



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

Domaine : Sciences de la nature et de la vie

Filière : Sciences biologiques

Spécialité : Biochimie appliquée

Réf. :

MÉMOIRE DE MASTER

Présenté soutenu par : **Amira LAIHI et Ahlem HANNACHI**

Le : 10 octobre 2020.

Thème

DNA barcoding de *Sphingonotus rubescens* (Orthoptera: Acrididae) des régions de Biskra et Adrar, Algérie.

Jury :

Mme. Asma MEDDOUR	MAA	Université de Biskra	Président
Mme. Fatiha BENGUERAICHI	MAA	Université de Biskra	Rapporteur
Mme. Djamila MOKRANI	MAA	Université de Biskra	Examineur

Année universitaire : 2019 – 2020

• Remerciements

Avant tout nous remercions Allah le tout puissant,

De nous avoir guidées tout au long de nos années d'études

Et de nous avoir donné la volonté, la patience

Et le courage pour achever ce travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements

Les plus cordiaux et notre vive reconnaissance à notre encadreur

Fatiha BENGUERAICHI a bien voulu accepter de diriger ce travail,

Pour son encouragement, ses conseils précieux, sa disponibilité,

Ses suggestions pertinentes, ses critiques constructives

Et pour sa patience tout au long de ce projet et sans lesquels,

Ce travail n'aurait pu aboutir.

Nous remercions les membres du jury, d'avoir accepté

D'évaluer ce mémoire. Enfin, nous remercions tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

Nous exprimons nos sincères remerciements

À Monsieur le Pr MOUSSI Abdelhamid et à

Monsieur le Dr Soudani Abderrahmane,

Qui nous ont fourni le matériel biologique nécessaire pour réaliser cette étude.

Nous adressons nos plus vifs remerciements à

M Mohammed SOTRI, qui nous a fournis de l'azote liquide et nous a permis de travailler dans son laboratoire.

• Dédicace

Je dédie ce mémoire à mes très chers parents
qui sont toujours dans mon cœur, qui ont consacré leur vie à mon éducation et ma réussite,
qui m'ont encouragé dans les moments les plus difficiles de ma vie.
Que Dieu les garde et les protège pour nous.

Table des matières

Remerciements

Dédicace

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

Première Partie. Synthèse Bibliographique

Chapitre 1. Identification moléculaire

1.1. Généralité sur la taxonomie	3
1.2. Concept morphologique de l'espèce	3
1.3. Concept phylogénétique de l'espèce	4
1.4. Barcode moléculaire : nouvel outil d'identification taxonomique ?	5
1.4.1. Définition	5
1.4.2. Pourquoi utiliser le barcoding en Taxonomie ?.....	6
1.5. Choix du marqueur moléculaire.....	7

Chapitre 2. *Sphingonotus rubescens*

2.1. Les Orthoptères.. ..	8
2.1.1. Ensifères (sauterelles et grillons).....	8
2.1.2. Caelifères (criquets).....	8
2.2. <i>Sphingonotus rubescens</i>	9
2.2.1. Généralité sur le genre <i>Sphingonotus</i>	9
2.2.2. Caractéristiques morphologiques.....	9
2.2.3. Identification	10
2.2.4. Habitat	11
2.2.5. Classification	11
2.2.6. Répartition géographique.....	12

Deuxième Partie. Partie Expérimentale

Chapitre 3. Matériel et Méthodes

3.1. Échantillonnage.....	15
3.2. Description des régions d'étude	15
3.3. Extraction d'ADN et séquençage de gène.....	16
3.3.1. Protocole d'extraction d'ADN selon H. Chen et <i>al.</i> , (2010) modifié.....	16

3.3.2. Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité.....	17
3.3.2.1. Estimation de la concentration de l'ADN par Nano Drop.....	17
3.3.2.2. Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose	18
3.3.3. Amplification du gène COI par PCR	19
3.3.3.1. Préparation du mélange réactionnel pour PCR.....	20
3.3.3.2. Déroulement de la PCR.....	20
3.3.3.3. Visualisation des fragments amplifiés.....	21
3.3.3.4. Elution et purification d'ADN.....	21
3.3.4. Séquençage.....	22
3.4. Assemblage et alignement des séquences.....	23
3.4.1. Correction de séquences.....	23
3.4.2. Alignement de séquences.....	24
3.4.3. Reconstruction phylogénique.....	25
Chapitre 4. Résultats et Discussion	
4.1. Protocole d'extraction d'ADN selon H. Chen et <i>al.</i> , (2010) modifié	26
4.2. Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité.....	26
4.2.1. Estimation de la concentration et de la pureté de l'ADN par Nano Drop.....	26
4.2.2. Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose.....	28
4.3. Amplification du gène COI par PCR.....	28
4.4. Séquençage	29
4.5. DNA barcoding.....	30
Conclusion.....	32
Références bibliographiques	33
Annexe	

Liste des tableaux

Tableau 01. Taxonomie de <i>Sphingonotus rubescens</i>	11
Tableau 02. Echantillons analysés.....	15
Tableau 03. Programme de PCR.....	21
Tableau 04. Concentration d'ADN extrait et les ratios d'absorbance.....	27

.

Liste des photos

- Photo 01.** Photo représente les ensifères (A) et les caelifères (B).....**9**
- Photo 02.** Profil électrophorétique montrant l'intégrité de l'ADN génomique.....**28**
- Photo 03.** Profil électrophorétique montrant les fragments ciblés du gène COI obtenus par PCR.....**29**

Liste des figures

Figure 01. Morphologie générale d'un criquet.....	10
Figure 02. <i>Sphingonotus rubescens</i> walker, 1870 (Mâle et femelle : Espagne, Ténérife Las Canadas).....	11
Figure 03. Répartition de l'espèce <i>Sphingonotus rubescens</i> (Walker, 1870) dans le Monde selon Orthoptera Species File.....	12
Figure 04. Répartition de l'espèce <i>Sphingonotus rubescens</i> (Walker, 1870) en Algérie.....	13
Figure 05. Répartition de <i>Sphingonotus rubescens</i> (Walker, 1870) à Biskra et à Adrar.....	14
Figure 06. Etapes de préparation du gel d'agarose.....	18
Figure 07. Dispositif expérimentales de l'électrophorèse.....	19
Figure 08. Exemple de fichier .ab1 (la séquence du fragment de l'espèce <i>Sphingonotus rubescens</i> A) ouvert avec le logiciel DNA Baser Assembler.....	23
Figure 09. Exemple de création de séquence consensus avec BioEdit.....	24
Figure 10. Alignement des séquences par BioEdit.....	25
Figure 11. Séquences de fragment du gène COI, A : sens et B : anti-sens.....	30
Figure 12. Arbre phylogénétique généré avec la méthode de maximum de vraisemblance (<i>Maximum Likelihood</i>) basé sur le fragment de gène COI.....	31

Liste des abbreviations

- **A:** absorbance
- **ADN:** Acide DésoxyriboNucléique
- **ARN:** Acide RiboNucléique
- **BOLD:** Barcode Of Life Database
- **CRBt:** Centre de Recherche en Biotechnologie (de Constantine)
- **CTAB:** Cetyl TrimethylAmmonium Bromure
- **COI:** Cytochrome Oxydase sous-unité I
- **EDTA:** Éthylène Diamine Tétracétique
- **IPBES:** Intergovernmental Science-Policy Platform on Biodiversity and Ecosystem Services
- **NCBI:** National Centre for Biotechnology Information
- **pb:** paire de bases
- **PCR:** Polymerase Chain Reaction
- **PNCRG:** Pediatric Neurocritical Care Research Group
- **SDS:** Sodium DodecylSulfate
- **U.V:** UltraViolet

Introduction

Introduction

Les chiffres qui concernent la classe des insectes sont astronomiques. Selon les experts, les estimations globales du nombre d'espèces d'insectes varient entre cinq et dix millions, voire même trente millions, de par le monde. Nous voilà en présence des champions incontestés de la biodiversité ! À ce jour, seules 950000 espèces sont connues. 7 000 nouvelles espèces sont découvertes chaque année, tandis que 17500 à 35000 autres s'éteignent à tout jamais, la plupart avant même d'être découvertes. La biodiversité décline de manière irrémédiable, un million d'espèces animales et végétales menacées d'extinction, soit une espèce sur 8 selon le premier rapport d'évaluation de l'IPEBS en 2019 (Rapport de la Plénière de la Plateforme intergouvernementale scientifique et politique sur la biodiversité et les services écosystémiques sur les travaux de sa septième session; Septième session Paris, 29 avril – 4 mai 2019).

La taxonomie s'est traditionnellement appuyée sur des traits morphologiques et écologiques pour interpréter et classer la diversité biologique, mais cette méthode d'identification présente plusieurs limites : (i) les espèces cryptiques peuvent être incorrectement identifiées en raison de la malléabilité phénotypique ; (ii) les taxons morphologiquement énigmatiques sont communs dans de nombreux groupes négligés par cette approche ; (iii) les clés morphologiques sont souvent limitées à des stades de vie particuliers, ce qui limite l'efficacité de l'identification et (iiii) un haut niveau de compétence est requis pour utiliser les clés afin d'éviter les erreurs d'identification (Naila *et al.*, 2014).

Face au déclin de la biodiversité et au manque de taxonomistes pour de nombreux groupes, le barcode moléculaire est devenu un outil important en biologie (Hebert *et al.*, 2003; Hebert et Gregory, 2005). Bien qu'il présente certains inconvénients, par exemple : le manque de détection hybride et les problèmes de pseudo-gènes, il représente toujours le seul moyen objectif de délimitation et d'identification des espèces. Ceci, combiné au besoin urgent de déterminer et de décrire rapidement les espèces, a généré plusieurs initiatives de codes-barres d'ADN locales (Moussi *et al.*, 2018). La première base de données des Caelifera Locustinae de la région de Biskra (Algérie) a été réalisée par Pr Moussi et ses collaborateurs.

Les Oedipodinae appartiennent aux taxons de criquets les plus divers avec 16 tribus, 136 genres et plus de 600 espèces actuellement décrites. Les membres des Oedipodinae sont répartis dans le monde, en particulier dans les zones tempérées et principalement dans les habitats arides et semi-arides. Habituellement, la plupart des espèces vivent dans des endroits à faible végétation et sont principalement xériques. Par conséquent, la faune Oedipodinae d'Afrique du Nord est spécifiquement diversifiée (Moussi *et al.*, 2018).

Malgré leur importance agro-économique et environnementale, la faune algérienne des Oedipodinae n'est pas complètement connue à ce jour. Actuellement, la faune algérienne des Oedipodinae comprend 53 espèces de 20 genres et sept tribus (Louveaux *et al.*, 2017). Cependant, le statut de nombre de ces espèces n'est pas clair et plus de diversité est à prévoir, en particulier dans des genres divers, peu étudiés et morphologiquement conservateurs tels qu'*Acrotylus* Fieber, 1853 et *Sphingonotus* Fieber, 1852.

Dans ce contexte, ce travail de mémoire vise à (i) contribuer à la construction de la base de données (code-barres d'ADN) des Oedipodinae en Biskra et Adrar et (ii) construire de l'arbre phylogénétique du genre *Sphingonotus* pour la classification moléculaire des individus collectés dans ces régions.

Première Partie.

Synthèse

Bibliographique

Chapitre 1.
Identification
moléculaire

1.1. Généralité sur la taxonomie

En biologie, l'art de classer les être vivants se nomme la systématique. L'art de décrire, d'identifier et de nommer se nomme la taxinomie, également écrit "taxonomie". Aujourd'hui, les deux termes se confondent. La classification des êtres vivants correspond à la systématique et à la taxinomie. De nombreuses classifications ont existées. Aujourd'hui, deux classifications s'affrontent, le premier est la plus ancienne, c'est la classification dite "classique". La deuxième, toute jeune, est dite "classification phylogénétique". Elle se base sur l'étude des gènes. La classification classique est organisée en rangs, appelés taxons. Ils sont comme des tamis, ils filtrent selon des caractères communs (site web 1).

