



Université Mohamed Khider de Biskra  
Faculté des sciences exactes et sciences de la nature et de  
la vie  
Département des sciences de la nature et de la vie

## MÉMOIRE DE MASTER

Domaine : Sciences de la nature et de la vie  
Filière : Sciences biologiques  
Spécialité : Microbiologie appliquée

Réf. : .....

---

Présenté et soutenu par :  
**NACER Dounia et GUELLOUH Achouak**

Le: jeudi 30 juin 2022

### **Thème**

## **Taxonomie moléculaire des truffes du désert**

---

#### **Jury :**

Mme HAMMIA Hadjra	MAA	Université de Biskra	Président
Mr MOUSSI Abdelhamid	Pr	Université de Biskra	Rapporteur
Mme BENGUERAICHI Fatiha	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2021/2022

## **Remerciements**

*Avant toute chose, nous remercions, tout d'abord, «Allah» tout puissant, qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.*

*Nous présentons nos remerciements les plus sincères à notre encadreur Monsieur le Pr **MOUSSI Abdelhamid** professeur à l'Université de Mohamed Khaider Biskra pour sa précieuse aide, ces orientations. Sa disponibilité et surtout ses judicieux conseils, qui ont contribué à alimenter ma réflexion.*

*Nous remercions par ailleurs les **membres du jury**, président et examinateur, de nous avoir fait l'honneur de présider et de juger notre travail.*

*Nous tenons aussi à remercier l'ensemble des enseignants de la spécialité Microbiologie pour avoir consacré leur temps et leur savoir-faire afin de nous faire bénéficier de la meilleure Formation.*

*Nous aimerions aussi gratifier les efforts de l'équipe de laboratoire de biotechnologie de l'université Mohamed Khaider Biskra. Sans oublier la doctorante **ZEKRI Wissem** et Mr. **BEN DAHMANE Abdelhafedh**, qui ont eu l'amabilité de répondre à nos questions.*

*Enfin, nous remercions toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce travail*

## *Dédicace*

*Mes dédicaces vont à l'endroit de tous ceux qui ont contribué à la réussite de mon travail et qui ont exhortés mon ambition d'aller vers l'avant.*

*A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.*

*A toutes mes chères sœurs pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral,  
A mon cher frère, pour leur appui et leur encouragement.*

*À ma chère binôme : Achouak,*

*A toute ma famille pour leur soutien tout au long de mon parcours universitaire,  
Que ce travail soit l'accomplissement de vos vœux tant allégués, et le fruit de votre soutien  
infaillible,  
Merci d'être toujours là pour moi.*

*Dounia*

## *Dédicace*

*Ma dédicace va à l'endroit de tous ceux qui ont contribué à la réussite de mon travail et qui ont exhorté mon ambition d'aller vers l'avant.*

*À mon très cher papa à qui je dois la plus étonnante et la plus affectionnée des dédicaces, mon professeur de toujours ;*

*Je lui dédie ce travail à la plus belle créature que Dieu a créée sur terre ,, À cette source de tendresse, de patience et de générosité qui était toujours à mes côtés, et pour son amour inconditionnel,, À ma mère*

*À mes frères : Mohammed el Ghazali, Nadjib pour leurs encouragements permanents, et leur soutien moral.*

*À ma chère soeur : \*Asma\**

*Aux grandes familles : GUELLOUH et BOUATABA*

*À mes cousins : Zohra, Fatima, Habiba, Hiba ....*

*À ma chère binome : Dounia*

*Et à mes amies : Houda, Fatima, Mouna, Meriem, Safia, Samia, Raoua , Dounia , Nessrine , Laila, Rania, Hayette.....*

*Qui étaient toujours là pour moi*

*À l'ensemble des professeurs qui m'ont suivi durant mes années d'études, de primaire jusqu'à l'université.*

*Achouak*

# Table des matières

Liste des tableaux .....	I
Liste des figures .....	II
Liste des abréviations .....	III
Introduction .....	1

## Première partie : Synthèse bibliographique

### Chapitre 01 : Généralités sur les truffes du désert (*Terfez*)

1. Qu'est-ce qu'une truffe du désert .....	3
2. Organisation morphologique des truffes du désert.....	3
3. Taxonomie des truffes du désert .....	4
3.1. Systématique classique.....	4
3.2. La classification des truffes du désert par phylogénie moléculaire .....	4
4. Répartition géographique des truffes du désert.....	5
4.1. Dans quelques pays du monde.....	5
4.2. En Algérie.....	5
5. Cycle de vie.....	6

### Chapitre 02 : DNA -Barcoding

1. Généralités sur DNA -Barcoding .....	8
2. Principe .....	9
3. Application du DNA -Barcoding .....	9
3.1. Détection des vecteurs des maladies .....	9
3.2. Identification.....	9
3.3. Préservation des ressources naturelles .....	10
3.4. Authenticité des médicaments .....	10
3.5. Protection des espèces menacées .....	10

## Deuxième partie: partie expérimentale

### Chapitre 03 : Méthodologie

1. L'origine des séquences.....	11
---------------------------------	----

1.1. BOLDSYSTEMS.....	11
2. Identification des séquences téléchargées.....	12
2.1. GenBank .....	12
3. Choix des marqueurs .....	17
4. Alignement multiple des séquences .....	18
5. Raffinement des séquences alignées.....	20
6. Construction de l'arbre phylogénétique.....	21
6.1. Méthodes de la construction de l'arbre phylogénétique .....	21
6.1.1. Méthodes basées sur la distance :.....	21
6.1.2. Méthodes basées sur les caractères : .....	21
7. Délimitation des espèces.....	23
7.1. mPTP (multi-rate Poisson Tree Processes) .....	24
7.2. ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning) .....	24

### **Chapitre 04 : Résultats et Discussion**

1. Résultats et Discussion .....	26
<b>Conclusion</b> .....	34
<b>Bibliographie</b> .....	35

### **Annexes**

## Liste des tableaux

<b>Tableau 01.</b> L'origine géographique des espèces de <i>Terfezia</i> et leur numéros d'accession GenBank et BOLDSYSTEMS.....	13
<b>Tableau 02 .</b> La distribution des séquences sur les espèces dans le BOLDSYSTEMS .....	26
<b>Tableau 03.</b> Les résultats de l'identification par l'outil BLAST.....	30
<b>Tableau 04.</b> La répartition des séquences sur les différents sous-groupes de l'arbre phylogénétique .....	32

## Liste des figures

<b>Figure 01.</b> Répartition géographique de trois genres de <i>Terfez</i> ( <i>Terfezia</i> , <i>Tirmania</i> et <i>Picoa</i> ) en Algérie.....	6
<b>Figure 02.</b> Cycle biologique des truffes du désert.....	7
<b>Figure 03.</b> L'interface du BOLDSYSTEMS.....	11
<b>Figure 04.</b> Fichier format Fasta. ....	12
<b>Figure 05.</b> L'interface de GenBank.....	13
<b>Figure 06.</b> Organisation d'un opéron de l'ADN ribosomique chez les eucaryotes.....	18
<b>Figure 07.</b> L'interface de logiciel MEGA 11 des séquences alignées. ....	20
<b>Figure 08.</b> L'interface de la plateforme NG-phylogeny.....	22
<b>Figure 09.</b> L'interface de la plateforme mPTP .....	24
<b>Figure 10.</b> L'interface de la plateforme ASAP. ....	25
<b>Figure 11.</b> Résultat de l'identification de la séquence <i>Terfezia.sp</i> (HM056211) dans l'outil BLAST.....	28
<b>Figure 12.</b> Résultat de l'alignement multiple de la séquence <i>Terfezia.sp</i> (HM056211) par le logiciel MEGA .....	29
<b>Figure 13.</b> Arbre phylogénétique du maximum de vraisemblance déduit pour le genre <i>Terfezia</i> .. .....	31



## Liste des abréviations

**ADN** : Acide Désoxyribonucléique

**ADNe** : Acide Désoxyribonucléique environnemental

**ADNr** : Acide désoxyribonucléique Ribosomique

**ARNr** : Acide ribonucléique Ribosomique

**ASAP**: Assemble Species by Automatic Partitioning

**BLAST**: Basic Local Aligement Search Tool

**BOLD**: Barcode of Life Database

**ITS**: Internal Transcribed Spacer

**MEGA**: Molecular Evolutionary Genetics Analysis

**ML**: Maximume-Likelihood-Methode

**mPTP**: Multi-rate Poisson Tree Processes

**NCBI**: National Center for Biotechnology Information

**PCR**: Polymerase Chain Reaction

**UPGMA**: Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean

**RAPD**: Random Amplification of Polymorphic DNA

**RFLP** : Restriction Fragment Length Polymorphism

# **Introduction**

# Introduction

Les *Terfez* sont des champignons hypogés comestibles appartenant à l'embranchement des Ascomycètes, le plus souvent connus sous le nom de truffes du désert (Fortas, 2009). Ils se développent principalement dans les zones arides et semi-arides (Fortas et Dib-Belahouel, 2007). Les truffes du désert établissent des symbioses mycorhiziennes avec des plantes hôtes spécifiques avec une préférence remarquable pour la famille des *Cistaceae*, et en particulier le genre *Helianthemum.spp* (Zitouni-Haouar et al., 2018).

Traditionnellement, la classification des *Terfez* est basée sur les caractéristiques morphologiques du champignon, mais cette identification nécessite des taxonomistes expérimentés, prend du temps, et parfois peu fiables (Fišer et Buzan, 2014). Pour ces raisons des méthodes moléculaires ont évolué pour combler les lacunes de la classification classique, notamment les techniques basées sur la manipulation des acides nucléiques telle que l'analyse des séquences ITS de l'ADNr et l'analyse des séquences 5,8S, 18S, 28S de l'ADN...etc. Ces techniques permettent de déterminer la diversité génétique au sein des genres et espèces des *Terfez*.(Kovacs et al., 2008).

L'une de ces nouvelles techniques est le codage à barres de l'ADN, qui est la technique la plus utilisée pour identifier les espèces. Il s'agit d'un fragment d'un gène standard pour l'identification des espèces. Il connaît une croissance rapide ces dernières années et est devenu un outil utile pour l'étude du suivi de la biodiversité, ainsi que pour la phylogénie et l'évolution moléculaire (Kang et al., 2017).

La phylogénie est une branche de la biologie qui étudie les relations évolutives entre les êtres vivants. Ces relations sont représentées à l'aide d'un arbre phylogénétique, construit à partir des données moléculaires ou morphologiques.

L'objectif de cette étude est la construction d'un arbre phylogénétique du genre *Terfezia*. Elle consiste à étudier les relations phylogénétiques des séquences de ce genre, en les téléchargeant de ces dernières à l'aide d'une base de données appelée BOLDSYSTEMS, afin de les traiter par un ensemble des processus, Cette traitement nous permettra obtenir un arbre phylogénétique.

Ce mémoire se présente en deux parties dont l'organisation est comme suit :

**-La première partie** c'est la partie théorique qui a été divisé en deux chapitres, le premier comporte des généralités sur les truffes du désert telle que, la morphologie, la classification, ...etc. Le deuxième chapitre a été consacré pour le DNA-Barcoding (code à barres moléculaire) comporte des différentes informations sur celui-ci y compris sa définition, ses application, son principe... etc.

**-La deuxième partie** est une partie expérimentale qui comporte deux chapitres :

L'un est décrite les différentes étapes et les différents logiciels utilisés dans la construction de l'arbre phylogénétique. Le second expose tous les résultats obtenus avec leurs interprétations. Et nous terminons par une conclusion.

**Première partie :**  
**Synthèse bibliographique**

**Chapitre 01 :**  
**Généralités sur les truffes**  
**du désert (*Terfez*)**

## 1. Qu'est-ce qu'une truffe du désert

Les truffes du désert connus sous le nom *Terfez*, sont des champignons mycorhiziens, hypogés, comestibles appartenant aux ascomycètes (Fortas, 2009). Ces champignons vivent entièrement sous terre en associations symbiotiques avec les racines de certaines leurs plantes hôtes naturelles, la plus souvent sont les cistacées (annuelles ou pérennes) (Trappe, 1971).

Ils poussent dans les zones arides et semi-arides de la région méditerranéenne, comporte plusieurs genres *Delastria*, *Picoa*, *Terfezia*, *Tirmania*, *Mattiolomyces*, *Loculotuber* et *Tubercule* (Trappe et al., 2008).

Les *Terfez* ont une valeur nutritive non négligeable par leur richesse en protéines, lipides, leur teneur élevée en acides aminés, en minéraux et en vitamines (Fortas, 2009). De plus ils possèdent diffères activités biologique activités antibactérienne, antioxydant (Fortas et Dib-Belahouel, 2007).

Son appellation varie selon les régions et les langages des habitats dans le monde, en Algérie il existe plus qu'une nomination :

***Terfezia***: *Terfas*, *Terfess lahmar*, *Terfess lakhal*.

***Timmania***: *terfess labiyadh*, *Belhourech*, *Benhourache*.

***Picoa*** : *Jaouber* (Haloubi, 1988 ; Bouchareb, 1994 ).

## 2. Organisation morphologique des truffes du désert

L'organisation complète d'une truffe comporte un *mycélium* et un *ascome* (ou *ascocarpe*) constitué d'une partie centrale ou *gléba*, dans laquelle se trouvent l'hyménium avec les paraphyses, les asques et les spores. La *gléba* est protégée par une enveloppe résistante ou cortex appelé aussi *péridium*. Le champignon comprend donc :

- Une partie végétative, très discrète et non comestible qui forme les mycorhizes.
- une partie reproductrice, la « truffe » qui est en réalité le fruit du champignon (Riousset et al., 2001).

### 3. Taxonomie des truffes du désert

#### 3.1. Systématique classique

Traditionnellement la classification des *Terfez* est basée sur les caractéristiques du *Péridium* (aspect : couleur), et celles des spores (forme, ornementation) aussi sur d'autres caractères complémentaires comme la forme ouïlle des corps fructifères, la coloration de la *glèba*, la disposition des veines, et l'odeur (Trappe ,1971 ; Trappe , 1979 ; Chevalier et *al.*, 1984).

Cette identification représente souvent une tâche difficile nécessitant des taxonomistes expérimentés, du plus elle prend généralement beaucoup de temps pour la réaliser et ne permet pas toujours d'atteindre le niveau de l'espèce (Fišer et Buzan, 2014).

Les *Terfez* des genres *Terfezia* appartiennent à la famille des *Terfeziaceae* et *Tirmania* appartiennent à la famille *Pezizaceae*, tandis que le genre *Picoa* siège actuellement dans la famille des *Pyronemataceae*. Le genre *Terfezia* contient douze espèces, le genre *Tirmania* est représenté par deux espèces, et *Picoa* regroupé trois espèces (Trappe , 1979).

- **Règne** : Fungi.
- **Embranchement** : Septomycota.
- **Sous-embranchement** : Ascomycotina.
- **Classe** : Euascomycetes.
- **Sous-classe** : Discomycetidae.
- **Ordre** : *Pezizales*
- **Famille** : *Terfeziacea* ou *Pezizaceae*,
- **Genre** : *Terfezia*

En Algérie il existe trois types de *Terfez* : *Terfezia* «*Terfez rouge*», *Tirmania* «*Terfez blanc* » et *Picoa*. Le genre *Terfezia* est représenté par 4 espèces (*Terfezia arenaria*, *T.boudiri*, *T.claveryi*, *T.leptoderma*), le genre *Tirmania* représenté par deux espèces (*Tirmania pinoyi* et *T.nivea*) et le genre *Picoa* par 3 espèces (*Picoa lefebvrei*, *P.juniberi* et *P.carthusiana*) (Dib-Bellahouel, 2012).

