisson Tree Processes) ont toutes identifié 7 unités taxonomiques moléculaires (mOTUs), reflétant une structuration génétique fine et cohérente avec les données de barcoding. Ces méthodes ont produit une partition des séquences proche de celle définie par les BINs (Barcode Index Numbers) dans la base de données BOLD Systems, validant ainsi leur capacité à détecter des groupes génétiquement cohérents susceptibles de correspondre à des entités biologiques réelles. Ces résultats confirment également la pertinence du système BIN pour identifier des unités taxonomiques au sein des Pezotettiginae et suggèrent l'existence de plusieurs sous-groupes génétiquement différenciés dans le clade *P. giornae*, renforçant l'hypothèse d'une diversité cryptique.

À l'opposé, la méthode bPTP (bayesian Poisson Tree Processes) a délimité 8 mOTUs, ce qui indique une sensibilité plus marquée à la divergence génétique, et donc une propension accrue à la sur-délimitation d'espèces. En revanche, la méthode mPTP (multi-rate Poisson Tree Processes), plus conservatrice, n'a reconnu que 3 mOTUs. Cette dernière tend à regrouper davantage de séquences au sein des mêmes entités taxonomiques, en accord avec les identifications morphologiques traditionnelles, ce qui suggère une moindre sensibilité à la variation intra-spécifique et une tendance à éviter la sur-délimitation causée par des divergences géographiques ou locales.

Ainsi, la variation observée entre les méthodes souligne l'importance d'intégrer les données moléculaires avec des approches multilocus (incluant gènes nucléaires), ainsi que des critères morphologiques et écologiques afin d'obtenir une délimitation taxonomique robuste et biologiquement pertinente.

L'étude morphologique détaillée d'Uvarov (1934) souligne depuis longtemps la nécessité d'une révision approfondie du genre *Pezotettix*. En effet, ce dernier comprend plusieurs formes morphologiquement proches mais distinctes, dont la différenciation repose sur des caractères souvent fins et difficilement détectables sans une analyse rigoureuse. L'auteur attire notamment l'attention sur le risque de confusions taxonomiques, notamment avec *P. giornae*, si les descriptions reposent sur des spécimens limités ou des critères peu discriminants. Cette observation reste d'actualité dans le contexte des approches moléculaires modernes.

Selon l'Orthoptera Species File (OSF), neuf espèces valides sont actuellement reconnues dans le genre *Pezotettix*, mais seules deux d'entre elles -*P. giornae* et *P. anatolica*- ont été incluses dans les analyses moléculaires réalisées ici. Or, ces deux espèces génèrent à elles seules six BINs distincts dans la base BOLD. Cette situation, où six unités barcodiques émergent de seulement deux espèces échantillonnées, alors que sept autres restent génétiquement inconnues, suggère fortement que la diversité réelle du genre est sous-estimée. Il est également possible que certaines de ces BINs correspondent en réalité à des espèces valides non encore séquencées, comme *P. judaica*, *P. cotti* ou *P. curvicerca*.

Cette discordance entre la diversité morphologique reconnue et les signaux moléculaires observés met en lumière plusieurs limitations méthodologiques. D'abord, l'analyse repose uniquement sur le gène mitochondrial COI-5P, reconnu pour son efficacité en identification, mais souvent insuffisant pour résoudre les relations interspécifiques fines ou détecter des cas d'introgession ou de spéciation récente (Meyer et Paulay, 2005 ; Song *et al.*, 2008 ; Dupuis *et al.*, 2012).

Ensuite, le déséquilibre de l'échantillonnage -avec une surreprésentation de *P. giornae* et une quasi-absence des autres espèces- biaisent l'interprétation de la structure évolutive réelle du genre, d'ailleurs Susko et Roger (2012) montrent que même si l'arbre global est assez résolu, certaines branches spécifiques peuvent nécessiter beaucoup plus de données en particulier les branches courtes ou celles où l'échantillonnage taxonomique est limité.

En fin, les données actuellement disponibles suggèrent que le genre *Pezotettix*, tel qu'il est défini, présente une diversité génétique plus complexe que ne le laisse entendre la classification morphologique actuelle. Une approche intégrative, combinant génétique multilocus, morphologie comparative et données écologiques, apparaît indispensable pour clarifier la délimitation spécifique, évaluer la validité des BINs, et éventuellement réviser la taxonomie de la sous-famille Pezotettiginae dans son ensemble.