Les systématiciens se sont longtemps fondés sur la seule observation de critères morphologique au cours du vingtième siècle, certains systématiciens ont eu l'idée de recourir à une analyse moléculaire (d'abord de protéines, puis de l'ADN) pour identifier et classe les espèces (Mauz I., Faugère E., 2013).

La classification des insectes a été proposée par Carl Von Linné au XVIII siècle sur la base de critères morphologiques propres aux insectes. Ainsi, une trentaine d'ordres d'insectes actuels est recensée sur l'ensemble de la planète. Leur classification n'est pas encore stabilisée, quelques groupes établis par la tradition se révélant récemment hétérogènes. Le sous-embranchement des hexapodes « Hexapoda » est donc un concept plus vaste que celui des insectes lequel, au sens strict, constitue un groupe frère des entognathes (Mauz I., Faugère E., 2013).

1.2. Concept morphologique de l'espèce

Ce concept est le plus utilisé en systématique. Il se base sur l'utilisation des caractères morphologiques internes et externes des différents stades de développement. Les caractères morphologiques sont les attributs les plus directement et facilement observables. De ce fait, ils représentent le premier support de discrimination et de reconnaissance de formes vivantes différentes. Cain (1954) définit ainsi les morpho-espèces comme des espèces dont la description et l'identification sont essentiellement basés sur des caractères morphologiques (Mireille H., Okassa M., 2010).

Pour des raisons historiques et techniques, l'identification morphologique reste la technique de référence. L'identification des arthropodes s'appuie sur des caractéristiques morphologiques spécifiques à chaque espèce. Elle est réalisée par observations à la loupe binoculaire et au microscope. La plupart des caractères étudiés sont externes, mais pour certaines espèces l'identification peut nécessiter la dissection des arthropodes.

Un critère morphologique délimitant une espèce comme un groupe d'individus partageant des caractères diagnostique propre une ressemblance à l'exclusion d'autre groupes semblables. Ce critère peut rencontre des problèmes lorsque les différences entre deux groupe pourtant isoles sont indétectable (espèce jumelle) ou qu'il y a de très fortes différences entre les individus d'une même espèce (forte dimorphisme sexuel) (Agnès, 2008) et il y a trois grandes limites de l'application de ce concept peuvent être énoncées :

- 1) la difficulté de mettre en évidence des espèces cryptiques ;
- 2) la difficulté de mettre en évidence des convergences évolutives car la similarité des états de caractères ne présume pas nécessairement d'une histoire évolutive commune (caractères homoplastiques) ;
- 3) le dimorphisme sexuel qui peut conduire à des conclusions erronées.

1.3. Concept phylogénétique de l'espèce

En effet, la classification de la vivante repose parfois sur des critères génétiques non observables au premier d'abord. La phylogénie moléculaire consiste à reconstruire les relations de parente entre les séquences de nucléotide ou d'acides aminés. Elle permet d'étudier l'évolution des séquences et la relation de parente entre espèces. La nature quantitative des relations, ainsi établies, a permis le développement de méthodes et de règles rigoureuses pour la construction des arbres phylogénétique (Cheikh, 2006). Elle étudie l'histoire évolutive des espèces étudiées à la base d'une portion de leur séquence moléculaire (Diallo, 2009).

La phylogénie moléculaire est basée sur les principes suivants :

- les mutations se produisent au hasard ;
- les mutations s'accumulent au cours du temps ;
- les mutations se produisent chez un individu et se fixent dans sa descendance.

Pour reconstituer des phylogénies, on peut utiliser gènes, ou les protéines correspondantes, appelés marqueurs phylogénétiques (Alauzet, 2009).

Un marqueur génétique est basé sur la variation dans le génome, cette variation est aussi nommée polymorphisme. Selon le niveau taxonomique étudié, il est essentiel de choisir un type de marqueur qui lui est adapté. Par exemple, si le but vise est de distinguer des groupes d'individus au niveau de l'espèce, les marqueurs utilisés devront être plus conservés que dans le cas des études de populations (Beaulieu, 2007), il y a deux types de marqueur phylogénétique :

- marqueurs d'ADN nucléaire
- marqueurs d'ADN mitochondriaux

Des marqueurs moléculaires de type nucléaire sont actuellement utilisés dans le **PNCRG** (Pediatric Neurocritical Care Research Group) du peuplier noir afin d'observer le polymorphisme de séquences de l'ADN d'un certain nombre repartis sur le génome, ils constituent un outil puissant pour étudier la structuration de la variabilité génétique au sein de l'espèce et retracent son histoire évolutive (INRA, 2008).

La séquence de l'ADN mitochondrial (ADNmt) est l'objet de très nombreuses recherches en tant que marqueur de la diversité génétique des populations, elle représente souvent le matériel héréditaire le plus facilement accessible pour la génétique moléculaire des populations (François, 2011). Les marqueurs d'ADN mt peuvent également fournir un moyen rapide de détecter l'hybridation entre les espèces et les sous-espèces d'animaux d'élevage ou même sauvage (Nijman *et al.*, 2003).

1.4. Barcode moléculaire : nouvel outil d'identification taxonomique ?

1.4.1. Définition

Le barcode moléculaire est une méthode qui s'inspire du « Classifying Apparatus and Method ». Il a été développé par le « Universal Product Code » au début des années 1970 et standardisé en 2003 par Hebert et ses collaborateurs (Hebert *et al.*, 2003).

Le code-barres ADN (DNA barcoding) est une technique de taxonomie permettant de déterminer à quelle espèce appartient un échantillon d'origine a priori inconnue. Cette technique consiste, dans la grande majorité des cas, à séquencer le

gène se trouvant dans le génome mitochondrial et codant pour une sous-unité du cytochrome oxydase (COI) une enzyme impliquée dans la respiration (Herbet *et al.*, 2004).

Le cytochrome oxydase appartient à la super famille des oxydases respiratoires, enzymes membranaires ubiquitaires qui catalysent la réduction de l'oxygène moléculaire en eau. Le cytochrome oxydase est une protéine membranaire, localisée dans la membrane interne des mitochondries chez les eucaryotes et dans la membrane cytoplasmique chez les procaryotes (Johanne, 2006).

Le code-barres ADN permet notamment :

- d'analyser des échantillons ;
- d'identifier des espèces végétales ou animales (taxonomie) ;
- d'analyser et de comparer la biodiversité dans des échantillons complexes (metabarcoding).

Les séquences d'ADN obtenues, associées au nom de l'espèce sur laquelle l'ADN a été prélevé, permettront la constitution d'une base de données associant un nom d'espèce et l'ensemble des séquences d'ADN liées à ce nom. Plus tard, il sera possible de lire les séquences d'ADN (Nicolas, 2008).

1.4.2. Pourquoi utiliser le barcoding en Taxonomie ?

Mireille et Okassa (2010) ont représenté les trois arguments suivants :

- le premier argument des défenseurs de cette méthode est le grand nombre de caractères moléculaires pris en compte (contrairement à la morphologie) pour aider à la délimitation des espèces. Chaque site nucléotidique présentant 4 états de caractères, l'amplification d'un fragment de 400 paires de bases (pb) permettrait d'obtenir 4x 400 combinaisons potentielles de caractères. Ceci présenterait l'avantage majeur, de mettre en évidence des espèces cryptiques, morphologiquement indifférenciées mais reproductivement isolées. De telles espèces sont très communes dans certains groupes taxonomiques ;
- le deuxième argument a trait à la possibilité d'identifier les stades immatures, qu'il est impossible de distinguer dans de nombreux groupes uniquement sur la base d'observations morphologiques. Le barcode moléculaire présente l'avantage d'assigner un individu à une espèce donnée quel que soit son stade de développement, étant donné que les séquences d'ADN d'un individu sont identiques à tous ses stades de développement ;

- le troisième argument est lié à la diminution drastique du nombre de taxonomistes dans un contexte de déclin accéléré de la biodiversité. En considérant la disparition rapide des habitats, particulièrement dans les régions tropicales, les scientifiques ont estimé que près de 20 % de la biodiversité aura disparue au milieu du 21ème siècle. Beaucoup d'espèces seront éteintes avant même d'être découvertes.

1.5. Choix du marqueur moléculaire

Un marqueur moléculaire est un locus polymorphe qui renseigne sur le génotype de l'individu qui le porte. Un bon marqueur doit être à hérédité simple, multi-correspondent donc au polymorphisme révélé au niveau de l'ADN. L'analyse de ce polymorphisme par les techniques de biologie moléculaire s'adresse à l'ensemble du génome, qu'il soit ou non traduit en protéines, et est indépendante des conditions de l'environnement. En outre, le nombre de marqueurs observables est théoriquement illimité, aussitôt que le matériel est disponible pour l'extraction de l'ADN (Najimi *et al.*, 2003) Le choix de ce fragment comme barcode moléculaire universel sont les suivantes :

1. le gène choisi est codant. Il n'y a donc pas d'introns. De plus, il y a peu de délétions et d'insertions. De ce fait, les problèmes d'alignements des séquences et les analogies sont limités ;
2. il existe plusieurs copies par cellule, ce qui facilite la phase d'amplification ;
3. il est communément admis que le couplage d'un mode de transmission maternel et d'un état haploïde fait que le tri complet du polymorphisme ancestral sera plus rapidement atteint avec des gènes mitochondriaux qu'avec des gènes nucléaires, et permettra ainsi de visualiser plus rapidement des espèces par ces gènes. Le taux de mutation plus élevé de l'ADN mitochondrial comparativement à l'ADN nucléaire constitue un avantage à son utilisation comme marqueur moléculaire pour différencier des peu de délétions et d'insertions ;
4. la transmission maternelle garantit l'absence de recombinaisons entre les chromosomes maternels et paternels, ce qui permet de retracer plus aisément l'histoire évolutive d'une lignée sans les «interférences» des recombinaisons (Mireille H., Okassa M., 2010).

Chapitre 2.

Sphingonotus rubescens

2.1. Orthoptères

Les Orthoptères sont des insectes regroupés dans l'ordre des Orthoptera (Latreille, 1793).

Ils ont en commun de présenter des ailes droites, dont la paire antérieure (les tegmina) est coriace et protège la paire postérieure ; chez certaines espèces, les ailes sont très réduites, voire inexistantes. Leurs pattes postérieures sont très développées et adaptées au saut. La partie la plus visible du thorax en face dorsale est le pronotum, qui se compose d'une partie supérieure plate et de deux lobes latéraux ; il recouvre la base des ailes. Ils émettent pour la plupart des stridulations ; celles-ci servent généralement aux mâles pour attirer les femelles (Latreille, 1793).

Dehaondt et Mora (2013) ont montré deux sous-ordres :

2.1.1. Ensifères (sauterelles et grillons)

Ils présentent des antennes fines très développées, composées de plus de trente articles et généralement plus longues que le corps. Les femelles sont pourvues à l'extrémité de leur abdomen d'un oviscapte, organe en forme de sabre ou de tube qui sert à déposer les œufs dans le sol ou les végétaux. Leur organe auditif se trouve dans les tibias antérieurs. Les stridulations sont émises en frottant les tegmina l'une sur l'autre, le tegmen gauche comportant une râpe (crête stridulatoire) et le droit un grattoir (archet) et une surface de résonance (miroir). Leur régime alimentaire se compose généralement de végétaux et de petits animaux, mais certaines grandes espèces ne se nourrissent que d'insectes.

