

**Camille Clerissi  
Johan Ramsayer  
Antoine Jorcin**

**Avril 2007**

**Mise en place d'un protocole pour l'établissement du  
caryotype de *Saga pedo***

## **Introduction**

Fascinés par les insectes nous nous sommes penchés ici sur la mythique Magicienne dentelée, cette sauterelle connue sous le nom scientifique de *Saga pedo*.

Cet orthoptère, qui figure parmi les plus grands insectes d'Europe, occupe les esprits des entomologistes depuis des décennies. En effet, on a longtemps cherché le mâle de cette espèce réputée pour n'être représentée que par des populations femelles se reproduisant par parthénogénèse.

R. Matthey a démontré dans les années quarante qu'elle est tétraploïde, formule chromosomique souvent associée à la reproduction parthénogénétique, et que cette parthénogénèse est géographique. Mais dans une note de 1946 il fait le bilan des connaissances et dresse les questions qu'il reste à résoudre à propos de *Saga pedo* : « Quelle était la forme ancestrale? Celle-ci existe-t-elle encore? Se rencontre-t-il une race parthénogénétique diploïde? »

Puis la découverte d'un individu mâle en octobre 2005 en Suisse relance les questionnements : ce mâle est-il issu d'un « accident génétique » ou appartient-il à une population « souche » à reproduction sexuée?\*

C'est au cours d'un entretien avec Christophe Bernier que nous avons pris conscience que la tétraploïdie de cette sauterelle n'était avérée que pour les populations Suisses que Matthey a étudiées et que la question de la formule chromosomique des populations du sud de la France intéresse les naturalistes qui n'ont malheureusement pas aisément accès aux techniques de caryotypage. Ainsi ayant l'opportunité de monter un projet de recherche durant notre troisième année de licence et ayant par ce biais accès à des laboratoires appropriés, nous avons décidé d'entreprendre la réalisation du caryotype des *Saga pedo* françaises.

## **Matériels et méthodes**

Les premiers essais d'observations chromosomiques furent effectués sur un modèle proche de *Saga pedo* en ce qui concerne la reproduction. Il s'agit d'un phasme d'élevage à parthénogénèse thélytoque: *Carausius morosus*, fourni par Thierry Noëll. Après une injection directe dans l'abdomen et une durée d'action de 3h35 d'un antimitotique (Colchicine à 0,05%), les ovaires, des œufs et les ganglions cérébroïdes sont prélevés, écrasés et déposés dans une solution hypotonique pendant 15 minutes à température ambiante. Puis après une série de centrifugation avec ajout du fixateur, l'étalement sur lame nous donna des résultats décevants, les stades observés étant des prophases.

Ceci nous mena à faire des essais sur une sauterelle: *Tettigonia viridissima*, plus proche des *Saginae* d'un point de vue phylogénétique. Par la même occasion nous avons voulu tester: (i) l'efficacité de la Colchicine, en faisant des essais sans et avec son injection, en augmentant dans ce dernier cas, à 6h sa durée d'action afin d'accroître la probabilité d'observer des divisions en métaphase; (ii) et l'emploi ou non de la solution hypotonique, qui devrait normalement faciliter l'observation des chromosomes par son action de gonflement des cellules.

Les individus à disposition étant des larves mesurant environ 1,5 cm de long, il nous était impossible de choisir un tissu particulier pour l'étude des chromosomes. Donc après avoir effectué une boutonnière à l'extrémité de l'abdomen, une pression sur le corps de l'animal (ayant reçu l'injection de Colchicine ou non) permet de récupérer son contenu et de le transférer soit dans la solution hypotonique, soit directement dans le fixateur.

Les résultats obtenus, avec injection de Colchicine et récupération du matériel dans la solution hypotonique étant les plus satisfaisants, nous avons décidé d'appliquer ce protocole sur un individu

---

\* Pour plus de détails lire : Bernier, C. (Coord.), 2006. Synthèse 2005 de l'enquête nationale sur la Magicienne dentelée *Saga pedo* (Pallas, 1771)

<http://www.onem-france.org/saga/wakka.php?wiki=Saga2005T>

de l'espèce *Saga pedo* se trouvant au second stade larvaire (le corps mesurant 2 cm de long), trouvé le 7 avril 2007 à St Jean de Cuculles par Antoine Jorcin.