Conclusion

Cette étude a permis d'explorer la diversité génétique et la position phylogénétique de la sous-famille des Pezotettiginae (Orthoptera : Acrididae) à travers l'analyse du marqueur mitochondrial COI-5P, en s'appuyant sur les données disponibles dans la base BOLD Systems et en appliquant plusieurs méthodes de délimitation d'espèces. Six BINs ont été proposés par la base de données Bold, correspondant à deux entités spécifiques potentielles, *Pezotettix giornae* et *Pezotettix anatolica*, ceci suggère une sous-estimation de la diversité actuelle du genre *Pezotettix*.

Nos analyses phylogénétiques ont mis en évidence la paraphylie du groupe des Pezotettiginae et ont soulevé des interrogations sur la position systématique de *Sphenophyma rugulosa*, appelant à une révision taxonomique fondée sur des données plus complètes. Par ailleurs, une structuration génétique significative chez *P. giornae* laisse envisager la présence de lignées cryptiques ou d'espèces non encore décrites, alors que *P. anatolica* apparaît comme une entité bien délimitée.

Ces résultats soulignent la nécessité d'une approche taxonomique intégrative, combinant des critères génétiques, morphologiques et écologiques, afin de clarifier la systématique et la diversité spécifique au sein des Pezotettiginae.

Cette étude ouvre la porte sur les Perspectives de recherche suivantes :

- ✓ Utiliser des marqueurs génétiques complémentaires (nucléaires) pour affiner les relations phylogénétiques.
- ✓ Élargir l'échantillonnage géographique et taxonomique pour détecter d'éventuelles lignées non identifiées.
- ✓ Combiner des données morphologiques, comportementales et écologiques pour appuyer la délimitation des espèces.
- ✓ Procéder à une révision taxonomique globale du groupe à partir des données intégratives.

**Références
bibliographiques**

- Bawono, P., Heringa, J.** (2014). Phylogenetic Analyses. In *Comprehensive Biomedical Physics* (p. 93-110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-53632-7.01108-4>
- Bolívar, I.** (1876). Sinopsis de los Ortópteros de España y Portugal. Segunda parte. Anales de la Sociedad Española de Historia Natural, 5, 259–372. Available at <http://bibdigital.rjb.csic.es/ing/Libro.php?Libro=1128>
- Bonifait Sylvain.** (2024). Clé simplifiée des orthoptères de Nouvelle-Aquitaine Version-1
- Brunner von Wattenwyl.** (1893). Ann. Mus. Civ. Magasin. Nat. Gênes 2 13(33) : 144 - "Pezotettiges".
- Cardona, G., Rosselló, F., & Valiente, G.** (2008). Extended Newick : It is time for a standard representation of phylogenetic networks. *BMC Bioinformatics*, 9(1), 532. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-532>
- Cigliano, M.M., H. Braun, D.C. Eades et D. Otte.** (2025). Pezotettiginae Brunner von Wattenwyl, 1893. Orthoptera Species File. Consulté le 30/04/2025 à l'adresse <http://orthoptera.speciesfile.org/otus/822520/overview>
- Chapco, W.** (2013). A Note on the Molecular Phylogeny of a Small Sample of Catantopine Grasshoppers. *Journal of Orthoptera Research*, 22(1), 15-20. <https://doi.org/10.1665/034.022.0103>
- Chopard,L.** (1922). Orthoptères et Dermaptères. Faune de France (Vol. 3). Paris, France : Paul Lechevalier.
- Chopard, L.** (1943). *Orthoptéroïdes de l'Afrique du Nord*. Paris : Larose.
- Choudhuri, S.** (2014). Phylogenetic Analysis. In *Bioinformatics for Beginners* (p. 209-218). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-410471-6.00009-8>
- Christensen, H., Olsen, J. E.** (2018). Short Introduction to Phylogenetic Analysis of Molecular Sequence Data. In H. Christensen (Éd.), *Introduction to Bioinformatics in Microbiology* (p. 103-120). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-99280-8_6
- Criscuolo, A., Gribaldo, S.** (2010). BMGE (Block Mapping and Gathering with Entropy) : A new software for selection of phylogenetic informative regions from multiple sequence