2.1.2. Caelifères (criquets)

Leurs antennes sont moins longues que le corps et comptent moins de trente articles. L'organe de ponte est composé de courtes et robustes valves à l'extrémité de l'abdomen des femelles. L'organe auditif est une ouverture tympanique qui se les Ensifères se distinguent des Caelifères (criquets) par la longueur des antennes, la disposition des organes auditifs et, quand ils en sont capables, par le mécanisme d'émission sonore, par frottement des tegmina l'un contre l'autre chez les premiers et par frottement des fémurs postérieurs sur les tegmina chez les seconds.

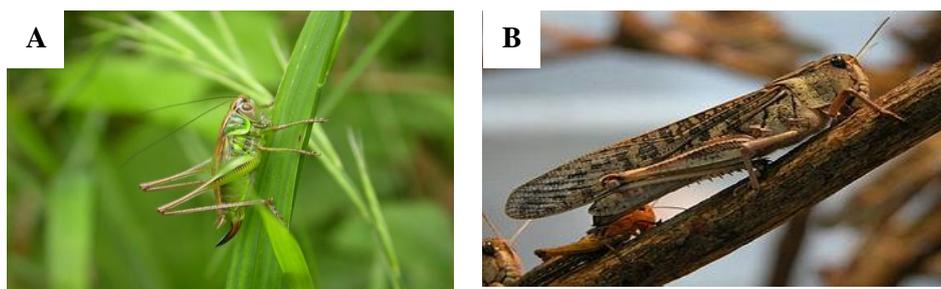


Photo 01. Photo représente les ensifères (A) et les caelifères (B) (Menni, 2013).

2.2. *Sphingonotus rubescens*

2.2.1. Généralité sur le genre *sphingonotus*

Le *Sphingonotus* est un genre de criquets de la famille des acrididés, de la sous famille des Oedipodinae. Il a été établi par Fieber en 1852, il est volumineux, riche de plus de 146 espèces et distribue essentiellement dans l'ancien monde, avec quelque représentants en Amérique central et sud et en Australie occidentale, l'Afrique du nord en comprend 22 espèces (Cigliano *et al.*, 2017).

Pour les espèces de *Sphingonotus*, l'identification spécifique est impossible aux stades œuf, larve et protonympe, et peu fiable, aux stades deutonympe et adulte mâle (Hassani, 2013).

2.2.2. Caractéristiques morphologiques

Les Caelifères constituent la majeure partie des Orthoptères, parmi lesquels on trouve les espèces les plus dangereuses pour l'agriculture. Toutes les espèces qui appartiennent au sous-ordre des Caelifères ont la particularité morphologique suivante: des antennes courtes qui n'atteignent pratiquement jamais la limite postérieure du pronotum. Les femelles possèdent un oviscapte constitué par quatre valves courtes et robustes, les œufs sont pondus dans le sol, enfermés dans une sorte d'oothèque appelée coque ovigère en une masse surmontée par une matière spumeuse (Hassani, 2013).

Les acridiens possèdent une unité structurale fondée sur la présence de trois parties fondamentales:

- **la tête** : la tête porte des pièces buccales de type broyeurs, deux courtes antennes (ce qui aide à les différencier des sauterelles aux antennes beaucoup plus longues) et deux types d'yeux (deux yeux simples, ou ocelles, et deux yeux composés- yeux à facettes) (Hassani, 2013);

- **le thorax** : est formé de trois segments thoraciques, dont chacun porte une paire de pattes. Les pattes postérieures longues et puissantes, sont adaptées au saut. Elles sont pourvues sur leur face intérieure d'organes producteurs de son, le chant étant obtenu par frottement des pattes contre élytres. Les ailes antérieures et postérieures sont portées respectivement, par le deuxième et le troisième segment thoracique (Hassani, 2013);
- **l'abdomen** : on peut voir sur l'abdomen, les stigmates, qui sont des ouvertures sur l'extérieur des trachées, petits tubes permettant les échanges gazeux de la respiration (Hassani, 2013).

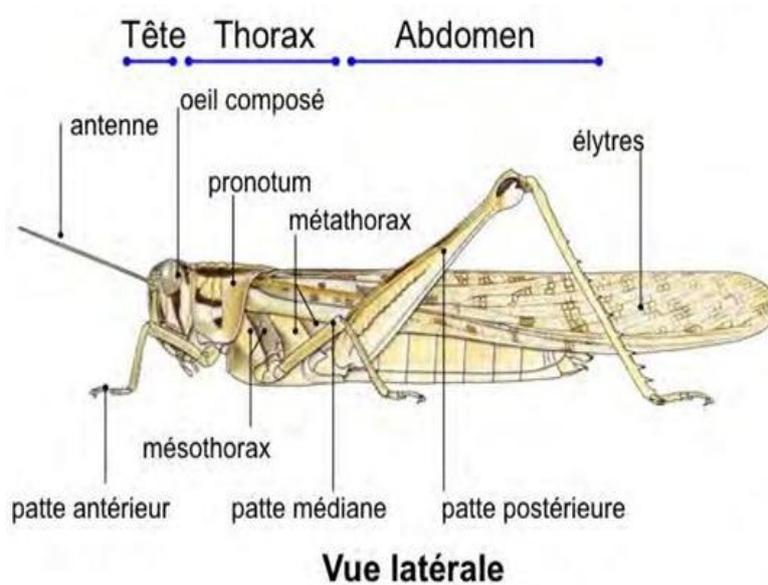


Figure 01. Morphologie générale d'un criquet (Lecoq, 2012).

2.2.3. Identification

Coloration ocre rougeâtre avec des taches noires, parfois couleur sable. Espèce assez grande et élancée. Vertex étroit avec une carinule médiane souvent présente. Yeux allongés. Pronotum à carène médiane très faible dans la prozone, métazone presque lisse, finement ponctuée ; bord postérieur en angle obtus et arrondi à l'extrémité. Tegmina longs atteignant ou dépassant l'apex des tibias postérieurs, tachetés de brun sans bande sombre transverse distincte ; nervure intercalée sinuée en S en général très proche de la médiane ou la touchant (mâle). Ailes hyalines avec des nervures noires, pas de fasciée noire. Fémurs postérieurs brun noir à la face interne avec une bande jaune clair. Tibias postérieurs bleu pâle avec un anneau clair à la base (Louveaux *et al.*, 2020).

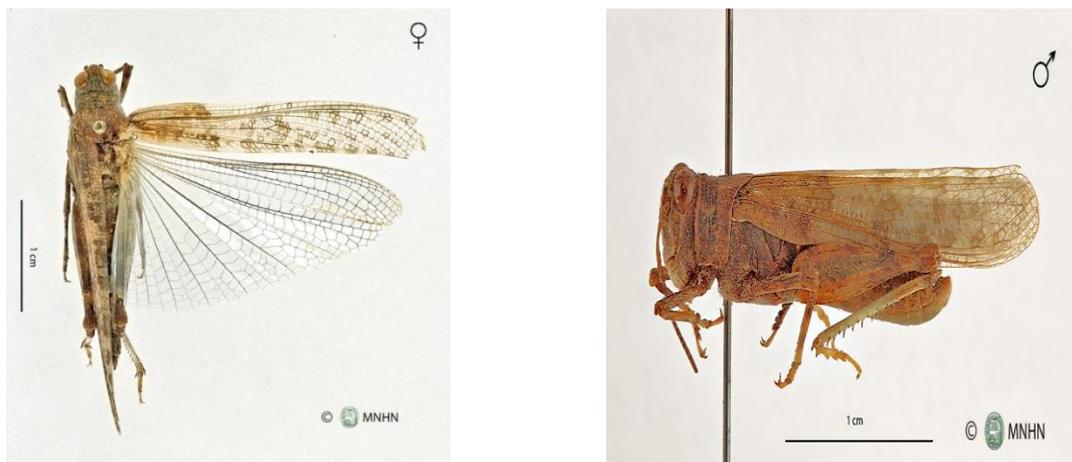


Figure 02. *Sphingonotus rubescens* walker, 1870 (Mâle et femelle : Espagne, Ténérife Las Canadas) (Louveaux *et al.*, 2020).

2.2.4. Habitat

Fréquente les milieux arides, steppiques et subdésertiques. Vole facilement aux heures chaudes de la journée ; clic sonore caractéristique des mâles en vol. Dégâts mineurs dans les cultures céréalières (blé, orge) en Arabie Saoudite (Louveaux *et al.*, 2020).

2.2.5. Classification

La position systématique de *Sphingonotus rubescens* est résumée dans le tableau 1.

Tableau 01. Taxonomie de *Sphingonotus rubescens* (Walker, 1870) (site web 2).

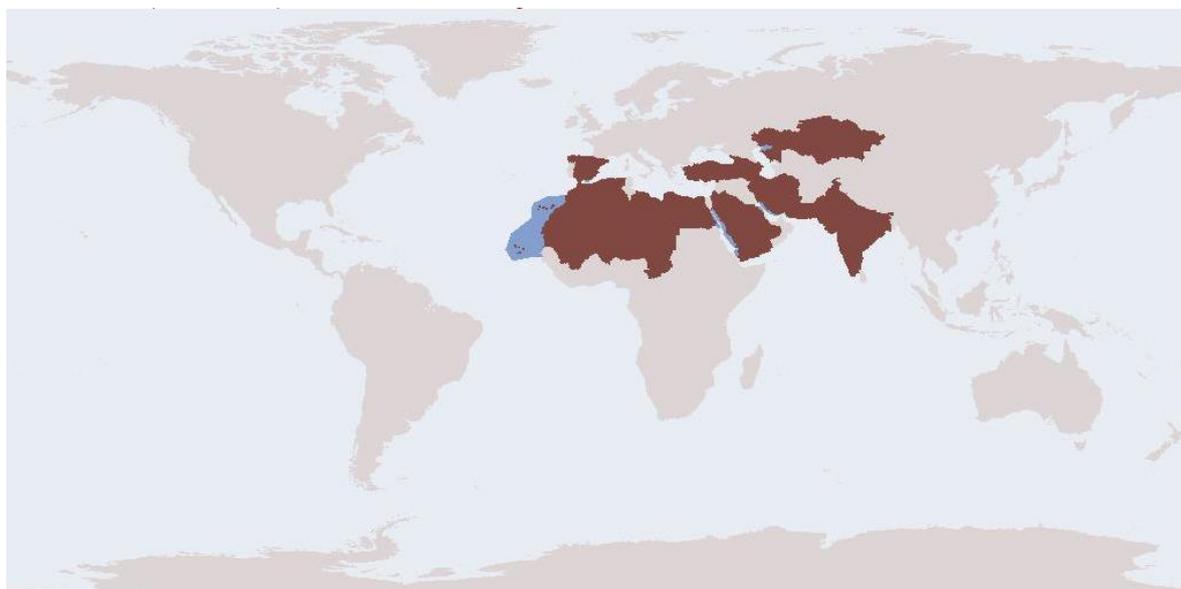
Règne	Animalia
Embranchement	Arthropoda
Sous-embranchement	Hexapoda
Classe	Insecta
Sous-classe	Pterygota
Infra-classe	Neoptera
Ordre	Orthoptera
Sous-ordre	Caelifera
Infra-ordre	Acrididea
Super-famille	Acridoidea
Famille	Acrididae

Sous-famille	Oedipodinae
Tribu	<i>Sphingonotini</i>
Genre	<i>Sphingonotus</i>
Espèce	<i>Sphingonotus rubescens</i>

2.2.6. Répartition géographique

1. Dans le monde

Pourtour de la Méditerranée: Espagne méridionale, Grèce, Libye. De part et d'autre du Sahara et dans les oasis. Afrique tropicale : de la Mauritanie au Kenya et Soudan. Moyen Orient: Arabie, Yemen, Asie du Sud-Ouest, Iran, Afghanistan, Pakistan, Inde, au nord jusqu'au delta de la Volga (Louveaux *et al.*, 2020).