Le matériel le plus adéquat à l'étude des chromosomes est représenté par les cellules épithéliales folliculaires (car les mitoses y sont nombreuses), parmi lesquelles il est assez facile de trouver bon nombre de métaphases nécessaires à une analyse fouillée (Matthey, 1941). Cependant, comme pour les larves de *Tettigonia*, la taille de l'individu possédé ne permettait pas de sélectionner un tissu particulier sur lequel l'étude allait se porter.

### Protocole expérimental :

- Injection de 0,1 mL de Colchicine à 0,05% avec une durée d'action de 3h30.
- Pression sur l'abdomen, récupération du matériel dans une coupelle contenant la solution hypotonique (« insectes »= 50% Saline 8,5‰ + 50% H<sub>2</sub>O).
- Ecraser à la pince et laisser incuber pendant 20' à température ambiante.
- Transférer 7 mL dans un tube conique de 15 mL et compléter à 12 mL avec le fixateur (3 p. Méthanol/ 1p. Acide Acétique glacial).
- Centrifuger 5' à 1200 tr/min, jeter le surnageant et ajouter 4 mL de fixateur (X 2)
- Etalement sur lame froide, séchage à la flamme, et coloration 4' au Giemsa 4%.

Les lames ont été observées au grossissement 1000 sur un microscope équipé d'un dispositif de capture d'image. Les photos des divisions cellulaires de *Saga pedo* ont été prises à l'aide d'un compact numérique directement à travers l'oculaire (la caméra du microscope étant tombée en panne). Les caryotypes ont été réalisés à partir de ces photos à l'aide du logiciel Gimp.

### Résultats

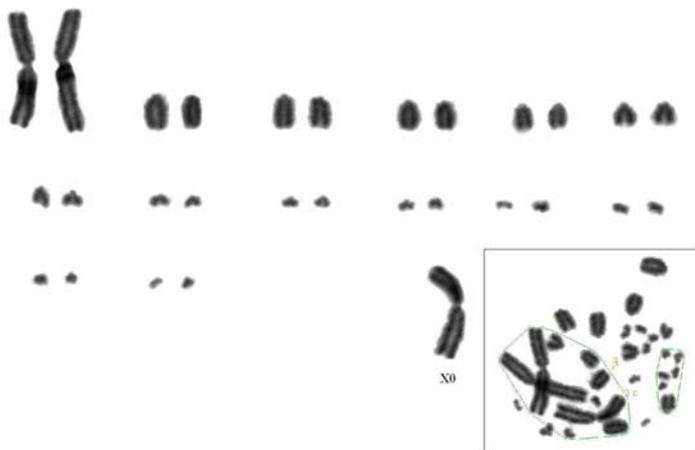
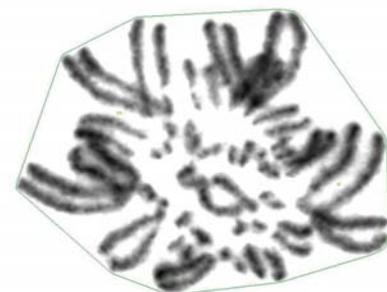
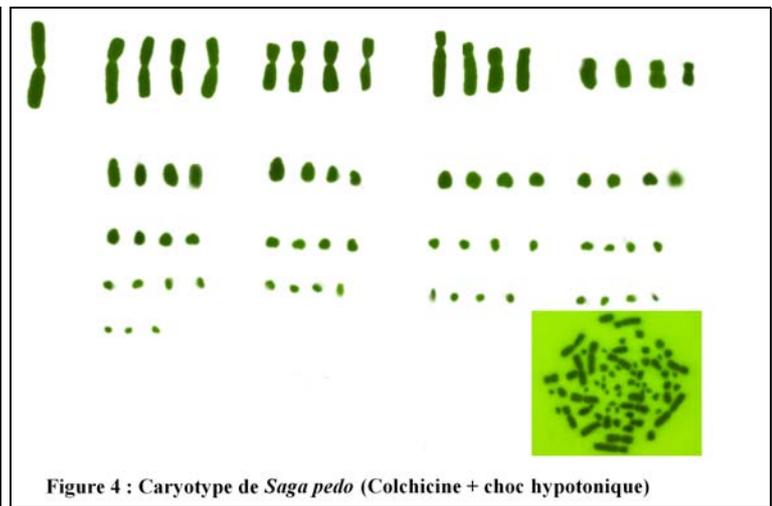
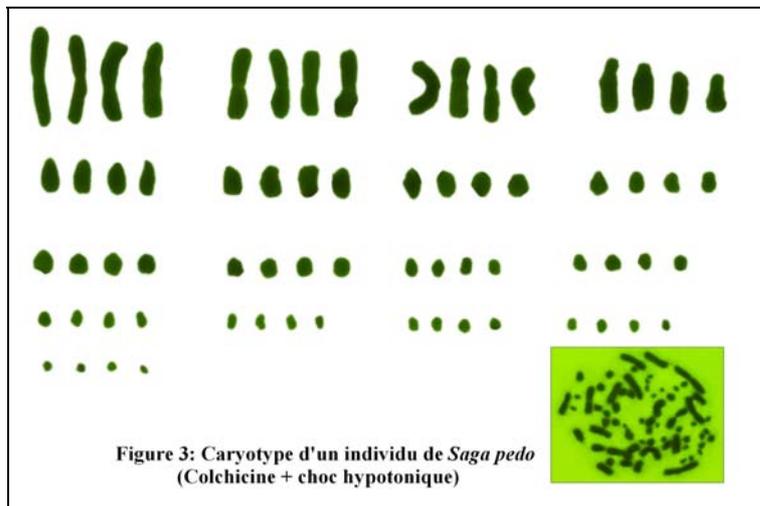