- alignments. *BMC Evolutionary Biology*, 10 (1), 210. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-210>
- Darlu, P., Tassy, P.** (1993). *La reconstruction phylogénétique : Concepts et méthodes*. Masson.
- Defaut, B.** (1999). Contribution à l'étude des Caelifères de France. Documents Zoosystématiques. Données sur les espèces françaises de criquets, dont certains Pezotettiginae.
- Defaut, B.** (2001). Actualisation taxonomique et nomenclaturale du "Synopsis des orthoptères de France". *Matériaux Orthoptériques et Entomocénétiques*, 6, 107-112.
- Defaut B., Morichon D.** (2015). Criquets de France (Orthoptera, Caelifera). *Faune de France*, 97.
- Delsuc, F., Brinkmann, H., Philippe, H.** (2005). Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nature Reviews Genetics*, 6(5), 361-375. <https://doi.org/10.1038/nrg1603>
- Dupuis, J. R., Roe, A. D., Sperling, F. A. H.** (2012). Multi-locus species delimitation in closely related animals and fungi: One marker is not enough. *Systematic Biology*, 61(5), 846–863. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys033>
- Derreumaux, V.** (2014). *Les photographies illustrant la présente clé ont été réalisées par Julien Ryelandt à l'exception des photographies précisées ci-après.*
- DeSalle, R., Goldstein, P.** (2019). Review and Interpretation of Trends in DNA Barcoding. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 302. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00302>
- Edgar, R. C., et Batzoglou, S.** (2006). Multiple sequence alignment. *Current Opinion in Structural Biology*, 16 (3), 368-373. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2006.04.004>
- Frézal, L., Leblois, R.** (2008). Four years of DNA barcoding : Current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727-736. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2008.05.005>
- Fujisawa, T., Barraclough, T. G.** (2013). Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach : A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. *Systematic Biology*, 62(5), 707-724. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033>

- GBIF Backbone Taxonomy.** (2023) *Sphenophyma rugulosa* (Stål, 1876) .GBIF Secretariat Checklist dataset <https://www.gbif.org/species/1706885> accessed via GBIF.org on 2025-06-10.
- Grummer, J. A., Bryson, R. W., Reeder, T. W.** (2014). Species Delimitation Using Bayes Factors: Simulations and Application to the *Sceloporus scalaris* Species Group (Squamata: Phrynosomatidae). *Systematic Biology*, 63(2), 119-133. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt069>
- Guindon, S., Lethiec, F., Duroux, P., Gascuel, O.** (2005). PHYML Online—A web server for fast maximum likelihood-based phylogenetic inference. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server), W557-W559. <https://doi.org/10.1093/nar/gki352>
- G.Ya. BEI-BIENKO, L. L. MISHCHENKO.** (1951). Locusts and Grasshoppers of the U.S.S.R. and Adjacent Countries. <https://dn790005.ca.archive.org/0/items/locustsgrasshopp11963beib/locustsgrasshopp11963beib.pdf>
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., DeWaard, J. R.** (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321. <https://doi.org/10.1098/rspb.2002.2218>
- Hennig, W.** (1999). *Phylogenetic Systematics*. University of Illinois Press.
- Hoogstrate, Y., Jenster, G., Van De Werken, H. J. G.** (2020). *FASTAFS: File system virtualisation of random access compressed FASTA files*. Bioinformatics. <https://doi.org/10.1101/2020.11.11.377689>
- Hojun Song, Ricardo Mariño-Pérez, Derek A Woller, Maria Marta Cigliano.** (2018). Evolution, Diversification, and Biogeography of Grasshoppers (Orthoptera: Acrididae), *Insect Systematics and Diversity*, Volume 2. <https://doi.org/10.1093/isd/ixy008>
- Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., Flouri, T.** (2017). Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, 33(11), 1630-1638. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btx025>