Niveaux géographiques	Terrestre	Océan
Aucune donnée ou non présente		
Niveau 1 présent		
Niveau 2 présent		
Niveau 3 présent		

Les nuances bleues localisent les îles océaniques incluses dans la distribution

Figure 03. Répartition de l'espèce *Sphingonotus rubescens* (Walker, 1870) dans le monde selon Orthoptera Species File (site web 3).

2. En Algérie

L'Algérie, de par situation géographique et de l'étendue de son territoire, occupe une place prépondérante, dans l'aire d'habitat de certains acridiens.

Algérie occidentale : [Oran] ; Parc national des Monts de Tlemcen et Hautes-Plaines [Tlemcen]; Aïn Nouissy, Cap Ivi [Mostaganem], stèle de l'Emir Abdelkader [Mascara], Oued Sefioune [Sidi bel Abbès] ;

Hauts Plateaux : Takhemaret, Faidja = Jebel El Faïdja [Tiaret] ;

Mitidja : Soumaa [Blida] ;

Kabylie : Tikjda [Bouira] ;

Massif des Aurès : Baniane [Batna] ;

Hautes Plaines : Reserve Naturelle de Mergueb [M'Sila]; Chaiba, Bou-Saâda (Oued el Maitar), Jebel Kerdala [M'Sila] ;

Atlas saharien, Oasis : Aïn Sefra [Naâma]; Beni Ounif [Bechar]; Bechar, Djanet, Plateau du Tademaït [Adrar], Tamanrasset, Ghardaïa. Reggan [Adrar], Grand Erg occidental, Ghardaia, Tilrempt [Laghouat], Beriane [Ghardaia]; Ouargla; Tindouf; Hoggar, Silet [Tamanrasset]; Massif du Hoggar (Louveaux *et al.*, 2020).



Figure 04. Répartition de l'espèce *Sphingonotus rubescens* (Walker, 1870) en Algérie (Louveaux *et al.*, 2020).

A Biskra

Ouled Djellal, Bir Naam, Mekhadma, Djamorah, Oualladja, Chetma, Biskra, ElOutaya, Ain Ben Noui , ElHadjeb, Ain Alkarma, Fogala, Doucen, Beni Souik, Kantara, Chaiiba (Moussi *et al.*, 2018).

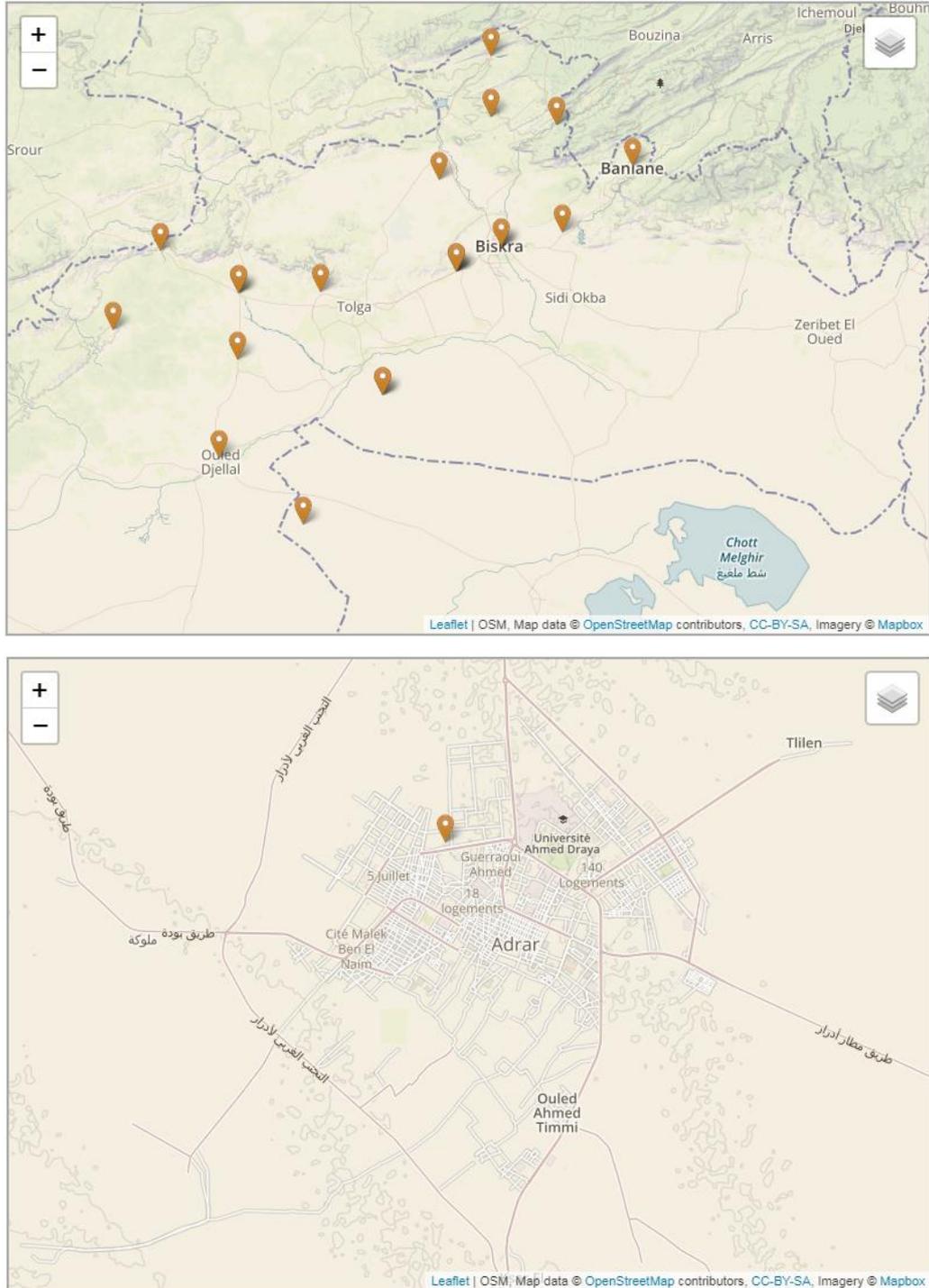


Figure 05. Répartition de *Sphingonotus rubescens* (Walker, 1870) à Biskra et à Adrar (Louveau et al., 2020).

Deuxième Partie.

Partie Expérimentale

Chapitre 3.

Matériel et Méthodes

3. Matériel et méthodes

3.1. Échantillonnage

L'étude a été menée sur des échantillons collectés dans deux régions, Bouchegrone et région de l'ouest (Course), à Biskra, et une région à Adrar. Les échantillons ont été capturés à la main ou par un filet fauchoir. Les spécimens de la wilaya d'Adrar ont été capturés par le Dr Soudani Abderrahmane le 05/09/2019 et les spécimens de la wilaya de Biskra ont été capturés par le professeur Moussi Abdelhamid le 21 et le 26/09/2019. Un total de 8 individus de l'espèce *Sphingonotus rubescens* ont été collectés et conservés dans de l'éthanol absolu (100%) à 4°C jusqu'à l'extraction de l'ADN (tableau 02), et leur morphologie a été déterminée par le professeur Moussi Abdelhamid.

Tableau 02. Echantillons analysés.

Echantillon	N d'individu	Date d'échantillonnage	Localité
<i>S. rubescens</i> A	2	05/09/2019	Adrar
<i>S. rubescens</i> B	3	21/09/2019	Bouchagrone
<i>S. rubescens</i> C	3	21/09/2019	région de l'ouest (Course)

3.2. Description de la zone d'étude

Biskra

La région de Biskra s'étend approximativement de 21671 Km² et se trouve à l'est du centre de l'Algérie (environ 4° 15 à 6° 45 E et 35° 15 à 33 °30 N). La région comprend deux territoires présentant des caractéristiques géologiques, topographiques et bios climatologiques distinctes. La première région au nord est définie par les chaînes atlas avec une altitude comprise entre 100 m et 1500 m, caractéristique essentiellement par des formations arbustives et arborescentes. La deuxième région dans le sud correspond à une plaine saharienne faible avec des contreforts en pente interrompues par des lits d'oued qui coule des montagnes de l'atlas et disparaissent

dans la grande dépression fermée de Chott Melghir. Il est caractérisé par des formations de steppe naturelle et des oasis fortement affectées par l'activité humaine. Généralement, la région de Biskra est une zone présaharienne sur la frontière entre une steppe aride et le nord de Sahara (Moussi *et al.*, 2011).

Adrar

La wilaya d'Adrar s'étend sur la partie nord du Sud-ouest algérien, couvrant ainsi une superficie de 427 968 km², soit 17,97 % du territoire national. Le climat de la région d'Adrar est caractérisé par une aridité sévère. La température est élevée toute l'année, surtout pendant la période estivale où elle dépasse des seuils au-delà desquels la vie devient impossible (Sid-Ahmed *et al.*, 2016).

3.3. Extraction d'ADN et séquençage de gènes

Nous avons étudié la phylogénie de *Sphingonotus rubescens* sur la base du gène mitochondrial de la sous unité I de cytochrome oxydase (COI) pour examiner la taxonomie moléculaire de cette espèce et ses proches. La sous-unité 1 (COI) du fragment d'ADN mitochondrial de la cytochrome oxydase est l'un des marqueurs moléculaires les plus populaires utilisés dans les études phylogénétiques, non seulement chez les orthoptères, mais aussi dans d'autres groupes d'insectes.

3.3.1. Protocole d'extraction d'ADN selon H. Chen *et al.*, (2010) (modifié)

SDS c'est une méthode adaptée par Dellaporta (1983). Le dodécylsulfate de sodium (SDS) est un détergent ionique dénaturant utilisé en biochimie et biologie moléculaire (Grisshammer et Buchanan, 2006).

Le tampon SDS se compose de 0.5% (w/v) SDS dilué dans 200 mM Tris, 25 mM EDTA, 250 mM Na Cl;

L'ADN génomique a été extrait du tissu musculaire du fémur postérieur. Le tissu obtenu de chaque individu a été mis dans un micro-tube de 1,5 ml et les étapes suivantes ont été appliquées :

- afin d'assurer une extraction la plus optimale possible de l'ADN des différents échantillons, il est requis de procéder à un broyage de ceux-ci. Chaque échantillon a été congelé dans de l'azote liquide et immédiatement broyé en une poudre fine dans les micro-tubes ;

- ajouter 500 µl de tampon de lyse (tampon SDS) dans chaque tube et vortexer brièvement;
- ajouter 5 µl d'ARNase (100 mg/ml), puis incuber les tubes pendant une heure dans un bain marie à 37 °C ;
- ajouter 5 µl de protéine K (20 mg/ml) (la protéinase K va dégrader les protéines cellulaire) ;
- incuber à 55°C pendant une nuit sous agitation douce;
- l'homogénat ensuite extraire avec 240 µl de phénol / chloroforme / alcool isoamylique (25: 24: 1) et centrifuger à 12 000 g pendant 10 min ;
- transférer le surnageant (phase contenant l'ADN) dans un nouveau tube de 1,5 ml propre ;
- pour précipiter l'ADN, ajouter 500 µl d'éthanol absolu réfrigéré et mélanger délicatement la solution puis mettre les tubes à -20°C pendant 20 min ;
- centrifuger à 12 000 g pendant 15 min puis éliminer l'éthanol ;
- laver le culot avec 500 µl d'éthanol à 70% et centrifuger dans les conditions ci-dessus pendant 3 min pour éliminer le sel résiduel ;
- éliminer le surnageant et sécher le culot dans l'étuve à 37 °C pendant 30 min ;
- solubiliser chaque échantillon dans 50 µl d'eau bi-distillée stérile ;

L'ADN peut maintenant être conservé à 4°C pour une courte période et transféré par la suite à -80°C pour longue conservation.