Figure 1 : caryotype d'un mâle de *Tettigonia viridissima* (Colchicine + choc hypotonique)



2 : Fin de métaphase de mitose de *Tettigonia viridissima* femelle (XX) (choc hypotonique)

Le caryotype de *Tettigonia viridissima* est composé de  $2n\♂=29(X0)$  et  $2n\♀=30(XX)$  chromosomes. Les autosomes peuvent être divisés en trois groupes de taille : un long (L1) métacentrique, cinq moyens (M2-M6) et huit courts (S7-S14) acrocentriques, et un chromosome X métacentrique étant légèrement plus petit que L1. Cette observation correspond aux résultats connus (E. Warchalowska-Sliwa, 1995).



Le caryotype de *Saga pedo* est composé de 68 chromosomes. L'étude de leur taille et de leur forme permet de les regrouper par quatre ; on observe donc trois groupes de quatre chromosomes métacentriques, deux groupes de quatre chromosomes sub-métacentriques et quarante-huit chromosomes acrocentriques (douze groupes de quatre).

La figure 4 présente un caryotype particulier avec un grand chromosome métacentrique isolé et un petit acrocentrique manquant, mais qui est également constitué de 68 chromosomes.

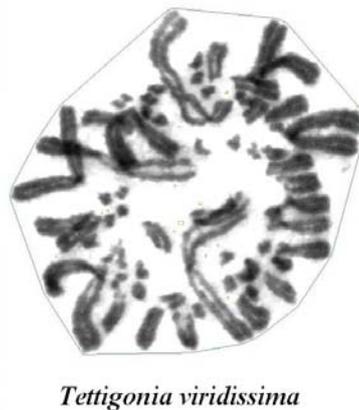
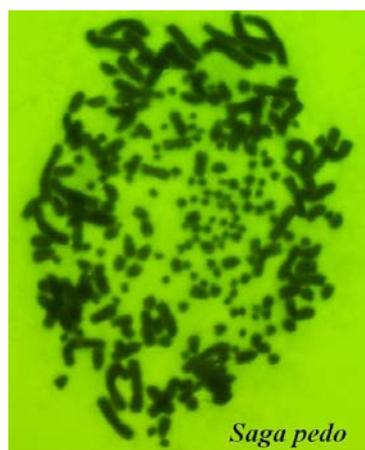


Figure 5 : Polyploïdie somatique sur nos deux modèles

On observe ici 4n chromosomes chez une femelle de *Tettigonia* et au moins 8n chez *Saga*.