- Petit, D.** (2005). Données récentes sur la phylogénie moléculaire des acrididae, spécialement les oedipodinae et les gomphocerinae. *Matériaux Orthoptériques et Entomocénétiques*, volume 10, pp. 7-18
- Puillandre, N.** (2008). *Qu'est-ce qu'un code-barre moléculaire ? | Planet-Vie*. <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/ecologie/biodiversite/qu-est-ce-qu-un-code-barre-moleculaire>
- Puillandre, N., Lambert, A., Brouillet, S., Achaz, G.** (2012). ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Molecular Ecology*, 21(8), 1864-1877. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x>
- Puillandre, N., Brouillet, S., Achaz, G.** (2021). ASAP: Assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609-620. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.13281>
- Rannala B., Yang Z.** (2020). Species Delimitation. In Scornavacca, C., Delsuc, F., and Galtier, N., editors, *Phylogenetics in the Genomic Era*, chapter No. 5.5, pp. 5.5:15.5:18. No commercial publisher | Authors open access book. The book is freely available at <https://hal.inria.fr/PGE>.
- Ratnasingham S, Wei C, Chan D, Agda J, Agda J, Ballesteros-Mejia L, Ait Boutou H, El Bastami Z M, Ma E, Manjunath R, Rea D, Ho C, Telfer A, McKeowan J, Rahulan M, Steinke C, Dorsheimer J, Milton M, Hebert PDN** (2024). BOLD v4: A Centralized Bioinformatics Platform for DNA-Based Biodiversity Data. In *DNA Barcoding: Methods and Protocols*, pp. 403-441. Chapter 26. New York, NY: Springer US, 2024.
- Ratnasingham, S., Hebert, P. D. N.** (2013). A DNA-based registry for all animal species: The Barcode Index Number (BIN) system. *PLoS ONE*, 8(7), e66213. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0066213>
- Secrétariat du GBIF.** (2020). Taxonomie de base du GBIF. <https://doi.org/10.15468/39omei> . Consulté via <https://www.gbif.org/species> .
- Sievers, F., Wilm, A., Dineen, D., Gibson, T. J., Karplus, K., Li, W., Lopez, R., McWilliam, H., Remmert, M., Söding, J., Thompson, J. D., Higgins, D. G.** (2011). Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. *Molecular Systems Biology*, 7(1), 539. <https://doi.org/10.1038/msb.2011.75>

- Song, H., Buhay, J. E., Whiting, M. F., Crandall, K. A. (2008).** Many species in one : DNA barcoding overestimates the number of species when nuclear mitochondrial pseudogenes are coamplified. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(36), 13486-13491. <https://doi.org/10.1073/pnas.0803076105>
- Song, H., Amédégnato, C., Cigliano, M. M., Desutter-Grandcolas, L., Heads, S. W., Huang, Y., Otte, D., Whiting, M. F. (2015).** 300 million years of diversification : Elucidating the patterns of orthopteran evolution based on comprehensive taxon and gene sampling. *Cladistics*, 31(6), 621-651. <https://doi.org/10.1111/cla.12116>
- Song, H., Mariño-Pérez, R., Woller, D. A., Cigliano, M. M. (2018).** Evolution, Diversification, and Biogeography of Grasshoppers (Orthoptera : Acrididae). *Insect Systematics and Diversity*, 2(4), 3. <https://doi.org/10.1093/isd/ixy008>
- Susko, E., Roger, A. J. (2012).** The Probability of Correctly Resolving a Split as an Experimental Design Criterion in Phylogenetics. *Systematic Biology*, 61(5), 811-821. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys033>
- Taguan. (2015).** Les arbres phylogénétiques. Zeste de Savoir ; Zeste de Savoir. <https://zestedesavoir.com/articles/223/les-arbres-phylogenetiques/>
- Uvarov. B. P. (1943).** Studies in the Orthoptera of Turkey, Iraq and Syria ,112-116.
Eos, Revista Española de Entomología" (Vol. 19, pp. 112–116, 1943)
- Yang, Z. (2006).** *Computational molecular evolution*. Oxford University press.
- Zhang, J., Kapli, P., Pavlidis, P., Stamatakis, A. (2013).** A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. *Bioinformatics*, 29(22), 2869-2876. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>
- Zhu, S., Liu, Q., Qiu, S., Dai, J., Gao, X. (2022).** DNA barcoding : An efficient technology to authenticate plant species of traditional Chinese medicine and recent advances. *Chinese Medicine*, 17(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s13020-022-00655-y>
- Zou, Y., Zhang, Z., Zeng, Y., Hu, H., Hao, Y., Huang, S., Li, B. (2024).** Common Methods for Phylogenetic Tree Construction and Their Implementation in R. *Bioengineering*, 11(5), 480. <https://doi.org/10.3390/bioengineering11050480>.