3.3.2. Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité

3.3.2.1. Estimation de la concentration de l'ADN par Nano drop

En biologie moléculaire, il est important de quantifier et d'analyser la pureté des acides nucléiques après leur extraction. La méthode la plus répandue pour le dosage d'acides nucléiques est la spectrophotométrie qui mesure l'absorbance (ou densité optique) des acides nucléiques à 260 nm (absorbent dans l'ultraviolet). Parallèlement on détermine leur pureté en mesurant l'absorbance à 280 nm et à 230 nm. La pureté d'une solution d'acide nucléique est considérée comme acceptable lorsque le ratio A260

nm/A280 nm est compris entre 1,8 – 2,0 pour l'ADN et entre 2,0 – 2,2 pour l'ARN. Un ratio A260/A230 compris entre 2,0 – 2,2 indique une bonne pureté des acides nucléiques. Plusieurs contaminants absorbant à 230 nm proviennent de l'échantillon ou de la purification, comme par exemple le phénol (Philippe et Deborah, 2010).

3.3.2.2. Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose

Préparation du gel d'agarose

Le tampon de diffusion de gel se compose de 1% de SDS, EDTA de 1 mM, acétate de magnésium de 10 mM et acétate d'ammonium de 500 mM, pH 8,0 (Pei Yun Lee *et al.*, 2012).

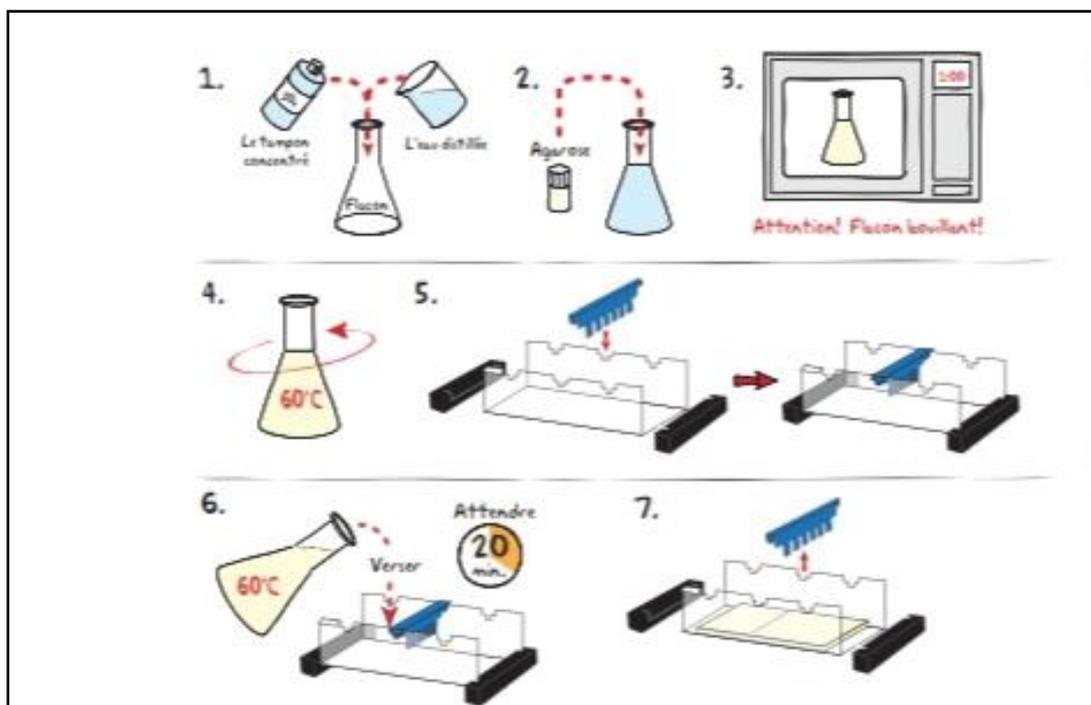


Figure 06. Etapes de préparation de gel d'agarose (Edvotek, 2015).

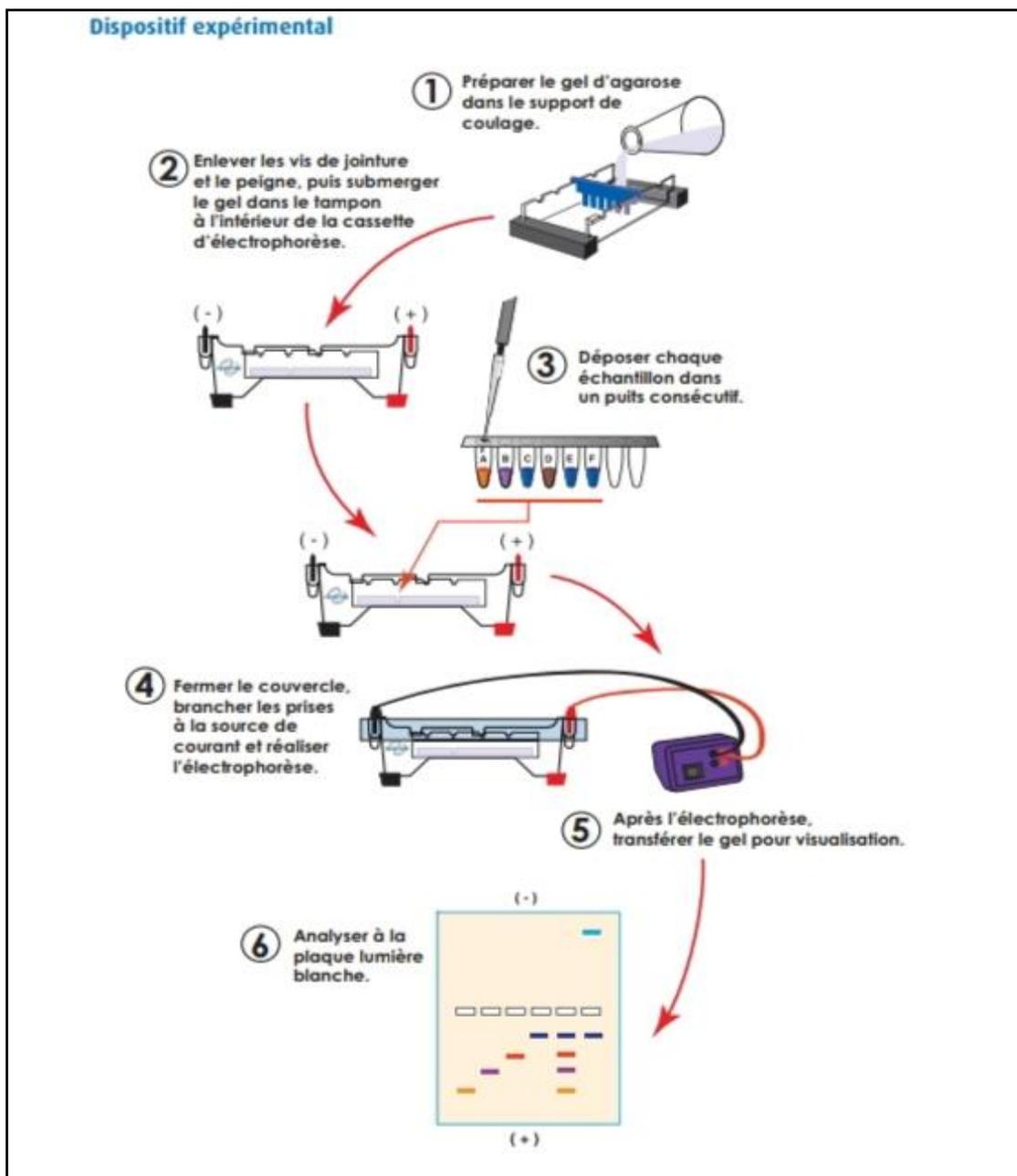


Figure 07. Dispositif expérimentales de l'électrophorèse (Edvotek, 2015).

3.3.3. Amplification du gène COI par PCR

La PCR s'effectue sur 3 étapes:

- **La dénaturation thermique de l'ADN:** à 95°C, les liaisons d'hydrogènes sont rompues et les 2 brins de l'ADN se séparent. L'ADN passe sous forme simple brin dans le milieu.
- **Hybridation des amorces:** le milieu réactionnel contient 2 amorces, chacune complémentaire d'un des 2 brins. La température permettant la fixation des

amorces sur les monobrins d'ADN est comprise entre 50°C et 65°C (Magniez, 2008). Les amorces en larges excès, s'hybrident dès lors qu'elles rencontrent les séquences complémentaires.

- **Extension des amorces:** intervention de la taq polymérase (ADN polymérase) qui allonge les amorces en y incorporant les désoxyribonucléiques complémentaires de la séquence de la matrice auquel elle est hybridée. Cette étape s'effectue à une température de 72°C.

La technique PCR se réalise par le biais d'un appareil programmable appelé un thermocycleur dans lequel sont placés les microtubes contenant le mélange réactionnel. Cet appareil permet d'exposer les tubes à des températures choisies et pour des durées déterminées par l'expérimentateur (Magniez, 2008).

Les amorces utilisées sont (M. Husemann *et al.*, 2012):

COI-F COI CCATCTTACCGCAAA AATGAT

COI-R COI CTG GGTGWCCAAAGA ATCAAA

3.3.3.1. Préparation du mélange réactionnel pour PCR

Mix de PCR	Quantité (en µl)
ADN	100µg (calculer en fonction de la concentration de l'ADN)
Tampon de <i>Taq</i>	5
<i>Taq</i> polymérase	0,5
Mix de dNTPs (0,2 mM)	2
Amorce sens (10 mM)	1
Amorce antisens (10 mM)	1
H2O distillé	QSP

Le volume total est de 50 µl.

Dans le tube témoin, l'ADN est remplacé par de l'eau distillée.

3.3.3.2. Déroulement de la PCR

Les tubes contenant le mélange à amplifier sont placés dans le thermocycleur, selon le programme indiqué dans le tableau 03.

Tableau 03. Programme de PCR.

Nombre de Cycles	Etapes	Température (°C)	Durée
1	Dénaturation initiale	94	3 min
30 x	Dénaturation	94	30 s
	Hybridation	54	1min
	Elongation	72	1min
1	Elongation finale	72	10 min
	Conservation	4	indéfiniment

3.3.3.3. Visualisation des fragments amplifiés

Lorsque la réaction de PCR est achevée, les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1%. Dans chaque puits du gel, il est déposé le mélange de : 6 µl de produit d'amplification + 4 µl de Bleu de Bromophémol, et un puits pour de 3 µl de marqueur de poids moléculaire. Tout le système est soumis, par la suite, à un voltage initial de 30 V pendant 10 min puis évoluant à 100 V pendant 30 min.

3.3.3.4. Elution et purification d'ADN

Pour cette étape, le kit « GenElute™ Gel Extraction Kit » (sigma-aldrich) a été utilisé et le protocole mentionné dans le bulletin technique de ce kit a été appliqué.