#### 3.2. La classification des truffes du désert par phylogénie moléculaire

Aujourd'hui la classification des truffes du désert est basée sur les techniques d'analyse moléculaire (PCR-RFLP, PCR-RADP), et les manipulations des acides nucléiques (l'analyse des séquences ITS de l'ADNr et celles d'analyse des séquences 5,8S, 18S, 28S de l'ADN...etc.). Ces techniques nous aident à faire déterminer la diversité génétique au sein des



genres et espèces des *Terfez* (Norman et Egger, 1999 ; Hansen et *al.*, 2005 ; Læssøe et Hansen, 2007. ; Ammarellou, 2007; Kagan-Zur et *al.*, 2008 ; Kovacs et *al.*, 2008.)

Selon Aisch et *al.* (2020). Identification moléculaire est plus précise que l'identification morphologique qui dépend des caractéristiques morphologiques.

#### **4. Répartition géographique des truffes du désert**

##### **4.1. Dans quelques pays du monde**

La distribution géographique des *Terfez* est limitée aux terres arides et semi-arides, principalement dans les pays du bassin méditerranéen, comme le sud de l'Espagne, le Portugal, l'Italie, la France, la Hongrie, la Turquie, l'Algérie, la Libye le Maroc, l'Égypte, la Palestine, la Péninsule Arabique, l'Iran, l'Irak, la Syrie et le Koweït. En outre, certaines espèces de truffes du désert ont été trouvées en Afrique du Sud, Botswana la Namibie Ce champignon peut se développer aussi dans des autres régions comme les Etats Unis, la Chine, le Japon (Varma, 2008).

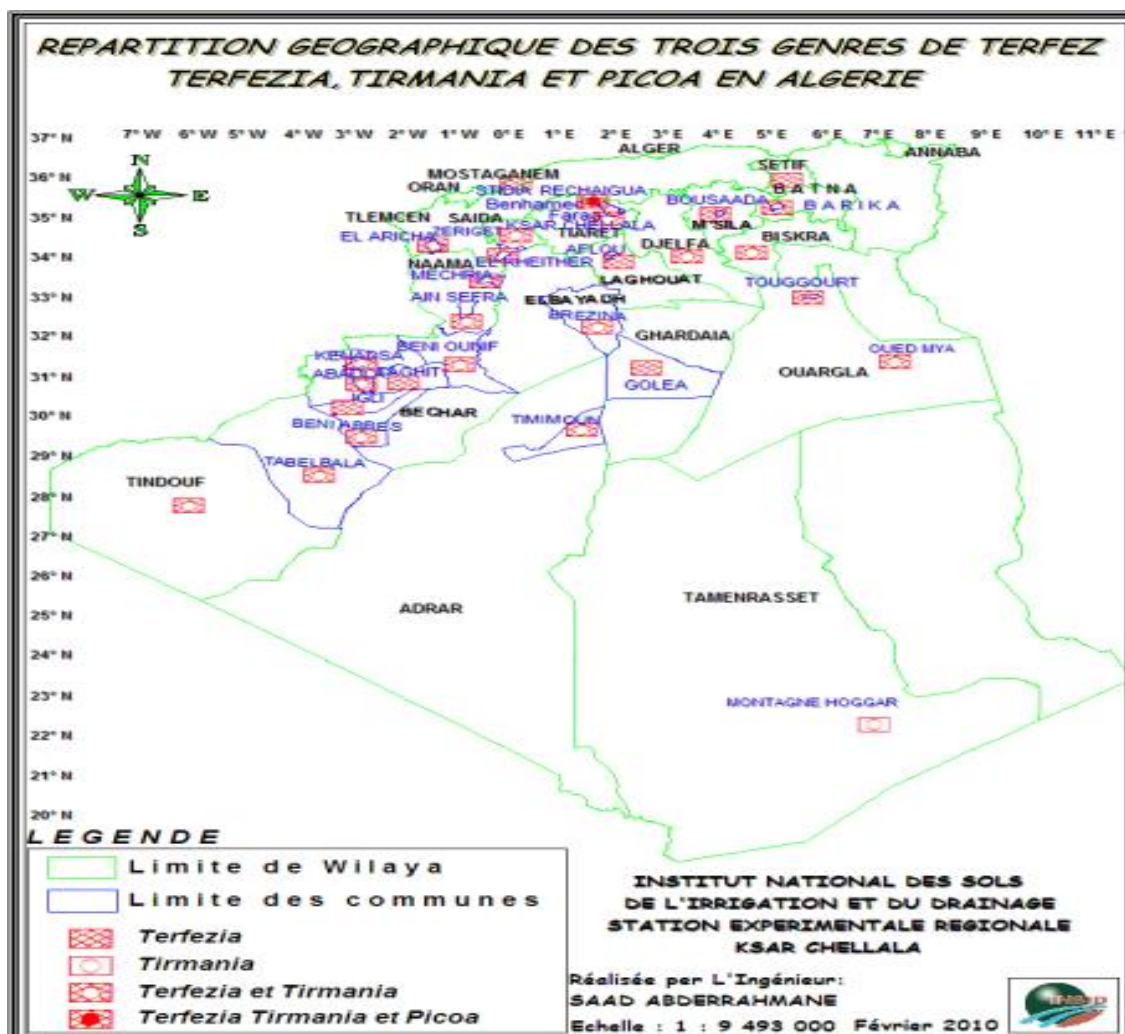
##### **4.2. En Algérie**

En Algérie les *Terfez* se développent dans :

Des régions arides y compris : Ouargla (Oued M'ya) Touggourt, Tindouf, Biskra, Boussaada, Ghardaia, Laghouat, Béchar (Knedssa, Taghit, Tabelbala, Abadla, Beni Abbas), Timimoun, Tamenrasset (Montagnes du Hoggar).

Aussi dans les régions semi-arides : Tlemcen (El Aricha), Tiaret (Ksar Chellala, sites Faraa et Benhamed), Mostaganem, Saïda (Zeriguët, Djbel Ben-Kadour), Djelfa (Ain-Oussara, Fortassa), El-Bayad (El Kgeiter), Naama (Ain Sefra, Mecheria), Batna, M'sila, Sétif et en Kabylie (Fortas, 1990 ; Zitouni, 2010).

La figure ci-dessous représente la répartition géographique de trois genres de *Terfez* en Algérie (*Terfezia*, *Tirmania* et *Picoa*).



**Figure 01.** Répartition géographique de trois genres de *Terfez* (*Terfezia*, *Tirmania* et *Picoa*) en Algérie (Zitouni, 2010).

## 5. Cycle de vie

Le cycle de vie des *Terfez* est complexe et reste encore mal connu. Ce cycle se déroule entièrement dans le sol et dépend d'une plante hôte avec laquelle ce champignon forme une association mycorhizienne (Fortas, 2009).

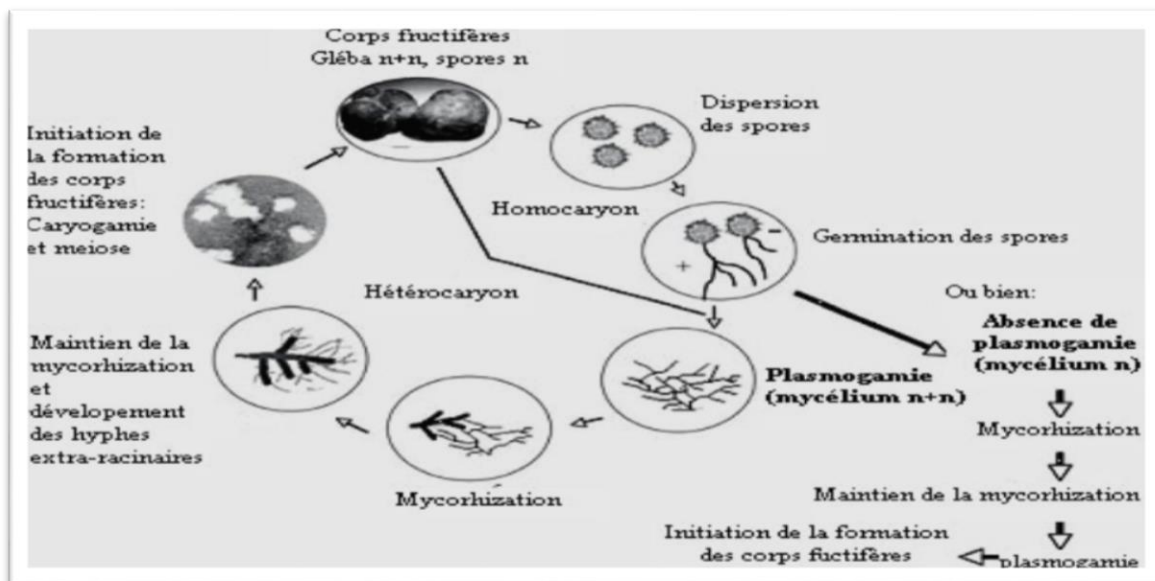
Selon Roth-Bejerano<sup>1</sup> et *al* (2004) la formation des *mycéliums* des Ascomycètes se fait par deux méthodes soit à partir des hyphes stériles de corps de fruits frais ou par la germination des ascospores.

- La première étape reste la germination des spores afin de former un mycélium *homocaryotique* primaire qui croît dans le sol au voisinage des racines de la plante-hôte avec laquelle il s'associe c'est à dire la formation des mycorhizes, ou bien le

mycélium primaire pourrait après *plasmogamie* produire un mycélium secondaire avant de s'associer avec la plante hôte (Fortas, 1990 ; Dib-Bellahouel, 2012).

- Les mycorhizes formés vont émettre à leur tour des mycéliums dicaryotiques qui s'enchevêtrent pour produire des primordiums.
- L'évaluation des primordiums afin de donner à maturité des ascomes de *Terfez*. La décomposition des ascomes à la fin du cycle et la libération des ascospores qui peuvent germer à l'automne (Kagan-Zur *et al.*, 2008).

Le cycle de vie des truffes du désert est représenté dans la figure 02 :



**Figure 02.** Cycle biologique des truffes du désert (Kagan-Zur *et al.*, 2008).

# **Chapitre 02 :**

# **DNA-Barcoding**

### 1. Généralités sur DNA- Barcoding

Le code-barres ADN est un fragment d'un gène standard pour l'identification des espèces. Il s'agit de développer rapidement ces dernières années et est devenu un outil utile pour l'étude et la surveillance de la biodiversité, ainsi que pour la phylogénie et l'évolution moléculaire (Kang *et al.*, 2017).

L'objectif principal du code-barres ADN est d'établir une ressource communautaire partagée de séquences d'ADN pouvant être utilisée pour l'identification des organismes et la clarification taxonomique. Cette approche a été lancée avec succès chez des animaux en utilisant une partie du gène mitochondrial du cytochrome oxydase 1 (CO1) (Hollingsworth *et al.* 2011).

La courte séquence d'ADN est générée à partir d'une région conservée du génome connue sous le nom de marqueur. Ce marqueur est différent pour diverses espèces, comme le cytochrome c oxydase 1 CO1 pour les animaux, la matK pour les plantes, et Internal Transcribed Spacer (ITS) pour les champignons (Kaur, 2015).

Cette méthode est basée sur la divergence moléculaire représentant la différence entre la variabilité intra-spécifique et la divergence interspécifique, les individus d'une même espèce auront une divergence moléculaire inférieure à celle d'individus d'espèces différentes. Ainsi, il est possible de relier un spécimen inconnu à l'espèce à laquelle il appartient, mais aussi de découvrir de nouvelles espèces. (Hebert *et al.*, 2003).

Un certain nombre de critères doivent être vérifiés Ils sont listés ci-dessous d'après Taberlet, *et al.* (2018)

1. Séquence courte afin de permettre l'amplification de séquences dégradées d'ADNe (Environnemental).
2. Séquence très variable mais flanquée de deux séquences très conservées afin de voir la paire d'amorce s'y attacher.
3. Séquence suffisamment conservée et robuste afin de s'assurer de l'universalité du barcode pour l'identification de plusieurs espèces et assurer l'ancrage des amorces à la séquence.
4. Séquence identique entre les individus d'une même espèce mais variable entre espèces différentes. La section variable déterminera la résolution taxonomique, la discrimination, de toutes les espèces cibles et une bonne spécificité. Ainsi on évitera le

choix de régions codant pour des protéines, les séquences étant similaires due à la redondance du code génétique.

## 5. Séquences standardisées selon les groupes taxonomiques.

### 2. Principe

Le Barcoding moléculaire, principe relativement récent proposé par Hebert (2003) est une extension de cette technique de séquençage ADN.

Il s'agit d'un outil taxonomique permettant la caractérisation génétique d'un individu ou d'un échantillon d'individu à partir d'un fragment standard de l'ADN. En effet, certains fragments d'ADN sont très conservés au sein d'une même espèce mais variables entre les espèces. Les séquences de ces fragments d'ADN appelés barcodes ou code-barre à ADN sont compilées dans des bases de données. Une fois un échantillon inconnu séquencé, il suffit de comparer la séquence ADN trouvée à celles déjà présentes dans les bases de données pour identifier le nom de l'espèce associée à cette séquence (BOLD ou GenBank). Il est ainsi facile et rapide de savoir à quelle espèce appartient l'individu analysé à l'instar des codes-barres sur les produits commerciaux (Hebert et *al.*, 2003). La seule limite à cette approche est d'avoir accès à des bases de données contenant des séquences fiables et validées par la communauté scientifique, ce qui n'est pas toujours le cas.

La région ITS est maintenant largement utilisée comme « code-barre » génétique pour caractériser la diversité des champignons (Nguyen et Seifert, 2008).

### 3. Application du DNA-Barcoding

#### 3.1. Détection des vecteurs des maladies

Le codage à barres ADN permet aux non-écologistes d'identifier les espèces vectrices qui peuvent causer des graves maladies infectieuses aux animaux et aux humains, de comprendre ces maladies et de les guérir. Une initiative mondiale de codage à barres des moustiques a pour but de créer une bibliothèque de codes à barres de référence qui peut aider les responsables de la santé publique à lutter plus efficacement contre ces espèces vectrices de maladies, en utilisant très peu d'insecticides (Kaur, 2015).

#### 3.2. Identification

Le code-barres de l'ADN est largement appliqué par la communauté scientifique et l'industrie pour l'identification moléculaire afin de résoudre un large éventail de questions de

taxonomie, de phylogénétique moléculaire, de génétique des populations et de biogéographie (Raclariu et *al.* 2018).

### **3.3. Préservation des ressources naturelles**

Grace aux codes-barres ADN, les gestionnaires des ressources naturelles peuvent surveiller le commerce illégal de produits fabriqués à partir de ressources naturelles comme les arbres feuillus. Fish-bol est une bibliothèque de codes-barres de référence pour les arbres feuillus afin d'améliorer la gestion et la conservation des ressources naturelles (Kaur, 2015).

### **3.4. Authenticité des médicaments**

L'une des principales utilisations des codes-barres est de fournir des informations détaillées sur un produit. Dans le domaine de la santé, les codes-barres DataMatrix sur les médicaments prescrits contribuent à accroître la sécurité des patients en aidant à prouver l'authenticité et en soutenant la conformité réglementaire. Les employés de la santé peuvent scanner rapidement les codes-barres sur les médicaments à l'aide d'un lecteur de codes-barres en ligne sur leur smartphone et s'assurer de leur authenticité (Davis, 2021).

### **3.5. Protection des espèces menacées**

La population de primates est réduite de 90% en Afrique à cause de la chasse à la viande de brousse. Le codage à barres ADN peut être utilisé par les forces de l'ordre pour identifier la viande de brousse sur les marchés locaux (Kaur, 2015).

**Deuxième partie :**  
**Partie expérimentale**



# **Chapitre 03 :**

# **Méthodologie**

Ce chapitre contient toutes les étapes qu'on a les suivies, et tous le matériel que nous avons les utilisé pour construire un arbre phylogénétique du genre *Terfezia* à partir des séquences existantes sur la plateforme BOLDSYSTEMS.