Annexes

Annexe 01. Morphologie externe de *Sphenophyma rugulosa*
(*Sphenophyma rugulosa* (Stål, 1876) in GBIF Secretariat (2023)).



Annexes 03. Résultats de Automatic Barcoding Gap Discovery ABGD.

Initial Partition with prior maximal distance $P=7.74e-03$; Barcode gap distance = 0.017

Distance JC69 Jukes-Cantor MinSlope=1.500000

Group[1] n: 5 ;id: BCEMI1343-25|p_giornae|-Gr BCEMI1344-25|p_giornae|-Gr BCEMI1411-25|p_giornae|-Gr PORTH372-10|p_giornae|-5P|N-Maced GBORT992-15|P_giornae|-Croat

Group[2] n: 1 ;id: GBMOR2014-19|Sphenophyma rugulosa|-Turq

Group[3] n: 2 ;id: GBMOR5924-19|p_giornae|-5P| GBMOR1934-19|P_giornae|-5P|

Group[4] n: 11 ;id: GBMOR814-13|P_anatolica|-5P|-Turq GMLCL6127-23|P_anatolica|-LEBN GMLWD10362-23|P_anatolica|-LEBs GMLWD10363-23|P_anatolica|-LEBs GMLWD10480-23|P_anatolica|-LEBs GMLWD10542-23|P_anatolica|-LEBs GMLBA1263-21|P_anatolica|-LEB_Mnt GMLWD10309-23|P_anatolica|-LEBs GMLWD10364-23|P_anatolica|-LEBs GMLWD10419-23|P_anatolica|-LEBs GMLWD10481-23|P_anatolica|-LEBs

Group[5] n: 71 ;id: GMBSB693-18|P_giornae|-Bulg-sofia PORTH417-10|P_giornae|-Bulg UMAAD1007-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1106-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1224-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1226-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1233-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1356-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1357-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD284-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD865-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAI1109-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI138-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI139-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI140-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI1585-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI1607-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI161-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI162-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI164-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI1785-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI206-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI208-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI2263-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI3262-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI487-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI609-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI915-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI977-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1127-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1247-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1275-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1277-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1294-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1309-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1527-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1537-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1545-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1563-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1636-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1676-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1695-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1103-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1105-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1220-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1229-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1354-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1362-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1555-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD1556-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD332-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD460-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD462-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAI1060-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI1118-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI1309-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI141-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI1593-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI1595-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI1601-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI163-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI165-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI2261-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI2292-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAI916-22|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1534-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1559-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1604-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1635-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK1673-23|Pezotettiginae|-Fran UMAAK951-23|Pezotettiginae|-Fran

Group[6] n: 3 ;id: IBIOR037-17|P_giornae|-5P|-PORT_Beja IBIOR038-17|P_giornae|-5P|-PORT_Beja IBIOR103-17|P_giornae|-PORT-Ses

Group[7] n: 1 ;id: IBIOR306-22|P_giornae|-5P|PORT_Braga

Group[8] n: 4 ;id: UMAAD1353-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAD394-21|Pezotettiginae|-
Fran UMAAD461-21|Pezotettiginae|-Fran UMAAI1115-22|Pezotettiginae|-Fran

Annexes 04. Résultats de Poisson Tree Process PTP.

Species 1: GBMOR2014-19-Sphenophyma-rugulosa--Turq

Species 2: GMLWD10309-23-P_anatolica--LEBs GMLWD10362-23-P_anatolica--LEBs
GMLWD10480-23-P_anatolica--LEBs GMLWD10419-23-P_anatolica--LEBs
GMLWD10542-23-P_anatolica--LEBs GMLWD10364-23-P_anatolica--LEBs
GMLWD10363-23-P_anatolica--LEBs GMLWD10481-23-P_anatolica--LEBs
GMLCL6127-23-P_anatolica--LEBN GBMOR814-13-P_anatolica--5P--Turq
GMLBA1263-21-P_anatolica--LEB_Mnt

Species 3: IBIOR103-17-P_giornae--PORT-Ses IBIOR038-17-P_giornae--5P--PORT_Beja
IBIOR037-17-P_giornae--5P--PORT_Beja

Species 4: IBIOR306-22-P_giornae--5P-PORT_Braga

Species 5: GBMOR1934-19-P_giornae--5P- GBMOR5924-19-p_giornae--5P-

Species 6: UMAAI1115-22-Pezotettiginae --Fran UMAAD394-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD461-21-Pezotettiginae--Fran UMAAD1353-21-Pezotettiginae --Fran