➤ Le protocole

1a. Exciser le fragment d'ADN du gel d'agarose avec un scalpel. Coupez l'excès de gel pour minimiser la quantité d'agarose ;

2a. Pesez la tranche de gel dans un tube incolore taré ;

3a. Ajouter 3 volumes de gel de « la solution de solubilisation de gel » à la tranche de gel ;

(Autrement dit, pour chaque 100 mg de gel d'agarose, ajouter 300 µl de solution de solubilisation de gel). Incuber le mélange de gel à 50-60°C pendant 10 minutes, ou

jusqu'à ce que la tranche de gel est complètement dissoute. Vortex brièvement toutes les 2-3 minutes pendant l'incubation pour aider dissoudre le gel ;

4a. Placez « la colonne G GenElute Binding » dans l'un des tubes de collecte de 2 ml fournis. Ajouter 500 µl de la solution de préparation de colonne à chaque « colonne G GenElute Binding ». Centrifuger pendant 1 minute. Jeter le liquide qui coule ;

Remarque : la solution de préparation de colonne maximise la liaison de l'ADN à la membrane, ce qui se traduit par des rendements plus cohérents.

5a. Une fois que la tranche du gel est complètement dissoute (étape 3a), assurez-vous que la couleur du mélange est jaune (similaire à la solution de solubilisation de gel frais sans tranche de gel) avant de passer à l'étape suivante ;

6a. Ajouter un volume de gel d'isopropanol à 100% et mélanger jusqu'à homogénéité ;

7a. Charger le mélange de la solution de gel solubilisé de l'étape 6a dans la colonne de liaison qui est assemblée dans un tube de collecte de 2 ml. Centrifuger pendant 1 minute. Jeter le liquide qui coule ;

8a. Ajouter 700 µl de « Wash Solution » (solution de lavage) dans la colonne de liaison. Centrifuger pendant 1 minute. Retirez la colonne de liaison du tube de collecte et jetez le liquide traversant. Remettez la colonne de liaison dans le tube de collecte et centrifuger à nouveau pendant 1 minute sans aucune solution de lavage supplémentaire pour éliminer l'excès d'éthanol ;

9a. Transférer la colonne de liaison à un tube de collecte frais. Ajouter 50 µl de solution d'élution au centre de la membrane et incubé pendant 1 minute. Centrifuger pendant 1 minute.

3.3.4. Séquençage

Le séquençage consiste à retrouver la suite de nucléotides correspondant au brin d'ADN étudié. La méthode utilisée aujourd'hui est celle proposée par Frederick Sanger (Sanger *et al.*, 1977). De puis 1977, la méthode a considérablement évolué grâce à la mise au point de séquenceurs automatique et du marquage à l'aide de fluorochromes. Elle est devenue aujourd'hui une technique rapide et fiable (Sanger *et al.*, 1977).

Les produits de PCR réussis ont été transportés au laboratoire de biologie moléculaire du centre de recherche en biotechnologie (CRBt), Constantine.

3.4. Assemblage et alignement des séquences

3.4.1. Correction de séquences

Le produit du séquençage est souvent un fichier .ab1 qui peut être lu par plusieurs logiciels tel que : DNA Baser Assembler (Figure 08), Technelysium Chromas, BioEdit, Geneious, Genome Compiler, GSL Biotech SnapGene, Applied Biosystems Sequencing Analysis Software,...



Figure 08. Exemple de fichier .ab1 (la séquence du fragment de l'espèce *S. rubescens* A) ouvert avec le logiciel DNA Baser Assembler.

La correction de séquences consiste en une vérification de la séquence obtenue, par le séquençage, afin d'identifier une éventuelle erreur de lecture commise par le lecteur. La correction se fait toujours en comparant la séquence nucléotidique obtenue avec le chromatogramme (Matthieu, 2007). Parmi les logiciels utilisés pour la vérification et la correction de séquences sont BioEdit et Geneious, mais le dernier est payant.

Les séquences ont été importées dans BioEdit v7.2.5, inspectées à l'œil nu, les deux extrémités des séquences correspondant aux séquences d'amorces ont été excisées pour éliminer la similitude nucléotidique artificielle introduite par amplification par PCR (Huang *et al.*, 2013) et les séquences consensus ont été obtenues (Figure 09).



Figure 09. Exemple de création de séquence consensus avec BioEdit

Pour tester les effets potentiels des pseudogènes mitochondriaux nucléaires (numts) (Songer *et al.*, 2008), toutes les séquences ont été traduites en séquences d'acides aminés par Blastx (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Aucun codon d'arrêt interne n'a été détecté.

Une analyse de similarité de séquence pour déterminer les espèces correspondantes dans les bases de données DNA/barcode data bases a été réalisée en utilisant les outils «Blast» et «Identification Request» du NCBI et BOLD. La similarité de chaque séquence est évaluée par rapport à toutes les séquences (Thompson *et al.*, 2002).

3.4.2. Alignement de séquences

Au cours de l'étape d'alignement, les séquences sont disposées de manière à maximiser la similitude entre elles. L'alignement consiste à poser l'hypothèse d'homologie primaire pour chacun des sites des séquences comparées.

Le résultat de l'alignement permet d'estimer le degré de diversité nucléotidique au sein d'une matrice d'alignement (Séglène, 2020). Les séquences ont été alignées en utilisant l'algorithme Clustal W (Thompson *et al.*, 2002) à l'aide de BioEdit avec des paramètres par défaut.



Figure 10. Alignement des séquences par BioEdit

3.4.3. Reconstruction phylogénique

La reconstruction phylogénétique consiste en l'obtention d'un arbre qui sera considéré comme une illustration des relations phylogénétiques réelles entre les taxons utilisés, en fonction de la topologie générale et la longueur des branches obtenues.

L'arbre phylogénétique présente les relations de parenté entre organismes vivants. Il montre qui est proche de qui, et non pas qui descend ce qu'il permet d'identifier les homologies et les homoplasies (L. Guillaume, 2007).

Les séquences alignées ont été introduites dans MEGA X 10.1.7 (Kumar *et al.*, 2018) pour construire un arbre phylogénétique. Les distances évolutives ont été calculées à l'aide de la méthode du maximum de vraisemblance (Maximum Likelihood, M.L) basée sur les unités du nombre de substitutions de base par site après que toutes les positions contenant des gap et des données manquantes aient été éliminées de l'ensemble de données (Complete deletion model) (Nazir *et al.*, 2014).

Chapitre 4.

Résultats et Discussion

Ce chapitre expose l'ensemble des résultats obtenus pour l'extraction d'ADN de trois individus appartenant au genre *Sphingonotus*, l'amplification des fragments du gène COI (le marqueur), le séquençage de ces fragments et finalement la construction d'un arbre phylogénétique pour ces individus.

4.1. Protocole d'extraction d'ADN selon H. Chen et al., (2010) (modifié)

L'isolement de l'ADN génomique intact est une étape essentielle dans différentes applications de la biologie moléculaire. Après l'application du protocole de H. Chen et al. (2010), l'ADN a été obtenu des trois individus avec un rendement important.

Les modifications apportées à ce protocole sont :

- 1- Nous avons ajouté une étape de broyage dans l'azote liquide afin d'augmenter le rendement d'ADN extrait. Cette étape est indiquée par autres références tel que : Aljanabi et Martinez (1997), N. O. Mega et L. F. Revers (2011) et M. Tagliavia et al. (2011) ;
- 2- Nous avons également prolongé le temps d'incubation des tissus avec la protéine K afin qu'elle dégrade le plus possible les protéines cellulaires.

4.2. Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité

L'ADN extrait de différents individus a été examiné par spectrophotométrie NanoDrop et par électrophorèse sur gel d'agarose 0,8% sous un voltage de 100 V.

4.2.1. Estimation de la concentration et de la pureté de l'ADN par NanoDrop

La pureté et la quantité de l'ADN sont estimées par dosage au spectrophotomètre NanoDrop. La concentration d'ADN extrait ainsi que les ratios d'absorbance résultants sont résumés dans le tableau 04 ci-dessous (Le tableau donné par le NanoDrop est en annexe).

Tableau 04. Concentration d'ADN extrait et les ratios d'absorbance.

Echantillon	Concentration	Units	260/280	260/230
<i>S. rubescens</i> A	900,09	ng/ μ l	1,64	1,31
<i>S. rubescens</i> B	668,5	ng/ μ l	1,86	1,84
<i>S. rubescens</i> C	1060	ng/ul	1,84	2,01

Les rapports DO260/DO280 sont proches, les valeurs inférieurs à 1.8 témoignent d'une contamination par les protéines et les valeurs qui dépassent 2 témoignent d'une contamination par les ARN (Varma *et al.*, 2007). Ces résultats nous indiquent que l'ADN de l'échantillon *S. rubescens* A était légèrement contaminé par des protéines.

Nous expliquons cette contamination par une erreur de manipulation lors du pipetage de la phase aqueuse contenant l'ADN. Parce que si nous touchons la phase intermédiaire, qui contient les protéines précipitées, alors nous prélevons des protéines avec elle et c'est ce qui nous cause l'erreur. Et si nous laissons un certain volume de cette phase, nous courons le risque de perdre une quantité d'ADN.

Tandis que, l'ADN de *S. rubescens* B et *S. rubescens* C sont purs; Les résultats obtenus comme suite 1,86 et 1,84 entre [1,8 – 2,0] (Philippe et Deborah, 2010).

Le rapport A260/ A230 reflète la contamination de l'échantillon par des substances telles que les hydrates de carbone, les peptides, les phénols ou les composés aromatiques. Dans le cas d'échantillon pur, le ratio A260/A230 devrait être 2,0 - 2,2 (Denis *et al.*, 2018), nos résultats indiquent que l'ADN de l'échantillon *S. rubescens* A et *S. rubescens* B sont contaminées par les phénols qui n'aient pas éliminées totalement par la purification. Alors que, l'ADN de *S. rubescens* C est pur, le résultat 2,1 est entre [2,0 - 2,2].

D'après Chen *et al.* (2010) et Mega et Revers (2011) qui ont fait l'étude d'extraction de l'ADN. Les ratios d'A260/A230 et A260/A280 nm de leurs échantillons sont supérieurs à 1,7; par conséquent, leurs résultats sont proches des nôtres.

Donc, on peut dire que l'ADN de deux individus, *S. rubescens* B et *S. rubescens* C, indique une bonne pureté aux deux ratios A260/A280 et A260/A230 par rapport l'individu *S. rubescens* A.

En générale, l'ADN extrait de trois individus montre une concentration et une pureté suffisante pour l'application de la PCR car la qualité et la pureté des acides nucléiques comptent parmi les facteurs les plus critiques pour l'analyse PCR.

4.2.2 .Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose

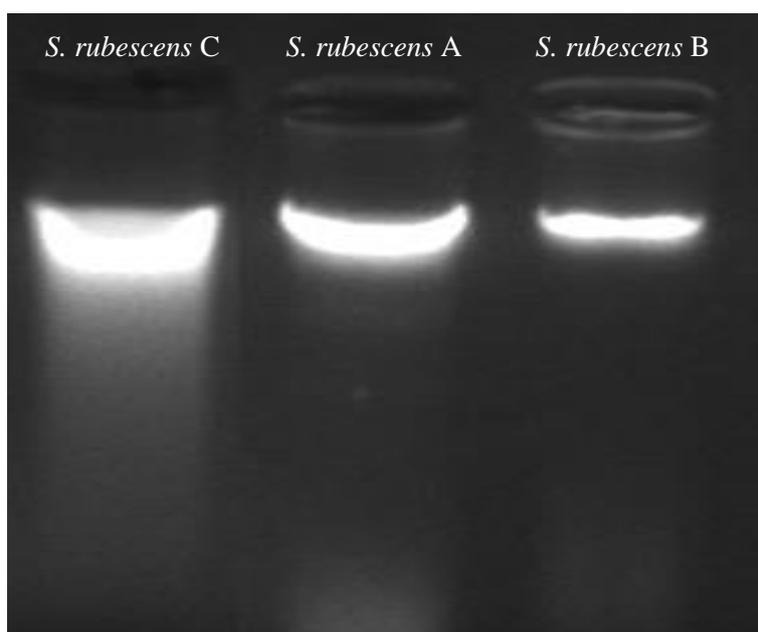


Photo 02. Profil électrophoétique montrant l'intégrité de l'ADN génomique sur gel d'agarose à 0,8% à 100 volts pendant 30 min, après coloration au bromure d'éthidium et visualisation sur UV.