## 1. L'origine des séquences

Pour réaliser notre analyse phylogénétique sur les truffes du désert précisément le genre *Terfezia*, nous avons accédé au BOLDSYSTEMS afin de télécharger les séquences nucléotidiques puis nous les avons identifiés par une basse de donnée qui s'appelle GenBank.

### 1.1. BOLDSYSTEMS

BOLD est une plateforme de stockage et d'analyse de données basée sur le cloud computing, développée au Centre for Biodiversity Genomics au Canada. Elle se compose de quatre modules principaux : un portail de données, un portail éducatif, un registre de NIB (espèces putatives) et un atelier de collecte et d'analyse de données (Sujeevan et al., 2007).

On a utilisé cette plate-forme comme une source pour obtenir les séquences d'ADN du genre *Terfazia* (des régions ITS séquencées et bien identifiées).

Après avoir entré au BOLDSYSTEMS qui se trouve dans ce lien [www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org) nous avons suivi les étapes suivantes :

The screenshot shows the BOLDSYSTEMS website interface. At the top, there is a navigation bar with links for DATABASES, IDENTIFICATION, TAXONOMY, WORKBENCH, RESOURCES, LOGIN, and a search icon. Below the navigation bar, there is a search input field containing the text 'TERFEZIA'. To the right of the input field, there is a dropdown menu set to 'PUBLIC DATA' and a 'SEARCH' button. Below the search bar, there are several buttons for downloading data: 'FASTA', 'TRACE', 'XML', and 'TSV'. A 'Results Summary' section on the right indicates that 97 published records were found, with 97 records having sequences and 0 BINs (clusters). Below the summary, there is a 'Specimen Distribution' map and a link to 'Activer Windows'.

Figure 03. L'interface du BOLDSYSTEMS

On tape le nom de notre genre *Terfezia* sur la barre de recherche, puis on a téléchargé toutes les séquences qui ont été trouvé en-dessous (97 séquences) sous format Fasta. La lecture de ce fichier téléchargé se fait par une application appelée **Bloc-notes**.

```

fasta (1) - Bloc-notes
Fichier Edition Format Affichage ?
>GBPEZ1209-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ69816 Libya:Lower region of Hammad Al Hamra
CATTAACGAAAACATTTTAAGTTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTTGTTTACGGACAGATTTCACCTTGTGTGGGCTTTGGCTTGTGGAATACACTTCCCAAGAGTTGCCAGTGGTAAGACATTTATCAAACTTGAGTTCAATAAA
>GBPEZ1697-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698149 Spain:Caceres, Millanes
TTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGAATAACTC
>GBPEZ1699-13|Terfezia aff. obliensis TLO-2|ITS|HQ698147 Spain:Valladolid, Castromonte, La Espina
TTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGAATAACTC
>GBPEZ1701-13|Terfezia aff. obliensis TLO-2|ITS|HQ698145 Spain:Salamanca, Valdeosa
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1702-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698144 Spain:Caceres, Garrovillas
TTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGTAATAAC
>GBPEZ1704-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698142 Spain:Valladolid, Valdeestillas
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1708-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698138 Spain:Palencia, Duenas
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1709-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698137 Spain:Palencia, Duenas
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1710-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698136 Spain:Palencia, Duenas
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1712-13|Terfezia aff. obliensis TLO-4|ITS|HQ698134 Spain:Jaen, Santiestebo Del Puerto
GAAAAAACATTTTCAAGTTTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGAATAACACTGCCAAGAGTTGCCAGTGGCAAGATTTTTTACCAAAACCTGACGAAAAACAAT
>GBPEZ1713-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698133 Spain:Avila, San Bartolome De Pinares
TTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGTAATAAC
>GBPEZ1715-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698131 Spain:Segovia, Cantalejo
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1716-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698130 Spain:Segovia, Cantalejo
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1719-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698127 Spain:Segovia, Cantalejo
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1720-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698126 Spain:Valladolid, Sieteiglesias De Trabanco
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1722-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698124 Spain:Valladolid, Sieteiglesias De Trabanco
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1723-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698123 Spain:Valladolid, Sieteiglesias De Trabanco
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1725-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698121 Spain:Valladolid, Sieteiglesias De Trabanco
CTTGGCTATTAGAGGAGTAAAGTCGTAACAGGTTCCGTAGGTGAACCTGGGAAGGATCATTACGAAAAACTTTTCAAGTTTATATCCATTGTTTACTTACCCTGTGCTCCACTGGACAGATTTTCATCTGTGTGGGATCTTTGGCTGTGGA
>GBPEZ1726-13|Terfezia aff. obliensis TLO-3|ITS|HQ698120 Spain/Valladolid, Sieteiglesias De Trabanco

```

Figure 04. Fichier format Fasta.

## 2. Identification des séquences téléchargées

Pour une identification confirmée, et pour plus d’informations qui peuvent ne pas être disponibles sur le BOLDSYSTEMS, ceci nous amène à choisir GenBank comme source pour plus d’informations sur nos séquences, car elle représente l’origine de la plupart des séquences

### 2.1. GenBank

Est une base de données publique complète de séquences nucléotides et d’annotations bibliographiques et biologiques. Il est construit et distribuée par le National Center for Biotechnology Information (NCBI) (Karsch-Mizrachi et al . ,2018).

Cette base de données a été utilisée pour d’obtenir les informations nécessaires à notre étude pour chaque séquence d’ADN, l’accès au GenBank c’était par ce lien [www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) , nous avons pris le code d’accession de chaque séquence puis on le taper dans la barre de recherche de cette plateforme, nous aurons une fenêtre incluse toutes les informations de notre séquence y compris : la région de chaque séquence (pays), l’auteur, la taille,...etc (Annexe 01).

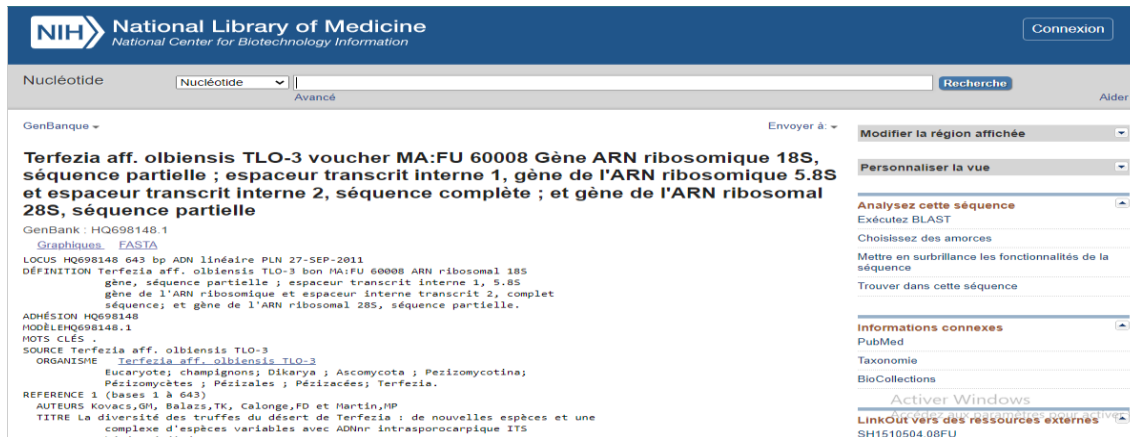


Figure 05. L'interface de GenBank

Toutes les séquences nucléotidiques utilisées dans notre enquête et leur localité sont présentées dans le tableau suivant :

Tableau 01. L'origine géographique des espèces de *Terfezia* et leur numéros d'accession GenBank et Bold-system.

Taxon (genre <i>Terfezia</i> )	Numéro d'accésion (BOLD)	Numéro d'accés (GenBank)	Région
* <i>T. boudieri</i>	GBPEZ1209-13	FN395016	Libya: Hammad Al Hamra
* <i>T.aff. olbiensis</i>	GBPEZ1697-13	HQ698149	Spain: Caceres, Millanes
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1699-13	HQ698147	Spain: Valladolid, Castromonte.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1701-13	HQ698145	Spain: Salamanca, Valdeosa.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1702-13	HQ698144	Spain: Caceres, Garrovillas.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1704 -13	HQ698142	Spain: Valladolid, Valdestillas.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1708-13	HQ698138	Spain: Palencia, Duenas.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1709-13	HQ698137	Spain: Palencia, Duenas.
* <i>T.aff. olbiensis</i>	GBPEZ1710-13	HQ698136	Spain: Palencia, Duenas.
* <i>T.aff. olbiensis</i>	GBPEZ1712-13	HQ698134	Spain: Jaen, Santiesteban Del Puerto.

* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1713-13	HQ698133	Spain: Avila, San Bartolome.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1715-13	HQ698131	Spain: Segovia, Cantalejo.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1716-13	HQ698130	Spain: Segovia, Cantalejo.
* <i>T.aff. olbiensis</i>	GBPEZ1719-13	HQ698127	Spain: Segovia, Cantalejo.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1720-13	HQ698126	Spain: Valladolid.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1722-13	HQ698124	Spain:Valladolid.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1723-13	HQ698123	Spain: Valladolid.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1725-13	HQ698121	Spain:Valladolid.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1726-13	HQ698120	Spain : Valladolid.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1727-13	HQ698119	Spain : Ciudad Real.
* <i>T.aff. olbiensis</i>	GBPEZ1728-13	HQ698118	Portugal : Minho Povia De Lanhoso.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1729-13	HQ698117	Portugal : Minho Povia De Lanhoso.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1730-13	HQ698116	Spain:Segovia, Sepulveda.
* <i>T.aff. olbiensis</i>	GBPEZ1731-13	HQ698115	Spain:Segovia, Sepulveda.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1734-13	HQ698112	Spain:Madrid, Cuatro Vientos.
* <i>T.aff. olbiensis</i>	GBPEZ1735-13	HQ698111	Spain: Madrid, Cuatro Vientos.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1736-13	HQ698110	Spain:Segovia, San Rafael.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1737-13	HQ698109	Spain: Segovia, San Rafael.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1740-13	HQ698106	Spain:Segovia, San Rafael.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1743-13	HQ698103	Spain: Badajos (campanario).
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1744-13	HQ698102	Spain: Madrid, Toledo.
* <i>T. aff. Olbiensis</i>	GBPEZ1745-13	HQ698101	Spain: Burgos, Hinojar De Cervera.
* <i>T.alsheikhii</i>	GBPEZ1746-13	HQ698100	Spain: Salamanca, Arroyomuerto.
* <i>T.alsheikhii</i>	GBPEZ1747-13	HQ698099	Spain:Soria, Vinuesa.

* <i>T. alsheikhii</i>	GBPEZ1748-13	HQ698098	Spain Leon, Castrillino.
* <i>T.leptoderma</i>	GBPEZ1749-13	HQ698097	Spain Toledo, Talavera De La Reina.
* <i>T.leptoderma</i>	GBPEZ1750-13	HQ698096	Spain Badajos, San Vicente.
* <i>T.leptoderma</i>	GBPEZ1751-13	HQ698095	Spain Valladolid, Mucientes.
* <i>T. leptoderma</i>	GBPEZ1752-13	HQ698094	Spain : Zamora, Sogo.
* <i>T. leptoderma</i>	GBPEZ1754-13	HQ698092	Spain : Madrid, Montejo De La Sierra.
* <i>T.leptoderma</i>	GBPEZ1756-13	HQ698090	Spain: Segovia, Riaza.
* <i>T.leptoderma</i>	GBPEZ1757-13	HQ698089	Spain: Avila, L'Adrada.
* <i>T.leptoderma</i>	GBPEZ1758-13	HQ698088	Spain : Caceres, Truficultur, S.a.
* <i>T.leptoderma</i>	GBPEZ1759-13	HQ698087	Spain : Caceres.
* <i>T.claveryi</i>	GBPEZ1760-13	HQ698086	Spain: Murcia.
* <i>T.claveryi</i>	GBPEZ1761-13	HQ698085	Spain: Zaragoza.
* <i>T. claveryi</i>	GBPEZ1762-13	HQ698084	Spain: Jaen.
* <i>T.claveryi</i>	GBPEZ1765-13	HQ698081	Spain : Burgos.
* <i>T. claveryi</i>	GBPEZ1766-13	HQ698080	Spain : Granada, Llanos D'Armillá.
* <i>T. claveryi</i>	GBPEZ1767-13	HQ698079	Spain : Granada, Cercanias De Guadix.
* <i>T. claveryi</i>	GBPEZ1768-13	HQ698078	Spain: Zaragoza.
* <i>T.claveryi</i>	GBPEZ1769-13	HQ698077	Spain: Jaen.
* <i>T. claveryi</i>	GBPEZ1770-13	HQ698076	Spain: Valladolid.
* <i>T. claveryi</i>	GBPEZ1771-13	HQ698075	Spain: Andalucia.
* <i>T.arenaria</i>	GBPEZ1777-13	HQ698069	Spain: Caceres.
* <i>T.arenaria</i>	GBPEZ1778-13	HQ698068	Spain: Toledo, Talavera De La Reina.
* <i>T. arenaria</i>	GBPEZ1780-13	HQ698066	Spain: Badajos.
* <i>T. arenaria</i>	GBPEZ1781-13	HQ698065	Spain: Madrid, Aldea Del Fresno.