Species 7: GBORT992-15-P_giornae--Croat BCEMI1411-25-p_giornae--Gr BCEMI1344-25-
p_giornae--Gr PORTH372-10-p_giornae--5P-N-Maced BCEMI1343-25-
p_giornae--Gr

Species 8: UMAAI1585-22-Pezotettiginae--Fran UMAAK1127-23-Pezotettiginae--Fran
GMBSB693-18-P_giornae--Bulg-sofia PORTH417-10-P_giornae--Bulg
UMAAK951-23-Pezotettiginae--Fran UMAAK1559-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII165-22-Pezotettiginae--Fran UMAAD1556-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD462-21-Pezotettiginae--Fran UMAAK1527-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII3262-22-Pezotettiginae--Fran UMAAI1595-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII1109-22-Pezotettiginae--Fran UMAAD332-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1220-21-Pezotettiginae--Fran UMAAD1103-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1356-21-Pezotettiginae--Fran UMAAK1673-23-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1224-21-Pezotettiginae--Fran UMAAI1118-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII163-22-Pezotettiginae--Fran UMAAI2292-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII2261-22-Pezotettiginae--Fran UMAAI1601-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII1593-22-Pezotettiginae--Fran UMAAI141-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII1060-22-Pezotettiginae--Fran UMAAK1563-23-Pezotettiginae--Fran
UMAAK1277-23-Pezotettiginae--Fran UMAAI977-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII609-22-Pezotettiginae--Fran UMAAI487-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII2263-22-Pezotettiginae--Fran UMAAI208-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII206-22-Pezotettiginae--Fran UMAAI1785-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII164-22-Pezotettiginae--Fran UMAAI162-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII161-22-Pezotettiginae--Fran UMAAI1607-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII140-22-Pezotettiginae--Fran UMAAI139-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII916-22-Pezotettiginae--Fran UMAAI138-22-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1555-21-Pezotettiginae--Fran UMAAD1354-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1105-21-Pezotettiginae--Fran UMAAK1676-23-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1357-21-Pezotettiginae--Fran UMAAD1233-21-Pezotettiginae--Fran

UMAAK1604-23-Pezotettiginae--Fran UMAAD1106-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAK1545-23-Pezotettiginae--Fran UMAAD865-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD460-21-Pezotettiginae--Fran UMAAD1362-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAK1635-23-Pezotettiginae--Fran UMAAD1007-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAI1309-22-Pezotettiginae--Fran UMAAD1229-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAK1695-23-Pezotettiginae--Fran UMAAK1636-23-Pezotettiginae--Fran
UMAAK1537-23-Pezotettiginae--Fran UMAAK1309-23-Pezotettiginae--Fran
UMAAK1294-23-Pezotettiginae--Fran UMAAK1275-23-Pezotettiginae--Fran
UMAAK1247-23-Pezotettiginae--Fran UMAAI915-22-Pezotettiginae--Fran
UMAAD284-21-Pezotettiginae--Fran UMAAK1534-23-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1226-21-Pezotettiginae--Fran

Annexes 05. Résultats de multi-rate Poisson Tree Processes-mPTP

```

Command: ../bin/mptp mptp --ml --multi --outgroup GBMIX3172-16-Oedipoda-
miniata--Gr --outgroup_crop --tree_file
../uploads/34b9eqrpj5m2d7ap2ifvhal9jl.newick --output_file
../uploads/34b9eqrpj5m2d7ap2ifvhal9jl.1
Number of edges greater than minimum branch length 0.000100: 43 / 194
Null-model score: 152.447589
Best score for multi coalescent rate: 178.911431
Number of delimited species: 3

```

Species 1:

GBMOR2014-19-Sphenophyma-rugulosa--Turq

Species 2:

GMLWD10309-23-P_anatolica--LEBs
GMLWD10362-23-P_anatolica--LEBs
GMLWD10480-23-P_anatolica--LEBs
GMLWD10419-23-P_anatolica--LEBs
GMLWD10542-23-P_anatolica--LEBs
GMLWD10364-23-P_anatolica--LEBs
GMLWD10363-23-P_anatolica--LEBs
GMLWD10481-23-P_anatolica--LEBs
GMLCL6127-23-P_anatolica--LEBN
GBMOR814-13-P_anatolica--5P--Turq
GMLBA1263-21-P_anatolica--LEB_Mnt