Dans le gel d'agarose colorés au bromure d'éthidium à 0,8%, les échantillons d'ADN ont révélé une bonne qualité (ADN intact) (Photo 02). L'effet de cisaillement de l'ADN des trois échantillons n'a pas été observé.

4.3. Amplification du gène COI par PCR

L'ADN génomique a été amplifié par PCR, et a été utilisé des amorces spécifiques génèrent un fragment de taille de 669 pb. L'amplification réussie a été confirmée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% (Photo 03).

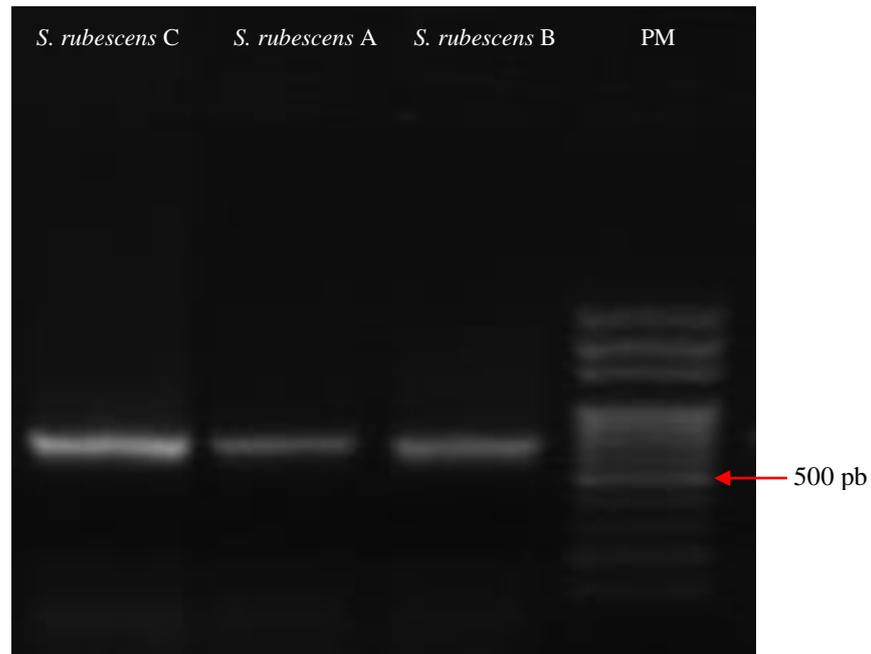


Photo 03. Profil électrophorétique montrant les fragments cibles du gène COI obtenus par PCR. Un fragment de 669 pb a été amplifié par PCR dans les conditions indiqués préalablement et qui correspond à une séquence ciblée de COI. Cette séquence a été migrée sur gel d'agarose à 1% et visualisée sur UV après coloration au bromure d'éthidium. PM : poids moléculaire 100 pb ladder.

4.4. Séquençage

Le centre de recherche en biotechnologie de Constantine nous a fourni des séquences de bonne qualité (Figure 11)





Figure 11. Séquence de fragment de gène COI, A : sens et B : anti-sens.

4.5. DNA barcoding

Nous avons inclus un total de 29 séquences appartenant à 8 espèces dans les analyses, 3 spécimens appartenant à l'espèce *Sphingonotus rubescens* ont été récemment séquencés, 21 séquences supplémentaires ont été obtenues à partir de sources accessibles au public, BOLD. Nous avons construit un arbre phylogénétique dérivé de toutes les données (Figure 12).

La phylogénie montre deux clades bien séparés, le premier porte 6 espèces et le deuxième porte une seule espèce, *S.rubescens*.

Cet arbre phylogénétique confirme que nos trois séquences appartiennent à la même espèce *S.rubescens*, mais il y a une variabilité génétique entre eux, où l'espèce se divise en plusieurs unités. Cela pourrait indiquer une orientation vers une diversité cryptique. Par conséquent, d'autres analyses génétiques sont nécessaires.

Nous avons constaté dans ce cladogramme que:

- la séquence de *S.rubescens* de Bouchagroune et la séquence de *S.rubescens fasciatus* de Kirgistan sont regroupés dans une seule lignée ;
- la séquence de *S.rubescens* de course est plus proche à la séquence de *S.rubescens* des îles Canaries (Spain) ;
- une distance génétique importante entre les séquences de l'individu de Bouchagroune et l'individu de course malgré la proximité des régions ;
- la séquence d'Adrar est proche de celle de la séquence Foghala bien que les individus aient été collectés dans des régions très éloignées.

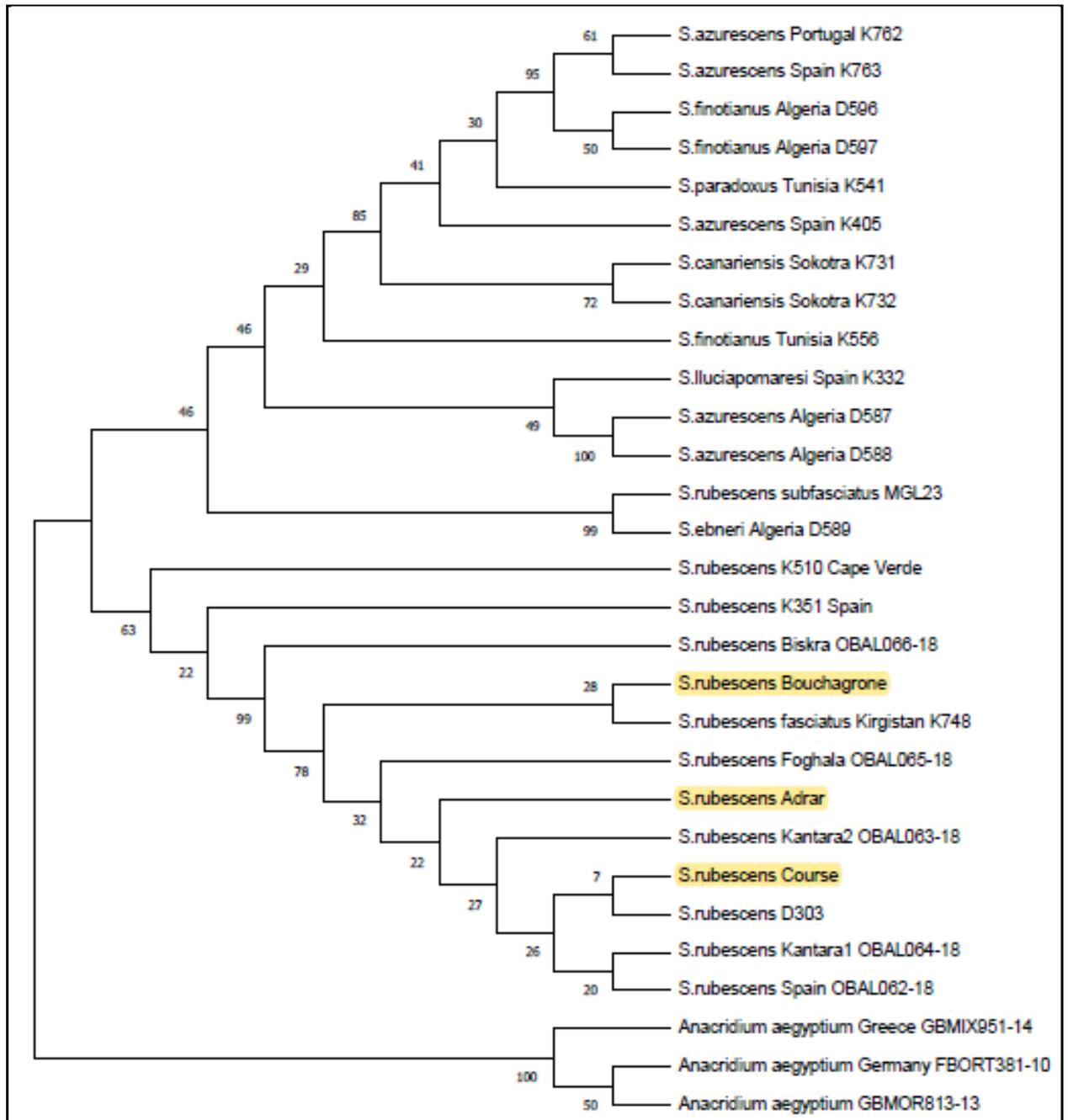


Figure 12. Arbre phylogénétique généré avec la méthode de maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*) basé sur le fragment de gène COI. Les valeurs aux nœuds représentent le bootstrap.

Conclusion

Notre travail a été mené dans les objectifs de (i) construire de l'arbre phylogénétique du genre *Sphingonotus* pour la classification moléculaire de trois spécimens de l'espèce *rubescens* collectés à Biskra et Adrar et (ii) contribuer à la construction d'une base de données (code-barres d'ADN) des Oedipodinae (Orthoptera: Acrididae) en Algérie.

Le protocole d'extraction d'ADN appliqué lors de notre étude a donné un résultat approprié pour compléter les analyses suivantes. La qualité et la quantité d'ADN extrait ont été examinées par spectrophotomètre NanoDrop et par migration sur gel d'agarose. Les rapports A260/A280 et A260/A230 nous indiquent que l'ADN de trois échantillons a une pureté et une quantité acceptables. Le gel d'agarose révèle que l'ADN extrait est de bonne qualité et qu'aucune dégradation de l'ADN des trois extraits n'a été observée.

L'amplification du gène COI par PCR a réussi et a généré un fragment de taille de 669 pb. Le séquençage a fourni les séquences nécessaires à l'étude phylogénétique. Ces séquences peuvent être soumises à des bases de données internationales telles que l'NCBI ou BOLD.

Ces séquences ont également été importées dans BioEdit v7.2.5 pour la correction et l'alignement, avec 26 séquences appartenant à 8 espèces, par l'algorithme ClustalW. Ensuite, le résultat de l'alignement a été introduit dans MEGA X 10.1.7 afin de construire l'arbre phylogénétique.

Cet arbre phylogénétique confirme que nos trois séquences appartiennent à la même espèce *S.rubescens*, mais il y a une variabilité génétique entre eux, où l'espèce se divise en plusieurs unités. Cela pourrait indiquer une orientation vers une diversité cryptique.

Nous considérons ces nouvelles données comme une ressource importante pour les futures études faunistiques, écologique et de la biodiversité des Oedipodinae (Orthoptera: Acrididae) en Algérie.

Références Bibliographiques

A

Agnés D. 2008. Les critères de reconnaissance de l'espèce, planet vie, ressource en sciences de la vie pour les enseignants. Ecologie.

Ahrens D., Monaghan M.T., Vogler A.P. 2007. DNA _Based taxonomy for associating adults and larvae in multi_species assemblages of chafers (Coleoptera:Scarabaeidae). Molecular phylogenetic and Evolution, 44,436_449.

Alauzet C. 2009.Taxonomie des bactéries anaérobies : de la reclassification a la découverte de nouveaux pathogènes. Thèse doctorat, université de Nancy.

Aljanabi M.S & Martinez I. 1997. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. Nucleic Acids Research, Vol. 25, No. 22, 4692–4693.

_ B_

Beaulieu M. E. 2007. Caractérisation moléculaire des champignons ophiostomatoï des associés à quatre espèces de scolytes de l'écorce colonisant l'épinette blanche au Québec et phylogénie multigénique d'une nouvelle espèce de leptographium. Thèse doctorat, Université Laval, Québec.