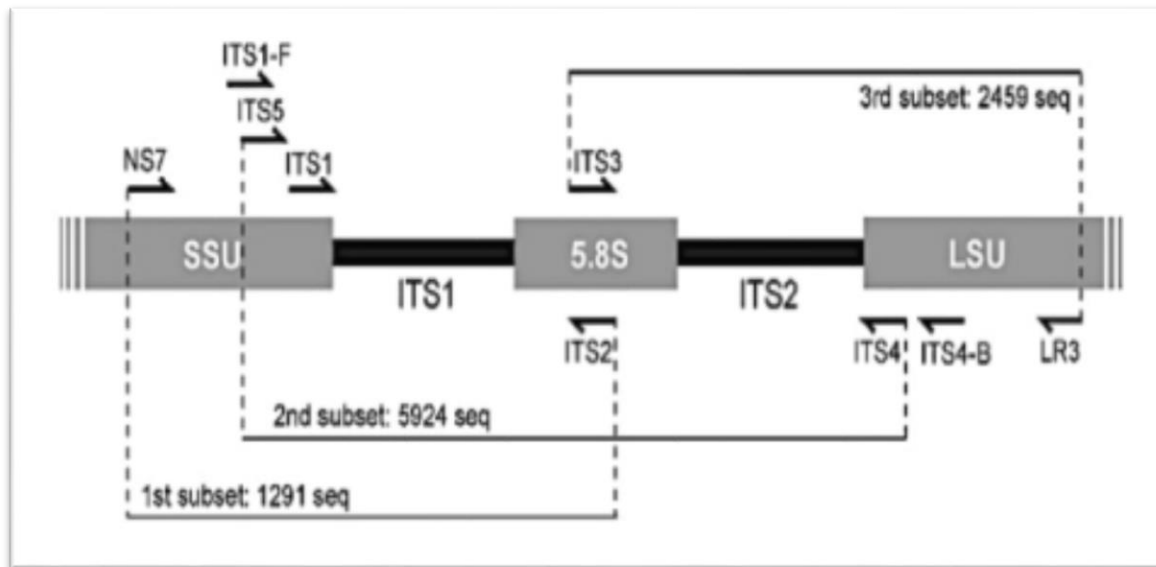
* <i>T. boudieri</i>	GBPEZ2709-15	AF092097	Palestine: western Negev.
* <i>T. sp</i>	GBPEZ2714-15	DQ386140	Spain.
* <i>T. sp</i>	GBPEZ2715-15	HM056210	Spain: Burgos.
* <i>T. sp</i>	GBPEZ2716-15	HM056211	Spain : Burgos.
* <i>T. trappei</i>	GBPEZ340-13	AF276677	France.
* <i>T. trappei</i>	GBPEZ341-13	AF276676	France.
* <i>T. aff. Olbiensis</i>	GBPEZ1698-13	HQ698148	Spain : Valladolid, Laguna De Duero.
* <i>T. aff.Olbiensis</i>	GBPEZ1700-13	HQ698146	Spain: Salamanca, Valdeosa.
* <i>T. aff.Olbiensis</i>	GBPEZ1703-13	HQ698143	Spain: Valladolid, Valdestillas.
* <i>T. aff.Olbiensis</i>	GBPEZ1705-13	HQ698141	Spain: Valladolid, Valdestillas.
* <i>T. aff.Olbiensis</i>	GBPEZ1706-13	HQ698140	Spain: Palencia, Duenas.
* <i>T. aff.Olbiensis</i>	GBPEZ1707-13	HQ698139	Spain: Palencia, Duenas.
* <i>T. aff.Olbiensis</i>	GBPEZ1711-13	HQ698135	Spain: Palencia, Duenas.
* <i>T.aff. Olbiensis</i>	GBPEZ1714-13	HQ698132	Spain: Zamora, Pererueta.
* <i>T. aff.Olbiensis</i>	GBPEZ1717-13	HQ698129	Spain: Segovia, Cantalejo.
* <i>T.aff. Olbiensis</i>	GBPEZ1718-13	HQ698128	Spain: Segovia, Cantalejo.
* <i>T. aff.Olbiensis</i>	GBPEZ1721-13	HQ698125	Spain: Valladolid.
* <i>T.aff. olbiensis</i>	GBPEZ1724-13	HQ698122	Spain: Valladolid, Sieteiglesias.
* <i>T. aff. olbiensis</i>	GBPEZ1732-13	HQ698114	Spain: Segovia, Sepulveda.
* <i>T. aff.Olbiensis</i>	GBPEZ1733- 13	HQ698113	Spain: Cordoba.
* <i>T. aff.Olbiensis</i>	GBPEZ1738-13	HQ698108	Spain: Segovia, San Rafael.
* <i>T.aff. Olbiensis</i>	GBPEZ1739-13	HQ698107	Spain: Segovia, San Rafael.
* <i>T.aff. Olbiensis</i>	GBPEZ1741-13	HQ698105	Spain: Segovia, San Rafael.
* <i>T. aff.Olbiensis</i>	GBPEZ1742-13	HQ698104	Spain: Madrid.

* <i>T.leptoderma</i>	GBPEZ1753-13	HQ698093	Spain: Caceres, Alcantara.
* <i>T.leptoderma</i>	GBPEZ1755-13	HQ698091	Spain: Leon, Lugan.
* <i>T.claveryi</i>	GBPEZ1763-13	HQ698083	Spain: Almeria.
* <i>T.claveryi</i>	GBPEZ1764-13	HQ698082	Spain: Ciudad Real.
* <i>T. claveryi</i>	GBPEZ1772-13	HQ698074	Spain: Murcia.
* <i>T.claveryi</i>	GBPEZ1773-13	HQ698073	Spain: Valladolid.
* <i>T. claveryi</i>	GBPEZ1774-13	HQ698072	Spain: Guadalajara.
* <i>T. claveryi</i>	GBPEZ1775-13	HQ698071	Spain: Ciudad Real.
* <i>T. claveryi</i>	GBPEZ1776-13	HQ698070	Spain: Burgos, Aranda.
* <i>T. arenaria</i>	GBPEZ1779-13	HQ698067	Spain: Salamanca, Valdeosa.
* <i>T. claveryi</i>	GBPEZ2710-15	GQ888690	Iran.
* <i>T. fanfani</i>	GBPEZ2711-15	HM056215	Spain: Badajoz.
* <i>T. fanfani</i>	GBPEZ2712-15	HM056216	Spain: Caceres.
* <i>T.olbiensis</i>	GBPEZ2713-15	HM056224	Spain: Valladolid.
* <i>T. sp</i>	GBPEZ2717-15	/	inconnue

### 3. Choix des marqueurs

Les données moléculaires des espèces que nous avons étudiées sont les ITS. Est une région d'ADN non-codante chez les eucaryotes. Plus précisément, la région « ITS1 » est située entre le gène de l'ARN ribosomique (=ARNr) 18S et celui de l'ARNr 5.8S, et la région « ITS2 » est placée entre cet ARNr 5.8S et le gène de l'ARNr 28S. Ainsi, la séquence entière qui comprend ITS1, ITS2 et 5.8S est appelée « la région ITS » (Schoch et *al.*, 2012).





**Figure 06.** Organisation d'un opéron de l'ADN ribosomique chez les eucaryotes (Bellemain *et al.*, 2010).

En effet, la région ITS possède deux grands avantages, qui lui permettent d'être un marqueur génétique préféré chez des champignons depuis plus de 20 ans.

D'abord, elle contient des régions conservées et hypervariables entre les différentes espèces du même genre. De plus, en utilisant la région ITS, le séquençage ne nécessite pas une énorme quantité de cellules fongiques, car le nombre de copies de cette région est assez élevé, pouvant aller jusqu'à 250 copies par cellules (Bellemain *et al.*, 2010).

Dans le passé, on supposait que l'ITS n'avait aucune fonction, mais (Lalev et Nazar, 1998) ont proposé que l'ITS1 puisse affecter l'efficacité ou jouer un rôle de soutien dans la biogenèse des ribosomes. De plus, des régions conservées dans les espaces transcriptionnels internes ont été trouvées chez divers eucaryotes qui indiquent une fonction de l'ITS2 dans la maturation du pré-ADNr (Froeschke et vonder Heyden., 2014).

#### 4. Alignement multiple des séquences

L'alignement multiple de séquence d'ADN ou de protéine est l'une des méthodes les plus courantes pour l'analyse de séquence. Il est considéré comme l'un des problèmes les plus difficiles en bio-informatique. En réalité est un agencement de plusieurs séquences biologiques dans le but de mettre en valeur leur similitude et convergence. Les alignements multiples dépendent du nombre de séquences et de leur longueur (Wallace *et al.*, 2006).

Objectif de l'alignement est de détecter des similitudes structurelles ou fonctionnelles entre protéines lors de la comparaison d'une autre séquence protéique (la détection de l'homologie des séquences = homologie de fonction), du plus il joue un rôle vital dans l'identification de nouveaux membres de la protéine lors de la comparaison avec des séquences similaires, il révèle aussi si il y a des mutations par (insertion, substitution,...) (Mohammad Yaseen Sofi ,2022).

L'alignement est une étape cruciale qui conditionne la qualité de la construction phylogénétique. Il y a plusieurs logiciels qui peuvent réaliser ce processus y compris (les différentes versions de l'algorithme MEGA, BioEdit...etc.). Dans notre étude les séquences nucléotidiques ont été alignées à l'aide de l'algorithme MUSCLE dans le logiciel MEGA version 11, qui peut être téléchargé au lien suivant : [www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net).

Ce logiciel a été développé pour contenir une large collection de méthodes et d'outils de calcul de l'évolution moléculaire. Cette dernière version est maintenant devenue une suite d'applications qui répond à la variété des environnements informatiques actuellement utilisés par les chercheurs en évolution moléculaire et en phylogénétique (Tamura et *al.*, 2021).

- On a accédé au moteur de recherche Google pour télécharger la dernière version du ce logiciel à partir le lien qui est mentionné ci-dessus.
- Après le téléchargement, on a ouvert notre fichier (format Fasta) qui a déjà nos séquences, par le logiciel MEGA.
- Nous avons sélectionné toutes les séquences afin de lancer l'alignement. Puis on a appuyé sur « **Edit** » une menu a été montré, possède des choix, on a choisi la position « **select All** » (sélectionner toutes les séquences).
- On a cliqué sur « **MUSCLE** » qui se trouve dans la barre de menu, une petite menu a apparu, on a choisi l'option « **align DNA** » (aligner l'ADN).
- Dès qu'une nouvelle fenêtre apparaît contenant tous les paramètres nécessaires à cette étape, «on a conservé les paramètres par défaut », nous avons appuyé sur le Bouton « **OK** ».
- Une fois l'alignement est terminé nous avons enregistré notre nouveau fichier

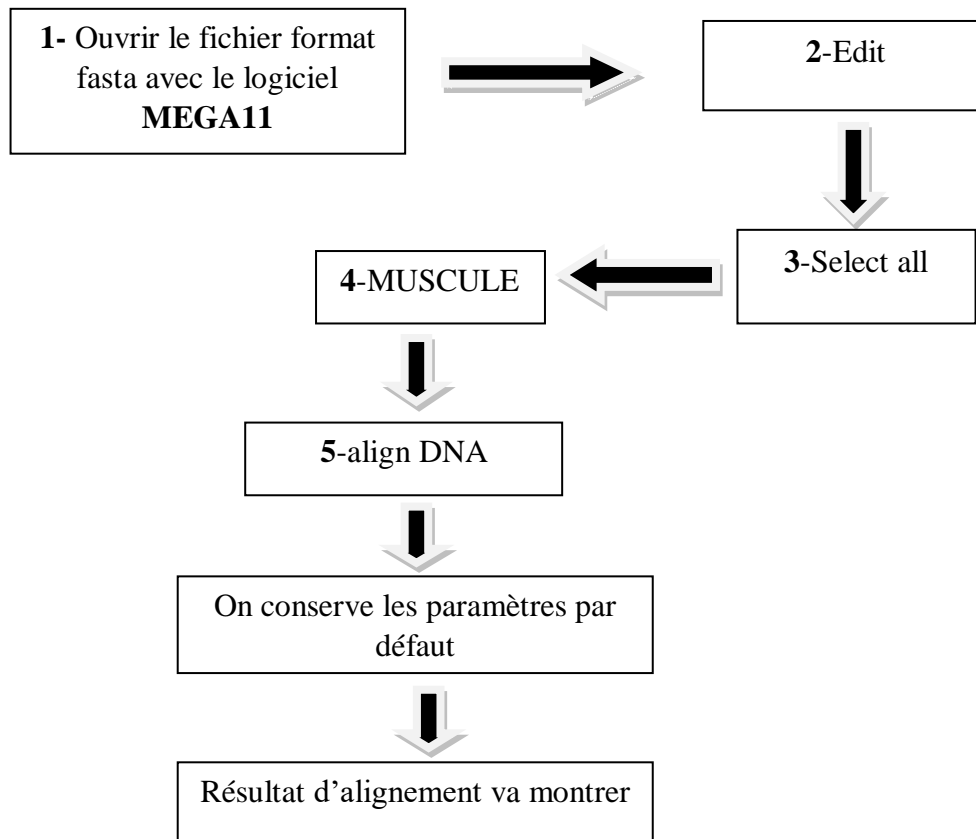


Diagramme représente les étapes de l'alignement multiple par l'algorithme MUSCULE.

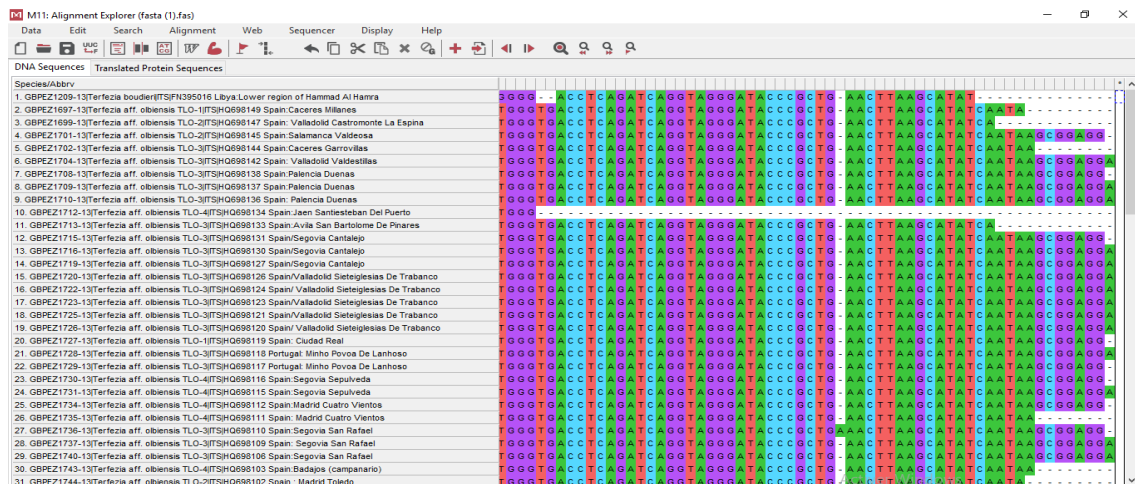


Figure 07. L'interface de logiciel MEGA 11 des séquences alignées.

### 5. Raffinement des séquences alignées

L'alignement multiple des séquences est souvent incomplet ou très divergente, ce qui conduit à des régions mal alignées ou à de grandes lacunes dans les alignements. Cela ralentit le calcul et peut avoir un impact sur les conclusions sans être biologiquement pertinent, par

conséquent, le nettoyage de l'alignement en supprimant ces régions peut considérablement améliorer les analyses (Tumescheit *al.*, 2022).

On peut faire le nettoyage manuellement ou automatiquement par des logiciels et des plateformes disponibles en ligne, y compris (Gblocks, MEGA, BioEdit ...).

## **6. Construction de l'arbre phylogénétique**

L'arbre phylogénétique, également appelé phylogénie, est un diagramme qui décrit les lignes d'évolution de différentes espèces, organismes ou gènes à partir d'un ancêtre commun. Les phylogénies sont utiles pour organiser la connaissance de la diversité biologique, pour structurer les classifications et pour donner un aperçu des événements qui se sont produits au cours de l'évolution (Baum, 2008).

Après toutes les étapes précédentes, c'est maintenant le tour de la construction phylogénétique, cette étape consiste à représenter sous forme d'un arbre phylogénétique les relations évolutives entre nos séquences.

### **6.1. Méthodes de la construction de l'arbre phylogénétique**

Il y a plusieurs logiciels qui peuvent nous aider à effectuer cette construction, parmi lesquels les différentes plateformes disponibles en ligne (NG-phylogeny, phylogeny,...). Il y a d'autres différentes méthodes pour la génération de l'arbre phylogénétique, appelées méthodes d'inférence phylogénétique peuvent être appliquées pour obtenir l'arbre qui reflète le mieux les données, deux grandes catégories regroupent ces différentes méthodes :

#### **6.1.1. Méthodes basées sur la distance**

Utilisent une matrice d'estimation de la distance évolutive appelée matrice de la dissimilarité, obtenue en comparant les paires de séquences, par exemple : le Neighbor joining, la méthode UPGMA (Bonnin et Lombard, 2019).