### Discussion

Nous observons 29 chromosomes chez *Tettigonia viridissima* qui est une espèce diploïde. De plus nous savons que le nombre de chromosomes chez les Tettigoniidae est compris entre 15 et 37 (Warchowska Sliwa, 1998), et le nombre fondamental (nombre de bras = 2\* (nombre de métacentriques + submétacentriques)+ nombre d'acrocentriques) est compris entre 19 et 46. Chez *Saga pedo* on a 68 chromosomes, que l'on peut facilement regrouper par quatre, pour un nombre fondamental d'au moins 88. Ces observations nous amènent à penser, tel que l'avait fait Matthey en 1948, que cette espèce est tétraploïde.

Il nous a paru intéressant de présenter des résultats inattendus:

- Le chromosome isolé de la figure 4 provient-il d'une cellule voisine, il se serait alors déposé à cet endroit lors de l'étalement sur la lame ? Il est peu probable que ce soit le cas, car la

chromatine de tous ces chromosomes, même celui sans homologues, est au même stade de condensation ; ce qui semble signifier qu'ils appartiennent à la même cellule. Nous restons sans réponse face à cette particularité, mais Matthey (1941) a déjà décrit des anomalies ponctuelles comparables.

- Pour nos deux modèles, d'autres cellules montrent un nombre plus important de chromosomes, pouvant aller jusqu'à 180 chez *Saga pedo* (figure 5). La polypléidie somatique est un phénomène fréquent chez les insectes, il n'a donc pas été rare d'observer des cellules à  $n*4n$  chromosomes chez *Saga* et à  $n*2n$  chez *Tettigonia*.

## **Conclusion**

Notre travail de mise au point d'un protocole de caryotype adapté à *Saga pedo* est concluant. Notre essai sur un unique individu nous apporte un début de connaissances sur les populations françaises: il semble qu'à l'instar des populations suisses, les *Saga pedo* du Sud de la France soient tétraploïdes avec  $4n = 68$ . Il faudrait cependant élargir cette étude à un plus grand nombre d'individus afin d'étayer cette conclusion ou bien de déceler plusieurs races chromosomiques isolées les unes des autres du fait de la reproduction parthénogénétique.

## **Remerciements**

Nous tenons à remercier Thierry Noël pour les phasmes, Christophe Bernier des Ecologistes de l'Euzière pour ses conseils, Delphine Bonnet pour son soutien et ses conseils, et à l'ISEM (Département BEE) Janice Britton-Davidian et tout particulièrement Josette Catalan pour son aide technique et pour le temps précieux qu'elle nous a consacré.

## **Bibliographie**

Bernier, C. (Coord.), 2006. Synthèse 2005 de l'enquête nationale sur la Magicienne dentelée *Saga pedo* (Pallas, 1771)

Matthey, R., 1941. Étude biologique et cytologique de *Saga pedo* Pallas (Orthoptera - Tettigoniidae). *Revue suisse de Zoologie*, 48 (2) : 91-142

Matthey, R., 1946. Démonstration du caractère géographique de la parthénogenèse de *Saga pedo* Pallas et de sa polypléidie, par comparaison avec les espèces bisexuées *S. ephippigera* et *S. gracilipes*. *Experientia*, 2 (7) : 1-3

Matthey, R., 1948. Données nouvelles sur les chromosomes des Tettigonides et la parthénogenèse de *Saga pedo* Pallas. *Revue suisse de Zoologie*, 55 (2) : 45-56

Warchalowska-Sliwa, E. & Maryanska-Nadachowska, A., 1995. Cytogenetic studies of the Genus *Tettigonia* (Orthoptera, Tettigonioidae, Tettigoniinae) I. C-bands and NORs Activity. *Folia biologica (Krakow)*, 43 (1-2) : 29-34

Warchalowska-Sliwa, E., 1998. Karyotype characteristics of Katydid Orthopterans (Ensifera, Tettigoniidae), and remarks on their evolution at different taxonomic levels. *Folia biologica (Krakow)*, 46(3-4) : 143-176