Ben Larbi M., Naouaria G., Yahyaoui M.H., Hadded B. 2014. Etude technico-économique de méthodes d'extraction de l'ADN chez le lapin Européen (*Oryctolagus cuniculus*) à partir du sang. Journal of New Sciences 5(1): 5-6.

Brahimi D. 2015. Bio-écologie et régime alimentaire des principales espèces d'Orthoptères dans la région de Naâma. Ecologie et Dynamique des Arthropodes. Thèse de magistère. Université Aboubakr Belkaid–Tlemcen,p.21.

Braud Y., Franc A., Gay P.E. 2014. Les acridiens des formations herbeuses de Madagascar. FAO : Rome.

_ C_

Carrier G. 2011. Bases moléculaires de la variation clonale chez la vigne (*Vitis vinifera* L.): approche pangénomique. Thèse de doctorat, Montpellier, SupAgro, 127p.

Cécile D. 1998. Application des techniques moléculaires de PCR" RFLP" et de PCR-RFLP-SSCP" dans l'étude de la différenciation génétique de deux Huîtres creuses:*Crassostrea gigas* et *Crassostrea anguLata* .Univrsité de pau et de Adour.P8.

Chen H., Rangasamy M., Tan S Y., Wang H., Siegfried B. D. 2010. Evaluation of five methods for total DNA extraction from western corn rootworm beetles. PLoS one, 5(8), e11963. 36(6): 1494-1503.

Cigliano M.M., Braun H., Eades D.C. 2017. Orthropyera Species Fille.Version 5.0/5.0. [10/05/2017]. Disponible sur : <http://Orthoptera.SpeciesFile.org>.

D

Dehondt F. & Mora F. 2013. Atlas des sauterelles, grillons et criquets de Franche Comté : Illustrations commentées du peuple chantant de l'herbe.

Denis T., Possamai S. J., Méreau A. 2018. Principe des techniques de biologie moléculaire et génomique. 3ème édition, Quae, France, p. 47.

Diallo A.B. 2009. Bio-informatique avancée. Université du Québec à Montréal. Canada.

F

Francois L. 2011. L'ADN mitochondrial, une petite molécule devenue star. Jump To Science, université de Genève. Faculté des sciences.

H

Hassani F. 2013. Etude des Caelifères (Orthoptères) et caractérisation floristique (biodiversité floristique) de leur biotope dans des stations localisées à Tlemcen et Ain Temouchent. Régime alimentaire de *Calliptamus barbarus* et *Sphingonotus rubescens*. Ecologie et Environnement. Thèse de doctorat. Université de Telemcen, pp.9-12.

Hawlitshcek O., Morinière J., Kropf M & al. 2016. DNA barcoding of crickets, katydids and grasshoppers (Orthoptera) from Central Europe with focus on Austria, Germany and Switzerland. Molecular Ecology Resources 117 : 1037–1053.

Hebert Paul D.N., Cywinska A., Ball S.L., Jeremy R. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 270: 313–321.

Hebert Paul D.N., Cywinska A., Ball S.L., Jeremy R. 2004. Plos biology, le barcoding moléculaire permet de déterminer l'espèce d'un échantillon.

I

Mauz I., Faugère E. 2013. Les systématiciens à l'épreuve du barcoding. *Revue d'anthropologie des connaissances*, vol.7, n°2, 433 - 459.

L

Louveaux A., Amédégnato C., Poulain S., Desutter-Grandcolas L. 2020. Orthoptères Acridomorpha de l'Afrique du Nord-ouest. Disponible sur : <http://acrinwafrica.mnhn.fr/> .Consulté le : 05/08/2020.

M

Mathieu V. 2007. Modèles markoviens graphiques pour la fusion de données individuelles et d'interactions: application à la classification de gènes : mathématiques appliquées. Thèse de doctorat d'état, université Joseph Fourier, France, 169p.

Meni M.A. 2013. Initiation à la description morphologique et la systématique des Orthoptères acridiens. Mémoire de Master gestion & conservation de la biodiversité. Faculté des Sciences et Techniques Fès. PP 53.

Mireille H., Okassa O. 2010. Congruence entre différenciation morphologique et moléculaire (Barcode moléculaire) pour sept espèces de la famille des Phytoseidae (Acari : Mesostigmata). *Systèmes intégrés en biologie, agronomie, géosciences, hydrosciences, environnement*. Thèse de doctorat. Unité Mixte de Recherche Centre de Biologie et de Gestion des Populations 1062, 2 Place Pierre Viala, 34060 Montpellier cedex, pp.47-51.

A. Moussi, A. Abba. 2011. Desert acridian fauna (Orthoptera, Acridomorpha): comparaison between steppic and oasian habitats in Algeria. *Comptes rendus biologies*, 334 (2).

A. Moussi, L. S. Dey, D. Petit, A. Abba, R. Klessner & M. Husemann. 2018. First genetic data for band-winged grasshoppers (Orthoptera: Acrididae: Oedipodinae) of the Biskra region of Algeria with new records for the country. *African Zoology*, 53(1): 31–40

N

Najimi B., El jaafari S., Jlibene M., Jacquemim J. 2003. Applications des marqueurs moléculaires dans l'amélioration du blé tendre pour la résistance aux maladies et aux insectes. Faculté des sciences, université Moulay Ismail. Département de technologie, vol, 7.17-35.

Naila N., Khalid M., Muhammad A., Junaid R. 2014. Morphological and molecular identification of Acridid grasshoppers Acrididae Orthoptera from Poonch division Azad Jammu Kashmir Pakistan. *Entomology*. p: 5545.

Nijman I. J., Otsen M., Verkaar E.L., Ruijter C., Hanekamp E. 2003. Hybridization of banteng (*Bos javanicus*) and zebu (*Bos indicus*) revealed by mitochondrial DNA, satellite DNA, AFLP and microsatellites. *Heredity*, 90: 10–16.

P

Pei L.L., John C., Chih-yaun H. Young H.K. 2012. Électrophorèse sur gel agarose pour la séparation de fragments d'ADN. Departement of molecular, cell and developmental biology, university of California Los Angeles.

Phillipe D., Deborah C. 2010. NanoDrop Microvolume Quantitation of Nucleic Acids. (45): 2565.

T

Tagliavia M., Massa B., Albanese I., La Farina M. 2011. DNA extraction from orthoptera museum specimens. *Analytical Letters*, 44: 1058–1062.

Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* 28 :2731-2739.

Tan S. C., Yiap B. C. 2009. DNA, RNA, and protein extraction: The past and the present, *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2009: 7-10.

Treuffet J. 2010. Transfert de ligand dans la cytochrome C oxydase observe par des expériences femtosecon des infrarouge intégrées et résolues spectralement. Thèse de doctorat de l'école polytechnique. 183p.

S

Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Science. USA (PNAS)*, 74(12): 5463(7).

Ségologène C. 2020. Alignements splicés et alignements multiples. Université de Lille TAG.

Sid-Ahmed B., Hadeid M., GHodbrani T., Dari O. 2016. Accès à l'eau souterraine et transformations de l'espace oasien : le cas d'Adrar (Sahara du Sud-ouest algérien). *Cahiers de géographie du Québec. Université d'Oran* 2.pp32-33.

V

Varma A., Padh H., Shrivastava N. 2007. Plant genomic DNA isolation: an art or a science. *Biotechnology Journal : Healthcare Nutrition Technology* 2(3):386-392.

Lien Electronique

- <http://lesarthropodes.wifeo.com/introduction-generale-taxinomie.php>
- <https://animaldiversity.org/accounts/Sphingonotus/classification/>
- **Nicolas P. 2008.** Qu'est-ce qu'un barcode moléculaire. Disponible sur <https://planet-vie.ens.fr/thematiques/ecologie/qu-est-ce-qu-un-barcode-moleculaire> .Consulté le:05/08/2020.
- **Magniez F. 2008.** La PCR. Disponible sur <http://www.technobio.fr/article-17071980.html> . Consulté le: 05/08/2020.

Annexe

Annexe 1

Tableau fourni par le NanoDrop

Sample ID	Date	Time	Conc.	Units	A260	A280	260/280	260/230	Conc. Factor (ng/ul)	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw	NA Type
SrA	7/31/2019	12:56	900.09	ng/ul	0.382	0.233	1.64	1.31	50	260	0.382	-0.028	DNA-50
SrBo	7/31/2019	13:02	668.5	ng/ul	13.37	7.193	1.86	1.84	50	260	13.37	0.075	DNA-50
SrC	7/31/2019	13:02	1060	ng/ul	21.21	11.549	1.84	2.01	50	260	21.21	0.039	DNA-50

يمثل الرمز الشريطي الجيني أداة للتعريف السريع للأنواع ، لا سيما الأنواع التي يصعب تحديدها شكليًا. الهدف من دراستنا هو بناء شجرة النشوء والتطور لـ *Sphingonotus* وللمساعدة في بناء قاعدة بياناتها. استخدمنا عينات من *Sphingonotus rubescens* التي تم جمعها من بسكرة وأدرار. تم تطبيق بروتوكول SDS / الفينول / الكلوروفورم لاستخراج الحمض النووي وأنتج مقتطفات ذات جودة وكمية كافية للتضخيم الناجح لجزء 669 زوج القواعد من COI. تم استخدام BioEdit v7.2.5 لمحاذاة الأجزاء المتسلسلة. حيث قمنا بتقديم نتيجة المحاذاة في MEGA X 10.1.7 لبناء شجرة النشوء والتطور بأسلوب الاحتمالية القصوى. أكدت شجرة النشوء والتطور التي تم الحصول عليها أن تسلسلاتنا الثلاثة تنتمي إلى النوع *S. rubescens*.

الكلمات المفتاحية: الباركود ، شجرة النشوء والتطور ، *Sphingonotus rubescens* ، COI ، BioEdit ، MEGA.

Résumé

Le code-barres génétique représente un outil pour l'identification rapide des espèces, en particulier pour les espèces morphologiquement difficiles à identifier. Le but de notre étude est de construire un arbre phylogénétique pour *Sphingonotus* et de contribuer à construire sa base de données. Des spécimens de *Sphingonotus rubescens* collectés à Biskra et Adrar ont été utilisés. Le protocole SDS/phénol/chloroforme a été appliqué pour l'extraction d'ADN et a produit des extraits de qualité et de quantité suffisante pour une amplification réussie du fragment de 669 Pb de COI. Le Bio Edit v7.2.5 a été utilisé pour aligner les fragments séquencés. Le résultat de l'alignement a été introduit dans MEGA X 10.1.7 pour construire l'arbre phylogénétique par la méthode du maximum de vraisemblance. L'arbre phylogénétique obtenu a confirmé que nos trois séquences appartiennent à l'espèce *S. rubescens*

Mots clés : Code-barres ADN, arbre phylogénétique, *Sphingonotus rubescens* , COI, BioEdit, MEGA.

Abstract

The genetic barcode represents a tool for the rapid identification of species, in particular for species that are morphologically difficult to identify. The aim of our study is to build a phylogenetic tree for *Sphingonotus* and to help build its database. Specimens of *Sphingonotus rubescens* collected from Biskra and Adrar were used. The SDS / phenol / chloroform protocol was applied for DNA extraction and produced extracts of sufficient quality and quantity for successful amplification of the 669 bp fragment of COI. BioEdit v7.2.5 was used to align the sequenced fragments. The result of the alignment was introduced in MEGA X 10.1.7 to build the phylogenetic tree by the maximum likelihood method. The phylogenetic tree obtained confirmed that our three sequences belong to the species *S. rubescens*.

Keywords: Barcode DNA, phylogenetic tree, *Sphingonotus rubescens*, COI, BioEdit, MEGA.