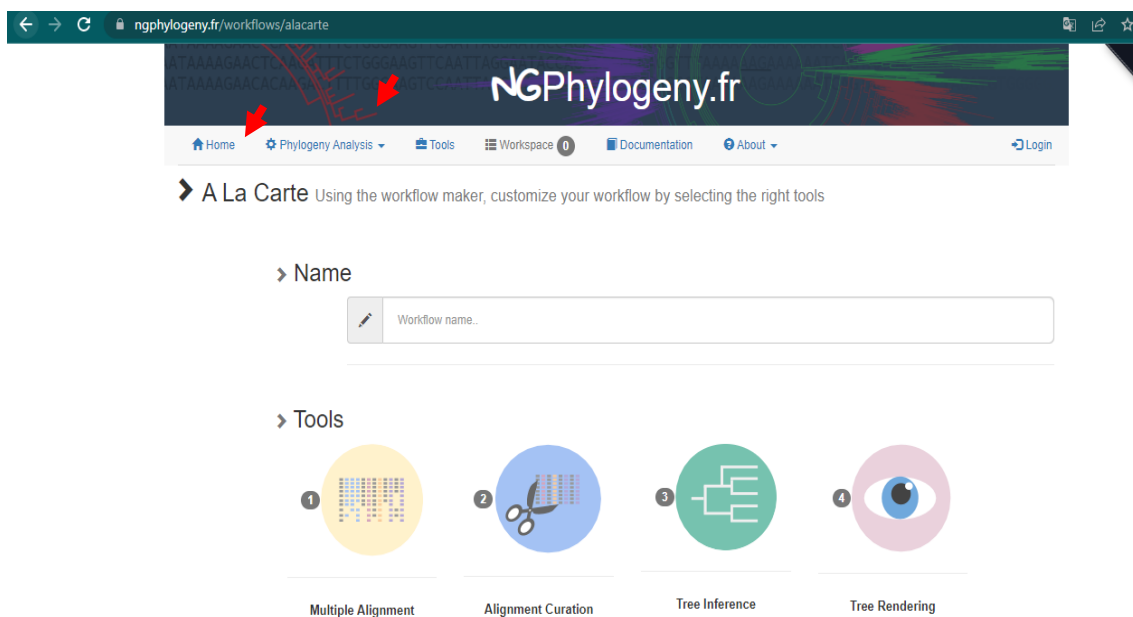
#### **6.1.2. Méthodes basées sur les caractères**

Basées sur un ou plusieurs caractères à étudier, parmi lesquelles : la méthode du maximum de vraisemblance (maximum likelihood ML), la méthode de la maximum parcimonie (maximum parsimony), la méthode bayésienne de Delsuc et Douzery (Site web 01).

Dans notre étude, nous avons utilisé la plateforme **NG-phylogeny** elle est disponible sur le lien suivant : <https://ngphylogeny.fr/>, pour la construction de l'arbre phylogénétique.

Cette dernière est plus flexible en termes d'outils et de flux de travail, accessible facilement et plus évolutif. Il intègre de nombreux outils dans leur dernière version (ex. TNT, FastME, MrBayes, etc.) ainsi que des nouveautés conçues ces dix dernières années (ex. PhyML, SMS, FastTree, trimAl, ...etc.) (Lemoine et *al.*, 2019).

Après avoir interrogé ce portail, une fenêtre apparaîtra à l'écran contenant une barre de menu, nous avons mis le curseur sur **phylogeny analysis**, une petite menu est apparu, nous avons choisi l'option **à la carte**.



**Figure 08.** L'interface de la plateforme NG-phylogeny

La fenêtre qui a apparu sur l'écran rassemble les quatre étapes de la construction de l'arbre (Multiple alignement, alignement curation, tree inference, tree rendering). Chaque phase inclue des petites menues à partir desquelles on peut choisir les logiciels qu'on nous voulons, on a fait déjà la première étape qui est l'alignement multiple des séquences, la deuxième étape c'est le nettoyage des séquences nucléiques, son rôle principale est supprimer les petites séquences qui ne servent à rien, nous avons sélectionné la méthode **PhyML**, et pour la visualisation de l'arbre on a choisi **Newick Display**. Et on a appuyé sur « **Create Workflow** » pour lancer la construction.

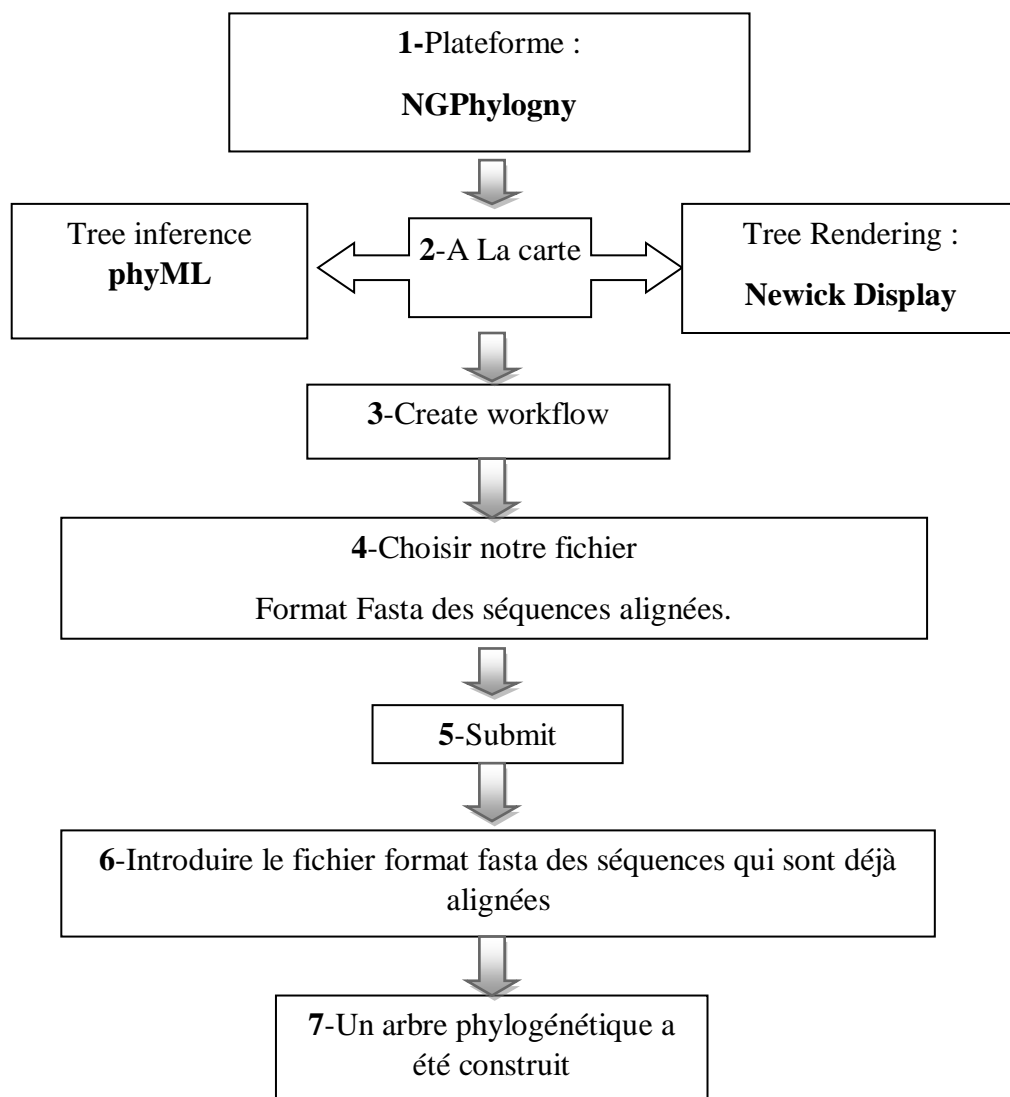
### PhyML

A été largement utilisé en raison de sa simplicité et d'un juste compromis entre précision et rapidité. Entre-temps, la recherche sur PhyML s'est poursuivie, et de nouveaux algorithmes et méthodes ont été implémentés dans le programme (Lefort et *al.*, 2017).

### Visualisation d'arbre phylogénétique (Newick)

Est un outil en ligne pour l'affichage de l'arbre phylogénétique (format Newick) qui permet d'afficher plusieurs alignements de séquences avec les arbres (format Fasta) (Site web 02).

Une fois la boîte de dialogue a été apparue des données d'entrées, nous avons sélectionné notre fichier format Fasta qui a été aligné déjà, puis on clique sur « **Submit** », pour faire lancer la construction de notre arbre phylogénétique. Le diagramme ci-dessous montre toutes les étapes de construire l'arbre phylogénétique du genre *Terfezia*.



Les étapes de la construction de l'arbre phylogénétique par la plateforme NG-phylogeny

### 7. Délimitation des espèces

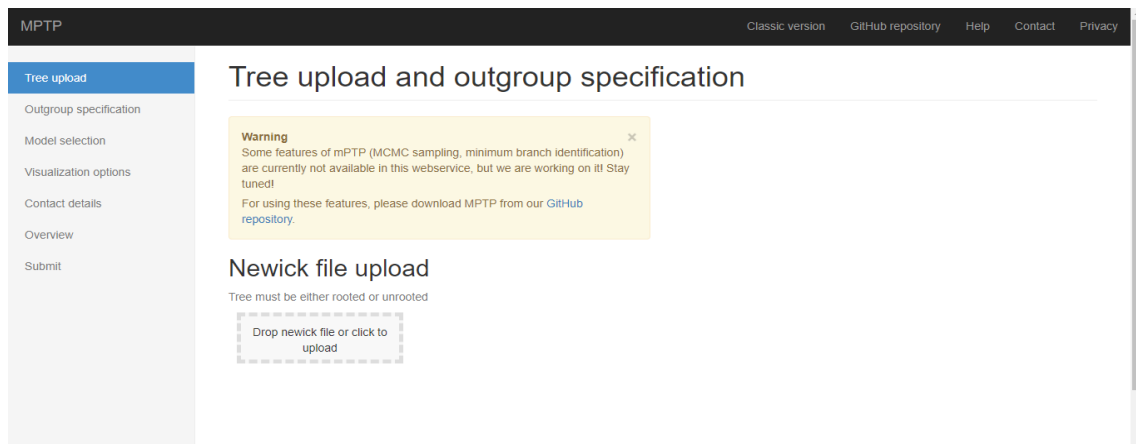
Ces dernières années, la délimitation moléculaire des espèces est devenue une approche de routine pour quantifier et classer la biodiversité. Les méthodes de code à barres sont

particulièrement importantes dans les enquêtes à grande échelle car elles favorisent la découverte rapide d'espèces et les estimations de la biodiversité parmi celles-ci, les méthodes basées sur la distance, sont le choix le plus courant (Kapli et *al.*, 2017).

Nous avons appliqué deux méthodes : mPTP et ASAP.

### 7.1. mPTP (multi-rate Poisson Tree Processes)

Est une méthode améliorée qui atténue les lacunes théoriques et techniques du PTP. Il intègre différents niveaux de diversité génétique intra-spécifique provenant de différences dans l'histoire évolutive ou l'échantillonnage de chaque espèce (Kapli et *al.*, 2017).



**Figure 09.** L'interface de la plateforme mPTP

Nous avons accédé à la plateforme mPTP à partir le lien suivant :

Le serveur <http://mptp.h-its.org/#/tree> une fenêtre a été apparue. Maintenant c'est le tour d'introduire notre fichier qui est l'arbre phylogénétique sous format **ML-Newick** que nous l'avons obtenue déjà à partir les étapes précédentes, après l'introduction de notre fichier, nous avons sélectionné l'outgroup (l'exo-groupe en français) qui est l'espèce *Terfezia sp* (son code de Genbank est : GBPEZ2717-15) on a appuyé sur « **model selection**», pour faire démarrer la délimitation.

### 7.2. ASAP (Assemble Species by Automatic Partitioning)

Une nouvelle méthode pour construire des partitions d'espèces à partir d'alignements de séquences de locus uniques (c'est-à-dire des ensembles de données de codes à barres) (Puillandre et *al.*, 2021). ASAP est la mise en œuvre d'un algorithme de clustering

hiérarchique qui n'utilise que des distances génétiques par paires, évitant ainsi la charge de calcul de la reconstruction phylogénétique (Site web 03).



**Figure 10.** L'interface de la plateforme ASAP.

Nous avons accédé à cette plateforme à partir le lien suivant :

<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap> , puis on a introduire le fichier qui comporte toutes les séquences du genre *Terfezia* qui sont déjà alignées, nous avons laissé les paramètres par défaut puis on a appuyé sur « **Go** » pour lancer la délimitation.

La différence entre ces deux méthodes de délimitation c'est que la première (**mPTP**) dépend l'introduction d'un arbre phylogénétique sous format **ML-Newick**, par contre la deuxième méthode (**ASAP**) qui est travaillé sur des séquences d'ADN alignées.



# **Chapitre 04 :**

## **Résultats et Discussion**

Ce chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus du téléchargement des séquences et leur l'identification, de la construction de l'arbre phylogénétique et de la délimitation des espèces.

### 1. Résultats et Discussions

Grâce à BOLDSYSTEMS et GenBank, on a trouvé que le genre *Terfezia* contient 13 espèces : (*Terfezia boudieri*, *Terfezia aff-olbiensis*, *Terfezia alsheikhii*, *Terfezia leptoderma*, *Terfezia claveryi*, *Terfezia arenaria*, *Terfezia fanfani*, *Terfezia olbiensis*, *Terfezia sp*, *Terfezia trappei*).

Toutes ces espèces sont représentées par 97 séquences, c'est-à-dire 97 enregistrements publiés et chaque séquence possède un numéro d'accession.

Selon les résultats de BOLD, les spécimens proviennent de deux pays, mais, il a été constaté qu'il y a plus de deux pays (Spain, Portugal, Iran, Palestine, France et la Lybie), qui peut être que les noms de ces pays n'ont pas encore été introduits dans cette plateforme.

**Tableau 02** . La distribution des séquences sur les espèces dans le BOLD

Espèces	Nombre des séquences
<i>Terfezia aff.olbiensis</i>	<b>34</b>
<i>Terfezia clavery</i>	<b>18</b>
<i>Terfezia leptodermie</i>	<b>11</b>
<i>Terfezia aff.olbiensis</i>	<b>7</b>
<i>Terfezia arenaria</i>	<b>5</b>
<i>Terfezia aff.olbiensis</i>	<b>4</b>
<i>Terfezia sp.</i>	<b>4</b>
<i>Terfezia aff.olbiensis</i>	<b>3</b>
<i>Terfezia alshikhi</i>	<b>2</b>
<i>Terfezia boudieri</i>	<b>1</b>
Autres	<b>5</b>

La méthode de maximum de vraisemblance (Maximum likelihood ML) a été utilisée dans cette étude pour montrer la diversité génétique et la classification des espèces de *Terfezia* sous forme d'un arbre phylogénétique.

On observe que le genre *Terfezia* a été divisé en deux principaux groupes (A et B), chaque groupe a été divisé en sous-groupes ou clades qui regroupent les différents lignages des clades (montrent la diversité de regroupement des séquences), pour voir l'arbre phylogénétique plus claire retournez à l'annexe N° 02.

Les quatre premiers sous-groupes appartiennent au groupe A, et comprennent les espèces suivantes : *T.boudierie*, *T.arenaria*, *T.claveryi*, la plupart de ces espèces ont été collectées en Espagne sauf deux espèces, l'une de Palestine et l'autre de Libye.

Les séquences de *T.claveryi* ont été divisées en deux clades seulement une séquence parmi eux, a été collectée en Iran, les autres ont été collectés dans différentes régions de l'Espagne. Ces séquences sont classées morphologiquement comme une seule espèce, mais la taxonomie moléculaire les a divisées en deux clades différents, peut-être des espèces putatives.

Le deuxième groupe principal B contient les restes des sous-groupes dont font partie les restes des espèces sont incluses : *T.alshikhii*, *T.aff-olbiensis*, *T. trappei*, *T.leptoderma*, *T.fanfani*, *Terfezia.sp*, *T.olbiensis*.

Nous avons choisi *Terfezia.sp* (GBPEZ2717-15) comme un outgroup.

Les *T.alshikhii* ont été classées dans un seul clade. Les *T.aff-olbiensis* ont été divisées en trois sous-groupes, dont le septième groupe est constitué des séquences provenant des différentes espèces (*T.trappei*, *T.leptoderma*, *T.fanfani* et *T.aff-olbiensis*). Il se peut qu'il y ait un haut degré de similarité entre ces séquences, ou qu'elles aient été mal identifiées, et il se peut qu'il y ait des erreurs dans leurs noms, c'est pourquoi elles sont fusionnées en un seul clade.