Species 3:

IBIOR103-17-P_giornae--PORT-Ses
IBIOR038-17-P_giornae--5P--PORT_Beja
IBIOR037-17-P_giornae--5P--PORT_Beja
IBIOR306-22-P_giornae--5P-PORT_Braga
GBMOR1934-19-P_giornae--5P-
GBMOR5924-19-p_giornae--5P-
UMAAI1115-22-Pezotettiginae--Fran
UMAAD394-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD461-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1353-21-Pezotettiginae--Fran
GBORT992-15-P_giornae--Croat
BCEMI1411-25-p_giornae--Gr
BCEMI1344-25-p_giornae--Gr
PORTH372-10-p_giornae--5P-N-Maced
BCEMI1343-25-p_giornae--Gr
UMAAI1585-22-Pezotettiginae--Fran
UMAAL1127-23-Pezotettiginae--Fran
GMBSB693-18-P_giornae--Bulg-sofia
PORTH417-10-P_giornae--Bulg
UMAAL951-23-Pezotettiginae--Fran
UMAAL1559-23-Pezotettiginae--Fran
UMAAL165-22-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1556-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD462-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAL1527-23-Pezotettiginae--Fran
UMAAL3262-22-Pezotettiginae--Fran
UMAAL1595-22-Pezotettiginae--Fran
UMAAL1109-22-Pezotettiginae--Fran
UMAAD332-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1220-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1103-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1356-21-Pezotettiginae--Fran
UMAAL1673-23-Pezotettiginae--Fran
UMAAD1224-21-Pezotettiginae--Fran

UMAII1118-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII163-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII2292-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII2261-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII1601-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII1593-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII141-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII1060-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII1563-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII1277-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII977-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII609-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII487-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII2263-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII208-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII206-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII1785-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII164-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII162-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII161-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII1607-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII140-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII139-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII916-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII138-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII1555-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII1354-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII1105-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII1676-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII1357-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII1233-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII1604-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII1106-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII1545-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII865-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII460-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII1362-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII1635-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII1007-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII1309-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII1229-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII1695-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII1636-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII1537-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII1309-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII1294-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII1275-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII1247-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII915-22-Pezotettiginae--Fran
UMAII284-21-Pezotettiginae--Fran
UMAII1534-23-Pezotettiginae--Fran
UMAII1226-21-Pezotettiginae--Fran

Annexes 06. Résultats de Bayesian Poisson Tree Processes Bptp.

Max likilhood partition

Species 1 (support = 0.180)

GMLWD10364-23_P_anatolica_LEB,GMLWD10419-23_P_anatolica_LEB,GMLWD10542-23_P_anatolica_LEB,GMLWD10481-23_P_anatolica_LEBs,GMLWD10363-23_P_anatolica_LEB,GMLWD10309-23_P_anatolica_LEB,GMLWD10480-23_P_anatolica_LEB,GMLWD10362-23_P_anatolica_LEB,GMLCL6127-23_P_anatolica_LEB,GMLBA1263-21_P_anatolica_LEB_Mnt,GBMOR814-13_P_anatolica_Turq

Species 2 (support = 0.693)

UMAAI1115-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAD394-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD461-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1353-21_Pezotettiginae_Fran

Species 3 (support = 0.665)

GBMOR1934-19_P_giornae_,GBMOR5924-19_p_giornae

Species 4 (support = 1.000)

IBIOR306-22_P_giornae_PORT_Braga

Species 5 (support = 0.357)

UMAAK1127-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAI1585-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAK951-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1673-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1635-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1604-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1559-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1534-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAI916-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI2292-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI2261-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI165-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI163-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI1601-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI1595-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI1593-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI141-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI1309-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI1118-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI1060-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAD462-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD460-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD332-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1556-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1555-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1362-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1354-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1229-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1220-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1105-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1103-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1695-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1676-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1636-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1563-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1545-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1537-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1527-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1309-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1294-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1277-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1275-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAK1247-23_Pezotettiginae_Fran,UMAAI977-