Appart l'exogroupe, il y a 03 séquences de *Terfezia.sp*. Deux séquences collectées en Espagne ont été trouvées dans le neuvième sous-groupe avec les *T.aff-olbiensis*, elles peuvent être des répétitions, et la première séquence n'a pas encore été supprimée de BOLD, la troisième séquence (HM056211) s'est avérée être la seule séquence dans un clade significativement distinct.

L'outil de recherche d'alignement local de base (BLAST) et le système d'identification BOLD (IDS) pour ITS ont été utilisés pour identifier certaines espèces qui étaient déjà classées en dehors de leurs propres groupes. Nous avons trouvé que *T.fanfani* (HM056215) a un degré de similarité de 100% avec *T.olbiensis*. Et l'autre *T.fanfani* (HM056216) est similaire à 100% à *T.leptoderma*, c'est pourquoi elle a été fusionnée avec eux.

Il est douteux que ces deux *T.fanfani* soient des séquences répétées, leurs codes d'accès étant identiques. Il en va de même pour les deux séquences de *T.trappie*, leur identification a montré qu'elles sont 100% similaires à *T.aff-olbiensis*.

L'identification de *Terfezia.sp* (HM056211) a révélé que cette espèce présente une similarité avec une autre espèce appelée *Terfezia. pseudoleptoderma*, raison pour laquelle elle a été classée dans un clade distinct.

La description	Nom scientifique	Note maximale	Score total	Couverture de la requête	Valeur E	Par. Ident	Acc. Len	Accession
Terfezia pseudoleptoderma MUB Fung-0028 région ITS : à partir du matériel TYPE	Terfezia pseudol...	1000	1000	100%	0.0	100.00%	588	NR_137052
Gène de l'ARN ribosomique QT-46 18S du clone de Pezizaceae non cultivé : séquence partielle : espace...	Pezizacées non...	994	994	100%	0.0	99.82%	638	FJ013064.1
Isolat de Terfezia pseudoleptoderma gène ARN ribosomal tO42 18S : séquence partielle : espaceur trans...	Terfezia pseudol...	876	876	100%	0.0	95.81%	631	HM056213...
Isolat de Terfezia pseudoleptoderma gène ARN ribosomal tL17 18S : séquence partielle : espaceur trans...	Terfezia pseudol...	872	872	100%	0.0	95.49%	647	HM056212...
Terfezia aff. olbiensis TLO-3 voucher MA FU 54674 clone ter64_01 Gène ARN ribosomal 18S : séquenc...	Terfezia aff. olbie...	865	865	100%	0.0	95.45%	663	HQ698135...
Terfezia pini MUB Fung-0027 Région ITS : à partir du matériel TYPE	Terfezia pini	859	859	100%	0.0	95.26%	631	NR_164515
Terfezia aff. olbiensis TLO-3 voucher MA FU 54674 clone ter64_10 Gène ARN ribosomal 18S : séquenc...	Terfezia aff. olbie...	859	859	100%	0.0	95.26%	663	HQ698139...
Terfezia aff. olbiensis TLO-3 voucher MA FU 54674 clone ter64_03 Gène ARN ribosomal 18S : séquenc...	Terfezia aff. olbie...	859	859	100%	0.0	95.26%	663	HQ698137...
Terfezia aff. olbiensis TLO-3 voucher MA FU 54674 clone ter64_02 Gène ARN ribosomal 18S : séquenc...	Terfezia aff. olbie...	859	859	100%	0.0	95.26%	663	HQ698136...
Terfezia aff. olbiensis TLO-3 voucher MA FU 5407 Gène ARN ribosomique 18S : séquence partielle : esp...	Terfezia aff. olbie...	857	857	100%	0.0	95.11%	647	HQ698101...
Terfezia aff. olbiensis TLO-3 voucher MA FU 24562 clone ter43_02 Gène ARN ribosomal 18S : séquenc...	Terfezia aff. olbie...	856	856	100%	0.0	95.08%	664	HQ698106...
Terfezia aff. olbiensis TLO-3 voucher MA FU 54964 clone ter65_08 Gène ARN ribosomal 18S : séquenc...	Terfezia aff. olbie...	854	854	100%	0.0	95.08%	663	HQ698143...

**Figure 11.** Résultat de l'identification de la séquence *Terfezia.sp* (HM056211) dans l'outil BLAST.

On peut dire que cette séquence (HM056211) peut avoir subi d'erreurs ou d'omissions lors de son identification (mauvaise identification), ou peut-être avoir été génétiquement modifiée par des mutations, soit des substitutions ou des délétions. Lorsque l'on compare la séquence nucléotidique de cette séquence avec d'autres, on constate qu'il existe une différence entre elles, comme la montre la figure ci-dessous.

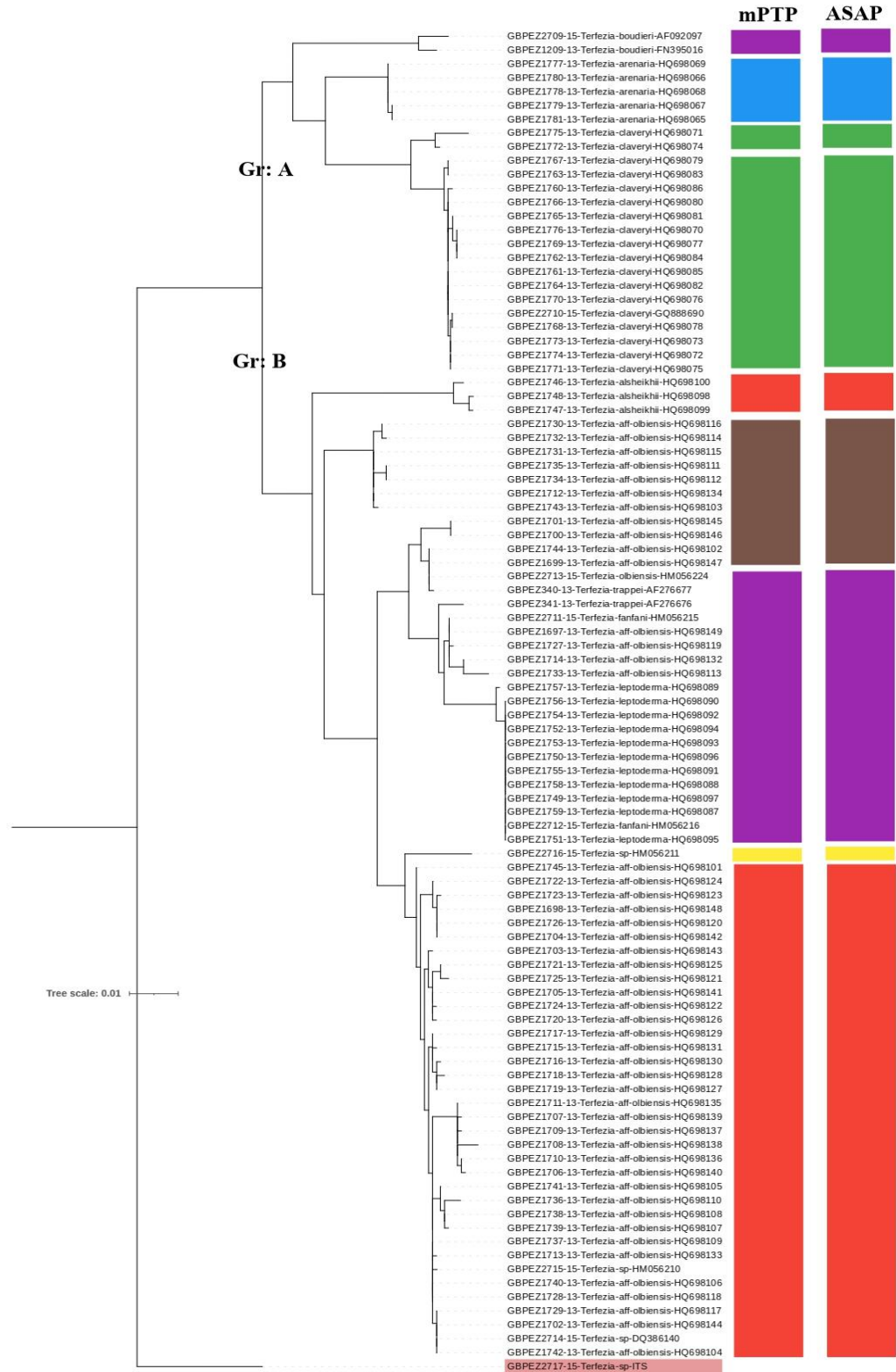


**Figure 12.** Résultat de l'alignement multiple de la séquence *Terfezia.sp* (HM056211) par le logiciel MEGA

Le tableau suivant contient tous les résultats de l'identification des espèces par l'outil BLAST

**Tableau 03.** Les résultats de l'identification par l'outil BLAST.

<b>Nom de l'espèce</b>	<b>Numéro d'accèsion</b>	<b>Résultat de l'identification par BOLD et BLAST</b>
<i>T.fanfani</i>	HM056216	Similaire à 100 % avec <i>T.leptoderma</i>
<i>T.fanfani</i>	HM056215	Similaire à 100 % avec <i>T.aff-olbiensis</i>
<i>Terfeizia.sp</i>	HM056211	Similaire à 100 % avec <i>T.pseudoleptoderma</i>
<i>Terfeizia.sp</i>	HM056210	Similaire à 99,63 % avec <i>T.aff-olbiensis</i>
<i>Terfeizia.sp</i>	DQ386140	Similaire à 100 % avec <i>T.aff-olbiensis</i>
<i>Terfeizia.trappie</i>	AF276677	Similaire à 100 % avec <i>T.aff-olbiensis</i>
<i>Terfeizia.trappie</i>	AF276676	Similaire à 100 % avec <i>T.aff-olbiensis</i>
<i>T. olbiensis</i>	HM056224	Similaire à 100 % avec <i>T.aff-olbiensis</i>



**Figure 13.** Arbre phylogénétique du maximum de vraisemblance déduit pour le genre *Terfezia*. Les nombres sur les branches représentent le support bootstrap. L'arbre est enraciné sur *Terfezia .sp* comme outgroupe. Comparaison des résultats de la délimitation des espèces de *Terfezia* à l'aide de deux méthodes différentes mPTP et ASAP.

En comparant le regroupement et la classification des séquences nucléotidiques dans l'arbre phylogénétique, avec les barres des résultats de la délimitation par les deux méthodes mPTP et ASAP nous trouvons les mêmes résultats.

Le mPTP a suggéré qu'il y'a 09 groupes, de même pour l'ASAP, les séquences ont été classées et arrangées dans la même manière, leur partition comme indiqué dans le tableau suivant :

**Tableau 04.** La répartition des séquences sur les différents sous-groupes de l'arbre phylogénétique

<b>Le sous groupe</b>	<b>Les espèces incluses</b>
<b>01</b>	<i>Terfezia boudieri</i> (02 séquences).
<b>02</b>	<i>Terfezia arenaria</i> (05 séquences).
<b>03</b>	<i>Terfezia claveryi</i> , (02 séquences).
<b>04</b>	<i>Terfezia claveryi</i> , (16 séquences).
<b>05</b>	<i>Terfezia alsheikhii</i> (03 séquences).
<b>06</b>	<i>Terfezia aff-olbiensis</i> (07 séquences).
<b>07</b>	<i>Terfezia aff-olbiensis</i> (08 séquences), <i>Terfezia leptoderma</i> , (11 séquences), <i>Terfezia fanfani</i> (02 séquences), <i>Terfezia olbiensis</i> (une seule séquence), <i>Terfezia trappei</i> (02 séquences).
<b>08</b>	<i>Terfezia sp</i> , (une seule séquence).
<b>09</b>	<i>Terfezia aff-olbiensis</i> (34 séquences), <i>Terfezia sp</i> (02 séquences).



D'après les résultats que nous avons obtenus nous concluons que la délimitation d'espèces par ces deux méthodes a confirmé la distribution des différentes espèces dans l'arbre phylogénétique, de plus l'espèce *T.aff-olbiensis* (la plupart ont été collectées en Espagne), possède une large distribution géographique. Car elle est présentée par quarante-neuf séquences.

# **Conclusion**

## Conclusion

Notre travail a été réalisé dans le but de construire un arbre phylogénétique du genre *Terfezia*, et d'étudier les relations phylogénétiques entre ses séquences qui sont disponibles sur la plateforme BOLDSYSTEMS. La base de données GenBank a été utilisée pour interroger la fiche descriptive de chaque séquence afin d'obtenir les informations nécessaires à notre étude.

Selon les données du BOLDSYSTEMS le genre *Terfezia* contient 13 espèces représentées par 97 séquences, ces séquences ont été alignées par un algorithme appelé MUSCLE qui se trouve dans le logiciel MEGA.

Les séquences alignées ont été introduit dans la plate-forme NG-phylogeny afin de construire l'arbre phylogénétique, en utilisant la méthode de Maximum likelihood (ML), l'étape suivante était la délimitation des espèces, ce processus a été effectué par deux méthodes différentes qui sont ASAP et mPTP.

La délimitation des espèces par ces méthodes a donné les mêmes résultats, c'est-à-dire qu'elles ont confirmé les distributions et la classification des séquences dans l'arbre phylogénétique.

Le truffe du désert a une valeur nutritionnelle et économique importantes, ses prix sont très élevés, plus que ses utilisations médicinales, mais malheureusement il n'est pas exploitée dans notre pays. Malgré le fait qu'il existe trois genres de ces champignons peuvent pousser en Algérie, nous avons remarqué l'absence de séquences algériennes dans la plateforme BOLD, ce qui signifie qu'aucune étude génétique n'a été réalisée sur celles-ci au niveau de ce gène (ITS).

Malgré tous ces progrès récents des programmes informatiques phylogénétiques et l'augmentation du nombre des séquences introduites dans les différentes bases de données scientifiques publiques, dont GenBank et BOLDSYSTEMS, nous avons observé des lacunes dans les données génétiques, par exemple des séquences répétées qui peuvent fausser les résultats des études phylogénétiques, ainsi que la présence de séquences de spécimens mal identifiées. Il est vrai que le rôle le plus important de ces bases de données est de préserver la biodiversité et d'autres utilisations importantes, où la vérification de la validité des données incluses est devenue nécessaire pour éviter les erreurs et les lacunes dans les futures études phylogénétiques.

# **Bibliographie**

## Bibliographie

1. **Aish, A. A., Abdulmalek, S. T., Kareem, T. A., Yasir, L. B.; Matny, O. 2020.** Molecular identification and genetic diversity study of the Iraqi truffles. *Journal of Phytology*, 12, 121- 126.
2. **Ammarellou, A. 2007.** Protein profile analysis of desert truffle (*Terfezia claveryi* Chatin). *Journal of Food Agriculture and Environment*, 5(2), 62.
3. **Baum, D. 2008.** Reading a phylogenetic tree: the meaning of monophyletic groups. *Nature Education*, 1(1), 190.
4. **Bellemain, E., Carlsen, T., Brochmann, C., Coissac, E., Taberlet, P., & Kauserud, H. 2010.** ITS as an environmental DNA barcode for fungi: an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC microbiology*, 10(1), 1-9.
5. **Bonnin, T., & Lombard, J. 2019.** Situer l'analyse phylogénétique entre les sciences historiques et expérimentales. *Philosophia Scientiæ. Travaux d39 ; histoire et de philosophie des Sciences*.
6. **Bouchareb F. 1994.** Etude écologique des *Terfez*, cas de la région d'Ain Sefra (Wilaya de Naâma). *Mém. Ing. D'état. Agron., I.N.F.S.A. Mostaganem*, 81 p.
7. **Chevalier G., Rioussel L., Dexheimer J., et Dupre C., 1984.** Synthèse mycorhizienne entre *Terfezia leptoderma Tul* et diverses cistacées. *Agronom. (4):210-212*.
8. **Davis, A. 2021.** Eight Interesting Uses of Barcodes. Novembre 23 rd, 2021. Disponible Sur : <https://www.noupe.com/business-online/interesting-uses-of-barcodes.html> .
9. **Dib-Bellahouel S. 2012.** Etude du pouvoir antimicrobien et mycorhizien de deux espèces de *Terfez* : *Tirmania pinoyi* (Maire) Malençon et *Terfezia leptoderma Tul*. Thèse de doctorat. Université; d'Oran 1, Algérie, 205 p.
10. **Fišer Pečnikar, Ž. & Buzan, E. V. 2014.** 20 years since the introduction of DNA Barcoding: from theory to application. *Journal of applied genetics*, 55(1), 43-52.
11. **Fortas Z. 2009.** Diversité des espèces de *Terfez* (truffes des sables) des zones arides algériennes. *Magnésium*, vol. 5, 6 p.
12. **Fortas, Z. 1990.** Etude de trois espèces de *Terfez*: caractères cultureux et cytologie du mycelium isolé et associé à *Helianthemum guttatum*. These de Doctorat. Université d'Oran Es-Senia, Algérie.
13. **Fortas, Z., & Belahouel-Dib, S. 2007.** Extraction des substances bioactives des *Terfez* d'Algérie et mise en évidence de leur activité antimicrobienne. *Rég. Arid*, 280-282.
14. **Froeschke, G., & von der Heyden, S. 2014.** A review of molecular approaches for investigating patterns of coevolution in marine host–parasite relationships. *Advances in parasitology*, 84, 209-25

15. **Haloubi A., 1988.** Les plantes des terrains sales et désertiques, vues par les anciens arabes ; Confrontation des données historiques avec la classification des végétaux, leur état et leur répartition actuelle en Proche-Orient. Thèse de doctorat, Univ. Scien. Tech. Languedoc, Montpellier, p 86, p 311.
16. **Hansen, K., LoBuglio, K. F., & Pfister, D. H. 2005.** Evolutionary relationships of the cup fungus genus *Peziza* and *Pezizaceae* inferred from multiple nuclear genes: RPB2,  $\beta$ -tubulin, and LSU rDNA. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 36(1), 1-23.
17. **Hebert, P. D., 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.
18. **Hollingsworth, P. M., Graham, S. W., & Little, D. P. 2011.** Choosing and using a plant DNA barcode. *PloS one*, 6(5), e19254.
19. **Kagan-Zur V. Zaretsky M. Sitrit Y., Roth-Bejerano N. 2008.** *Hypogeous pezizaceae*: physiology and molecular genetics. Ed. A. Varma, Mycorrhiza, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 161-183.
20. **Kang, Y., Deng, Z., Zang, R., & Long, W. 2017.** DNA barcoding analysis and phylogenetic relations hips of tree species in tropical cloud forests. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
21. **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.
22. **Karsch-Mizrachi, I. Eric W. Sayers, Mark Cavanaugh, Karen Clark, James Ostell, Kim D. Pruitt. 2018.** GenBank. D94–D99 Nucleic Acids Research, 2019, Vol. 47, Database issue Published online 26 October 2018 doi: 10.1093/nar/gky989.
23. **Kaur, S. 2015.** DNA barcoding and its applications. *International Journal of Engineering Research and General Science*, 3(2), 602-604.
24. **Kovacs G.M., Trappe J.M., Alsheikh A.M., Boka K., Elliott T.F. 2008.** Imaia, a new Truffle genus to accommodate *Terfezia gigantea*. *Mycologia*, 100 (6): 930-939.
25. **Læssøe T., & Hansen K. 2007.** Truffle trouble: what happened to the *Tuberales*. *Mycological research*, 111(9), 1075-1099p.
26. **Lefort, V., Longueville, J. E., & Gascuel, O. 2017.** SMS: smart model selection in PhyML. *Molecular biology and evolution*, 34 (9), 2422-2424.
27. **Lemoine, F., Correia, D., Lefort, V., Doppelt-Azeroual, O., Mareuil, F., Cohen-Boulakia, S., & Gascuel, O. 2019.** NGPhylogeny.fr: new generation phylogenetic services for nonspecialists. *Nucleic acid research*, 47(W1), W260- W265.

28. **Mohammad Yaseen Sofi, K. 2022.** Alignement de séquences multiples. Physique Biomédicale complète. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91128-3.00012-4>
29. **Nguyen, H. D. T., & ; Seifert, K. A. 2008.** Description and DNA barcoding of three new species of *Leohumicola* from South Africa and the United States. *Persoonia-Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi*, 21(1), 57-69.
30. **Norman J.E., Egger K.N.1999.** Molecular phylogenetics analysis of *Peziza* and related genera. *Mycologia*, 91: 820-829.
31. **Puillandre, N., Brouillet, S., & ; Achaz, G. 2021.** ASAP: assemble species by automatic partitioning. *Molecular Ecology Resources*, 21(2), 609-620.
32. **Raclariu, A. C., Heinrich, M., Ichim, M. C., & ; de Boer, H. 2018.** Benefits and limitations of DNA barcoding and metabarcoding in herbal product authentication. *Phytochemical Analysis*, 29(2), 123-128.
33. **RiOUSset L. G., Chevalier G., Bardet M. C. 2001.** Truffes d'Europe et de Chine. Ed. I.N.R.A., Paris, 181 p.
34. **Roth-Benjerano N, Mendlinger S, Kagan-Zur V .2004.** Effect of calcium on growth of submerged *Terfezia boudieri* mycelium. *Mycoscience*. (45): 30-34p.
35. **Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., & ; White, M. M. 2012.** Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(16), 6241-6246.
36. **Sujeewan, R., & ; Hebert, P. A. U. L. 2007.** BOLD: the Barcode of life data system. *Molecular ecology notes*, 7(3), 355-364.
37. **Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., & ; Coissac, E. 2018.** Environmental DNA: For biodiversity research and monitoring. Oxford University Press.
38. **Tamura, K., Stecher, G., & ; Kumar, S. 2021.** MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027.
39. **Trappe J. M. 1971.** A synopsis of the *Carbomycetaceae* and *Terfeziaceae* (*Tuberales*). *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57: 85-92.
40. **Trappe J. M. 1979.** The orders, families and genera of hypogeous ascomycotina (Truffles and their relatives). *Mycotaxon*, 9: 297-340.
41. **Trappe J. M., Claridge A. W., Arora D., Smit W. A. 2008.** Desert truffles on the African Kalahari: Ecology, Ethnomycology, and Taxonomy. *Economic botany*, 62 (3): 521-529.

42. **Tumescheit, C., Firth, A. E., & Brown, K. 2022.** CIAalign: A highly customisable command line tool to clean, interpret and visualise multiple sequence alignments. *PeerJ*, 10, e12983.
43. **Varma, A. (Ed.). 2008.** Mycorrhiza: state of the art, genetics and molecular biology, ecofunction, biotechnology, eco-physiology, structure and systematics.
44. **Wallace, I. M., O&; Sullivan, O, Higgins, D. G, & Notredame, C. 2006.** M-Coffee: combining multiple sequence alignment methods with T-Coffee. *Nucleic acid research*, 34(6), 1692-1699.
45. **Zitouni F. E. H. 2010.** Etude des associations mycorhiziennes entre quatre espèces de *Terfez* et diverses plantes *Cistacées* et ligneuses en conditions contrôlées. Mémoire de Magister, Université d'Oran 1, Algérie, 264 p.
46. **Zitouni-Haouar F. E. H., Carlavilla J. R., Moreno G., Manjon J. L., Fortas Z. 2018.** Genetic diversity of the genus *Terfezia* (Pezizaceae, Pezizales): New species and new record from North Africa. *Phytotaxa*, 334 (2) : 183–194.



# Liens électroniques

[www.boldsystems.org](http://www.boldsystems.org)

[www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)

[www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)

<https://ngphylogeny.fr/>

<https://mptp.h-its.org/#/tree>

<https://bioinfo.mnhn.fr/abi/public/asap> Consulté le : 02/06/2022.

<https://molbiol-tools.ca/Phylogeny.htm> Consulté le : 26/05/2022.

[https://www.labunix.uqam.ca/~makarenkov\\_v/BIF7002/Rapport\\_Vo/BIO7002/la-bioinformatique/la-construction-darbre-phylogenetique/les-methodes-dinference-phylogenetique.html](https://www.labunix.uqam.ca/~makarenkov_v/BIF7002/Rapport_Vo/BIO7002/la-bioinformatique/la-construction-darbre-phylogenetique/les-methodes-dinference-phylogenetique.html) Consulté le : 12/06/2022.

[https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE\\_TYPE=BlastSearch&LINK\\_LOC=blasthome](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome)

# **Annexes**

## Annex 01 : Exemple d'une séquence nucléotidique dans la base de données GenBank

National Library of Medicine  
National Center for Biotechnology Information
Connexion

Nucléotide
Nucléotide
Recherche
Aider

GenBanque Envoyer à: ▾

**Terfezia aff. olbiensis TLO-3 voucher MA:FU 55434 clone ter57\_02**  
**Gène ARN ribosomal 18S, séquence partielle; espaceur transcrit interne 1, gène de l'ARN ribosomal 5.8S et espaceur transcrit interne 2, séquence complète ; et gène de l'ARN ribosomal 28S, séquence partielle**

GenBank : HQ698121 .1  
[Graphiques](#) [FASTA](#)

[Aller à:](#) ☺

LOCUS HQ698121 665 bp ADN linéaire PLN 27-SEP-2011  
 DÉFINITION Terfezia aff. olbiensis TLO-3 bon MA:FU 55434 clone ter57\_02  
 gène de l'ARN ribosomal 18S, séquence partielle ; interne transcrit espaceur 1, gène de l'ARN ribosomal 5.8S et espaceur interne transcrit 2, séquence complète ; et gène de l'ARN ribosomal 28S, séquence partielle.  
 ADHÉSION HQ698121  
 MODÈLEHQ698121.1  
 MOTS CLÉS .  
 SOURCE Terfezia aff. olbiensis TLO-3  
 ORGANISME [Terfezia aff. olbiensis TLO-3](#)  
 Eucaryote; champignons; Dikarya ; Ascomycota ; Pezizomycotina; Pézizomycètes ; Pézizales ; Pézizacées; Terfezia.  
 REFERENCE 1 (bases 1 à 665)  
 AUTEURS Kovacs,GM, Balazs,TK, Calonge,FD et Martin,MP  
 TITRE La diversité des truffes du désert de Terfezia : de nouvelles espèces et une complexe d'espèces variables avec ADNnr intrasporocarpique ITS hétérogénéité  
 REVUE Mycologie 103 (4), 841-853 (2011)[Publié](#)  
 21289106  
 REFERENCE 2 (bases 1 à 665)  
 AUTEURS Kovacs, GM  
 TITRE Soumission directe  
 JOURNAL Soumis (09-DEC-2010) Département d'anatomie végétale, Eotvos Lorand Université, Institut de biologie, Pazmany Peter Setany 1/C, Budapest 1117, Hongrie  
 CARACTÉRISTIQUES Localisation/  
 Source des qualificatifs 1..665  

```

/organism="Terfezia aff. olbiensis TLO-3"
/mol_type="ADN génomique"
/isolation_source="sol sablonneux"
/specimen_voucher="MA :FU 55434"
/db_xref="taxon : 1089474 "
/clone="ter57_02"
/tissue_type="ascome séché"
/country="Espagne : Valladolid, Sieteiglesias De Trabanco"
/collection_date="19-mai-2003"
/note="plantes voisines : Quercus sp.
groupe : TLO-3"
ARNr
<1..68
/misc_ARN
69..265
ARNr
/product="espaceur transcrit interne 1"
266..420
ARNr
/product="ARN ribosomal 5.8S"
421..608
/misc_RNA
/product="espaceur transcrit interne 2"
609..>665
ARNr
/product="ARN ribosomal 28S"

```

ORIGINE  

```

1 cttggtcatt tagaggaagt aaaagtcgta acaagggttc cgtagggtgaa cctgcggaag
61 gatcattact gaaaaactat tttcaagttt ttatataccc attgtttact taccctgttg
121 cttccactgg acagatttca tcatgtgtgg gatcttttgg cttgtgtgta taatacttgc
181 caaagagttt gccagtggca agatTTTTTT ttaccaaAAC ttgattaaaa aacacattgt
241 ctgaatata ttttgaatg aaaaaaaact ttcaacaacg gatcctctagg ctcttgcattc
301 gatgaagaac gcagtgaaat gcgataagta atgtgaattg cagaatctcg tgaatcattg
361 aatctttgaa cgcacattgc gccctatggt attcctgtagg gcagtgcctgt ctgagcgtca
421 gctccccctc actcaagtat ttcttttatg ttatacttgg aatgcttttg agacgtaact
481 agttaatcgt taccctcag aaattcatag gcagtatggt ttgaccttga actagacgta
541 ataataataa aatcgtttgt ttgggtatga ctgtccttgc cttaactcca ccaattcttt
601 acTTTgggtg acctcagatc aggtagggat acccgtgtaa cttaagcata tcaataagcg
661 gagga

```

**Modifier la région affichée** ▾

**Personnaliser la vue** ▾

**Analysez cette séquence** ▾  
 Exécutez BLAST  
 Choisissez des amorces  
 Mettre en surbrillance les fonctionnalités de la séquence  
 Trouver dans cette séquence

**Informations connexes** ▾  
 PubMed  
 Taxonomie  
 BioCollections

**LinkOut vers des ressources externes** ▾  
 SH1510504.08FU [UNIR]

**Activité récente** ▾  
Éteindre Dégager  
 Terfezia aff. olbiensis TLO-3 bon MA:FU 55434 clone ter57\_0 Nucléotide  
 >GBPEZ1725-13 OU Terfezia aff. olbiensis TLO-3 OU SON OU Nucléotide  
 Syndrome parkinsonien induit par MPTP - Neurochimie de base  
Voir plus...