22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI915-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI609-
 22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI487-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI3262-
 22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI2263-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI208-
 22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI206-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI1785-
 22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI164-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI162-
 22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI161-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI1607-
 22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI140-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI139-
 22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI138-22_Pezotettiginae_Fran,UMAAI1109-
 22_Pezotettiginae_Fran,UMAAD865-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD284-
 21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1357-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1356-
 21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1233-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1226-
 21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1224-21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1106-
 21_Pezotettiginae_Fran,UMAAD1007-21_Pezotettiginae_Fran,PORTH417-
 10_P_giornae_Bulg_,GMBSB693-18_P_giornae_Bulg-Sofia

Species 6 (support = 0.626)

PORTH372-10_p_giornae_N-Maced, BCEMI1411-25_p_giornae_Gr, BCEMI1344-
 25_p_giornae_Gr,BCEMI1343-25_p_giornae_Gr

Species 7 (support = 0.836)

GBORT992-15_P_giornae_Croat

Species 8 (support = 0.947)

IBIOR103-17_P_giornae_PORT-Ses

Species 9 (support = 0.604)

IBIOR038-17_P_giornae_PORT_Beja, IBIOR037-17_P_giornae_PORT_Beja

Résumé

L'analyse du gène mitochondrial COI-5P chez la sous-famille Pezotettiginae apporté des informations précieuses sur sa position phylogénétique au sein des Acrididae et sa diversité génétique. L'étude actuelle a confirmé que la sous-famille Pezotettiginae, si elle inclut *Sphenophyma*, est paraphylétique, et mis en évidence une différenciation génétique au sein de *Pezotettix giornae*, suggérant l'existence possible de lignées cryptiques, tandis que *P. anatolica* s'est révélée être une espèce distincte. La position isolée de *Sphenophyma rugulosa* soulève des doutes quant à sa classification, nécessitant des analyses génétiques complémentaires. Ces résultats soulignent l'importance d'une approche intégrative combinant des données moléculaires, morphologiques et écologiques pour affiner la taxonomie et mieux comprendre l'évolution de ce groupe des criquets.

Mots-clés : COI-5P, diversité génétique, phylogénie, monophylie, *Pezotettix giornae*, *P. anatolica*, *Sphenophyma rugulosa*, taxonomie.

Abstract

Analysis of the mitochondrial COI-5P gene in the subfamily Pezotettiginae has provided valuable information on phylogenetic position within the Acrididae and its genetic diversity. The current study confirmed that the subfamily Pezotettiginae, if it includes *Sphenophyma*, is paraphyletic, and revealed genetic differentiation within *Pezotettix giornae*, suggesting the possible existence of cryptic lineages, while *P. anatolica* was revealed to be a distinct species. The isolated position of *Sphenophyma rugulosa* raises doubts about its classification, necessitating further genetic analysis. These results underline the importance of an integrative approach combining molecular, morphological and ecological data to refine the taxonomy and better understand the evolution of this group of locusts.

Keywords: COI-5P, genetic diversity, phylogeny, monophyly, *Pezotettix giornae*, *P. anatolica*, *Sphenophyma rugulosa*, taxonomy.

ملخص

أظهر تحليل الجين الميتوكوندري COI-5P في الفصيلة الفرعية Pezotettiginae معلومات قيمة حول تنوعها الجيني وموقعها التطوري ضمن عائلة Acrididae. أكدت الدراسة الحالية أن الفصيلة الفرعية Pezotettiginae، إذا شملت جنس *Sphenophyma*، تكون غير أحادية العرق (paraphyletic)، كما كشفت عن تمايز جيني داخل نوع *Pezotettix giornae*، مما يشير إلى احتمال وجود سلالات خفية (cryptic lineages)، بينما تبين أن *P. anatolica* هو نوع منفصل. كما أن الموقع المنعزل لـ *Sphenophyma rugulosa* يثير تساؤلات حول تصنيفها، مما يتطلب تحليلات جينية إضافية. تؤكد هذه النتائج على أهمية اتباع نهج متكامل يجمع بين البيانات الجزيئية والمورفولوجية والبيئية لتحسين التصنيف وفهم تطور هذه المجموعة من الجراد بشكل أفضل.

الكلمات المفتاحية: COI-5P، التنوع الجيني، علم التطور العرقي، أحادية العرق، *Pezotettix giornae*، *P. anatolica*، *Sphenophyma rugulosa*، علم التصنيف.