**Annexe 03 : Résultat de multi-rate Poisson Tree Processes-mPTP**

```
Command : /bin/mptp mptp ml multi outgroup GBPEZ2717-15-Terfezia-sp-ITS
outgroup_crop tree_file/uploads/adl20hr6v0ehvcthbdlu47sc97.newick
output_file/uploads/adl20hr6v0ehvcthbdlu47sc97.1
Number of edges greater than minimum branch length: 82 / 190
Null-model score: 323.215225
Best score for multi coalescent rate: 323.215225
Number of delimited species:9
```

**Species 1:**

GBPEZ2709-15-Terfezia-boudieri-AF092097  
GBPEZ1209-13-Terfezia-boudieri-FN395016

**Species 2:**

GBPEZ1777-13-Terfezia-arenaria-HQ698069  
GBPEZ1780-13-Terfezia-arenaria-HQ698066  
GBPEZ1778-13-Terfezia-arenaria-HQ698068  
GBPEZ1779-13-Terfezia-arenaria-HQ698067  
GBPEZ1781-13-Terfezia-arenaria-HQ698065

**Species 3:**

GBPEZ1775-13-Terfezia-claveryi-HQ698071  
GBPEZ1772-13-Terfezia-claveryi-HQ698074

**Species 4:**

GBPEZ1767-13-Terfezia-claveryi-HQ698079  
GBPEZ1763-13-Terfezia-claveryi-HQ698083  
GBPEZ1760-13-Terfezia-claveryi-HQ698086  
GBPEZ1766-13-Terfezia-claveryi-HQ698080  
GBPEZ1765-13-Terfezia-claveryi-HQ698081  
GBPEZ1776-13-Terfezia-claveryi-HQ698070  
GBPEZ1769-13-Terfezia-claveryi-HQ698077  
GBPEZ1762-13-Terfezia-claveryi-HQ698084  
GBPEZ1761-13-Terfezia-claveryi-HQ698085  
GBPEZ1764-13-Terfezia-claveryi-HQ698082  
GBPEZ1770-13-Terfezia-claveryi-HQ698076  
GBPEZ2710-15-Terfezia-claveryi-GQ888690  
GBPEZ1768-13-Terfezia-claveryi-HQ698078  
GBPEZ1773-13-Terfezia-claveryi-HQ698073  
GBPEZ1774-13-Terfezia-claveryi-HQ698072  
GBPEZ1771-13-Terfezia-claveryi-HQ698075

**Species 5:**

GBPEZ1746-13-Terfezia-alsheikhii-HQ698100  
GBPEZ1748-13-Terfezia-alsheikhii-HQ698098  
GBPEZ1747-13-Terfezia-alsheikhii-HQ698099

**Species 6:**

GBPEZ1730-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698116  
GBPEZ1732-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698114  
GBPEZ1731-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698115  
GBPEZ1735-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698111  
GBPEZ1734-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698112  
GBPEZ1712-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698134  
GBPEZ1743-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698103

**Species 7:**

GBPEZ1701-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698145  
GBPEZ1700-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698146  
GBPEZ1744-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698102  
GBPEZ1699-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698147

GBPEZ2713-15-Terfezia-olbiensis-HM056224  
GBPEZ340-13-Terfezia-trappei-AF276677  
GBPEZ341-13-Terfezia-trappei-AF276676  
GBPEZ2711-15-Terfezia-fanfani-HM056215  
GBPEZ1697-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698149  
GBPEZ1727-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698119  
GBPEZ1714-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698132  
GBPEZ1733-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698113  
GBPEZ1757-13-Terfezia-leptoderma-HQ698089  
GBPEZ1756-13-Terfezia-leptoderma-HQ698090  
GBPEZ1754-13-Terfezia-leptoderma-HQ698092  
GBPEZ1752-13-Terfezia-leptoderma-HQ698094  
GBPEZ1753-13-Terfezia-leptoderma-HQ698093  
GBPEZ1750-13-Terfezia-leptoderma-HQ698096  
GBPEZ1755-13-Terfezia-leptoderma-HQ698091  
GBPEZ1758-13-Terfezia-leptoderma-HQ698088  
GBPEZ1749-13-Terfezia-leptoderma-HQ698097  
GBPEZ1759-13-Terfezia-leptoderma-HQ698087  
GBPEZ2712-15-Terfezia-fanfani-HM056216  
GBPEZ1751-13-Terfezia-leptoderma-HQ698095

**Species 8:**

GBPEZ2716-15-Terfezia-sp-HM056211

**Species 9:**

GBPEZ1745-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698101  
GBPEZ1722-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698124  
GBPEZ1723-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698123  
GBPEZ1698-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698148  
GBPEZ1726-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698120  
GBPEZ1704-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698142  
GBPEZ1703-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698143  
GBPEZ1721-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698125  
GBPEZ1725-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698121  
GBPEZ1705-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698141  
GBPEZ1724-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698122  
GBPEZ1720-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698126  
GBPEZ1717-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698129  
GBPEZ1715-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698131  
GBPEZ1716-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698130  
GBPEZ1718-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698128  
GBPEZ1719-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698127  
GBPEZ1711-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698135  
GBPEZ1707-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698139  
GBPEZ1709-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698137  
GBPEZ1708-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698138  
GBPEZ1710-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698136  
GBPEZ1706-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698140  
GBPEZ1741-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698105  
GBPEZ1736-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698110  
GBPEZ1738-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698108  
GBPEZ1739-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698107  
GBPEZ1737-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698109  
GBPEZ1713-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698133  
GBPEZ2715-15-Terfezia-sp-HM056210  
GBPEZ1740-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698106  
GBPEZ1728-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698118  
GBPEZ1729-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698117  
GBPEZ1702-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698144  
GBPEZ2714-15-Terfezia-sp-DQ386140  
GBPEZ1742-13-Terfezia-aff-olbiensis-HQ698104

**Annexe 04: Résultat de Assemble Species by Automatic Partitioning-ASAP**

Partition 1

Score:one

Proba: 6.526946e-01

nb groups : 9 (7)

**Group[ 1 ] n: 2 ;id:**

GBPEZ1209-13|Terfezia boudieri FN395016

GBPEZ2709-15|Terfezia boudieri AF092097

**Group[ 2 ] n: 24 ;id:**

GBPEZ1697-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698149

GBPEZ2711-15|Terfezia fanfani HM056215

GBPEZ1727-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698119

GBPEZ1714-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698132

GBPEZ341-13|Terfezia trappei AF276676

GBPEZ1733-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698113

GBPEZ1699-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698147

GBPEZ1744-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698102

GBPEZ2713-15|Terfezia olbiensis HM056224

GBPEZ340-13| Terfezia trappei AF276677

GBPEZ1701-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698145

GBPEZ1700-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698146

GBPEZ1749-13|Terfezia leptoderma HQ698097

GBPEZ1750-13|Terfezia leptoderma HQ698096

GBPEZ1751-13|Terfezia leptoderma HQ698095

GBPEZ1752-13|Terfezia leptoderma HQ698094

GBPEZ1754-13|Terfezia leptoderma HQ698092

GBPEZ1756-13|Terfezia leptoderma HQ698090

GBPEZ1758-13|Terfezia leptoderma HQ698088

GBPEZ1759-13|Terfezia leptoderma HQ698087

GBPEZ1753-13|Terfezia leptoderma HQ698093

GBPEZ1755-13|Terfezia leptoderma HQ698091

GBPEZ2712-15|Terfezia fanfani HM056216

GBPEZ1757-13|Terfezia leptoderma HQ698089

**Group [3] n: 36; id:**

GBPEZ1702-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698144

GBPEZ1729-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698117

GBPEZ2714-15|Terfezia sp.DQ386140

GBPEZ1742-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698104

GBPEZ1728-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698118

GBPEZ1737-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698109

GBPEZ1740-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698106

GBPEZ1713-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698133

GBPEZ2715-15|Terfezia sp.HM056210

GBPEZ1715-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698131

GBPEZ1716-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698130

GBPEZ1719-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698127

GBPEZ1717-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698129

GBPEZ1718-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698128

GBPEZ1738-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698108

GBPEZ1739-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698107

GBPEZ1741-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698105

GBPEZ1736-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698110

GBPEZ1704-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698142

GBPEZ1726-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698120

GBPEZ1698-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698148

GBPEZ1722-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698124

GBPEZ1723-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698123

GBPEZ1720-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698126  
GBPEZ1705-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698141  
GBPEZ1724-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698122  
GBPEZ1703-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698143  
GBPEZ1725-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698121  
GBPEZ1721-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698125  
GBPEZ1745-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698101  
GBPEZ1708-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698138  
GBPEZ1709-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698137  
GBPEZ1711-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698135  
GBPEZ1710-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698136  
GBPEZ1706-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698140  
GBPEZ1707-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698139

**Group[ 4 ] n: 1 ;id:**

GBPEZ2716-15|Terfezia sp. HM056211

**Group[ 5 ] n: 7 ;id:**

GBPEZ1712-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698134  
GBPEZ1731-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698115  
GBPEZ1743-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698103  
GBPEZ1730-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698116  
GBPEZ1732-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698114  
GBPEZ1734-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698112  
GBPEZ1735-13|Terfezia aff.olbiensis HQ698111

**Group[ 6 ] n: 3 ;id:**

GBPEZ1746-13|Terfezia alsheikhii HQ698100  
GBPEZ1747-13|Terfezia alsheikhii HQ698099  
GBPEZ1748-13|Terfezia alsheikhii HQ698098

**Group[ 7 ] n: 16 ;id:**

GBPEZ1760-13|Terfezia claveryi HQ698086  
GBPEZ1761-13|Terfezia claveryi HQ698085  
GBPEZ1766-13|Terfezia claveryi HQ698080  
GBPEZ1768-13|Terfezia claveryi HQ698078  
GBPEZ1770-13|Terfezia claveryi HQ698076  
GBPEZ1771-13|Terfezia claveryi HQ698075  
GBPEZ1764-13|Terfezia claveryi HQ698082  
GBPEZ1773-13|Terfezia claveryi HQ698073  
GBPEZ1774-13|Terfezia claveryi HQ698072  
GBPEZ2710-15|Terfezia claveryi GQ888690  
GBPEZ1765-13|Terfezia claveryi HQ698081  
GBPEZ1762-13|Terfezia claveryi HQ698084  
GBPEZ1767-13|Terfezia claveryi HQ698079  
GBPEZ1769-13|Terfezia claveryi HQ698077  
GBPEZ1763-13|Terfezia claveryi HQ698083  
GBPEZ1776-13|Terfezia claveryi HQ698070

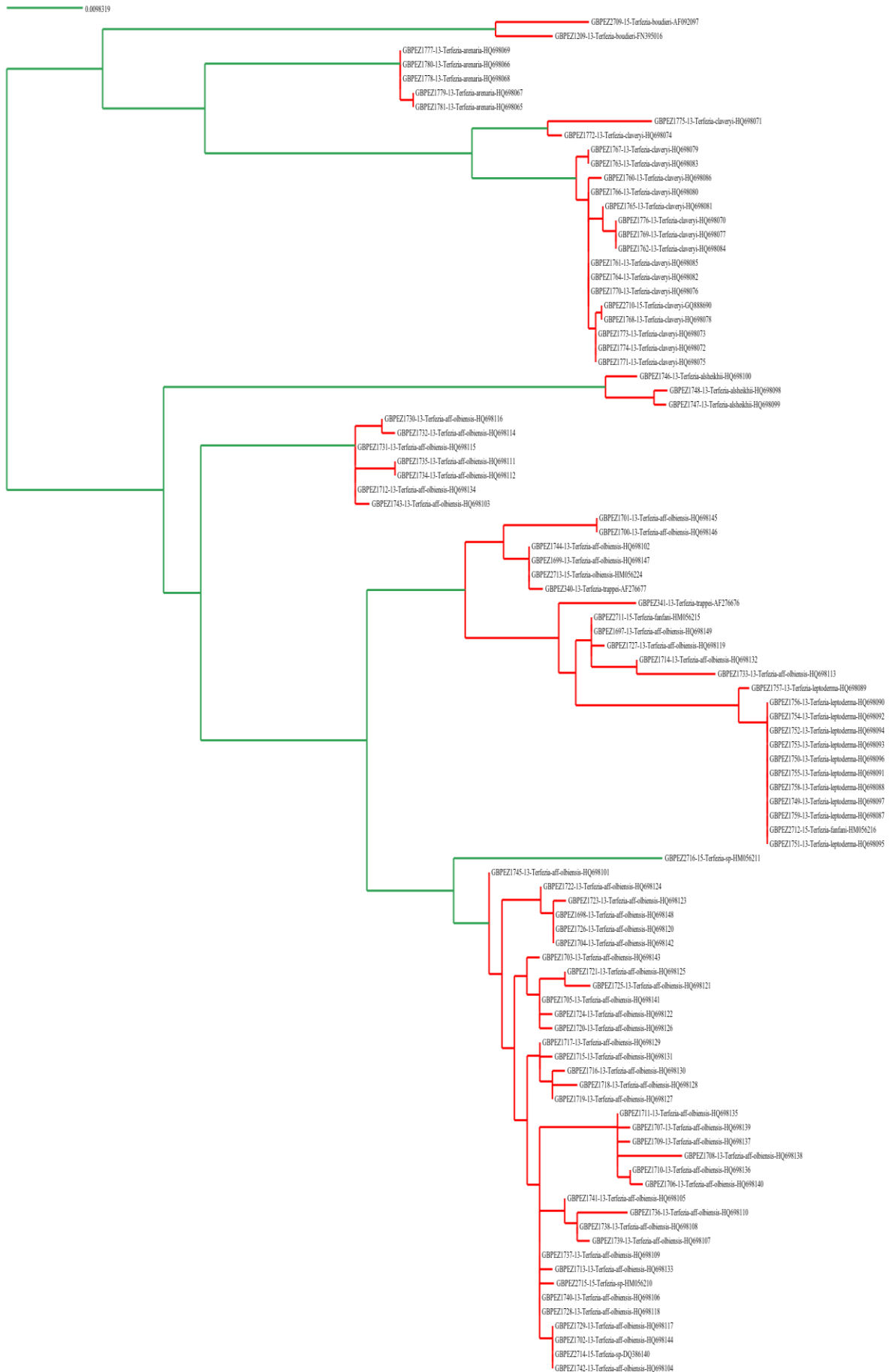
**Group[ 8 ] n: 2 ;id:**

GBPEZ1772-13|Terfezia claveryi HQ698074  
GBPEZ1775-13|Terfezia claveryi HQ698071

**Group[ 9 ] n: 5 ;id:**

GBPEZ1777-13|Terfezia arenaria HQ698069  
GBPEZ1778-13|Terfezia arenaria HQ698068  
GBPEZ1780-13|Terfezia arenaria HQ698066  
GBPEZ1781-13|Terfezia arenaria HQ698065  
GBPEZ1779-13|Terfezia arenaria HQ698067

Annexe 05 : L'arbre de la délimitation par la méthode mPTP.





## المخلص

الرمز الشريطي الجيني هو أداة لتحديد وتصنيف الأنواع غير المعروفة أو لتحديد عينة فيما يتعلق بقاعدة البيانات. ركزت هذه الدراسة على التصنيف الجزيئي لـ *Terfez* وبناء شجرة التكوين العرقي لتسلسلات جنس *Terfezia* على عدة مراحل، وتم محاذاة تسلسلنا باستخدام خوارزمية MUSCLE الموجودة في برنامج MEGA 11، وتم بناء شجرتنا الوراثية من خلال منصة NG-phylogeny باستخدام ML تنقسم التسلسلات في شجرة الوراثة العرقية إلى تسعة مجموعات رئيسية، وقد تم تأكيد هذا التصنيف من خلال طريقتي ترسيم الأنواع (ASAP و mPTP).

الكلمات المفتاحية: الرمز الشريطي للحمض النووي، شجرة التطور *Terfezia*، ITS، MEGA، ASAP، mPTP.

## Résumé

Le code-barres moléculaire est un outil d'identification et de classification des espèces inconnues ou d'identification d'un échantillon par rapport à la base de données. Cette étude a porté sur la classification moléculaire de *Terfez* et la construction de l'arbre phylogénétique des séquences du genre *Terfezia* à travers plusieurs étapes, les séquences téléchargées des bases de données ont été alignées en utilisant l'algorithme MUSCLE trouvé dans le logiciel MEGA 11, et notre arbre phylogénétique a été construit à travers la plateforme NG-phylogeny par la méthode du maximum de vraisemblance (ML). Les séquences sont réparties dans l'arbre phylogénétique en neuf clades principaux, et cette classification a été confirmée par les deux méthodes de délimitation des espèces (mPTP et ASAP).

**Mots clés :** Code-barre ADN, arbre phylogénétique, *Terfezia*, ITS, MEGA, ASAP, mPTP.

## Abstrat

The molecular barcode is a tool for identification and classification of unknown species or for identification of a sample against the database. This study focused on the molecular classification of *Terfez* and the construction of the phylogenetic tree of the sequences of the genus *Terfezia* through several steps, the sequences downloaded from the databases were aligned using the MUSCLE algorithm found in MEGA 11 software, and our phylogenetic tree was constructed through the NG-phylogeny platform by the maximum likelihood (ML) method. The sequences are partitioned in the phylogenetic tree into nine main clades, and this classification was confirmed by the two species delimitation methods (mPTP and ASAP).

**Key words:** DNA barcode, phylogenetic tree, *Terfezia*, ITS, MEGA, ASAP, mPTP.