



Université Mohamed Khider de Biskra
Faculté des sciences exactes et des sciences de la nature et de la vie
Département des sciences de la nature et de la vie
Filière : Sciences biologiques

Référence2020 / 2021

MÉMOIRE DE MASTER

Spécialité : Biochimie Fondamentale et Appliquée

Présenté et soutenu par :
BARBAR KAOUTHAR

Le: jeudi 1er juillet 2021

DNA barcoding de *Locusta migratoria* (Orthoptera : Acrididae) de la région d'Adrar, Algérie

Jury:

Titre	Belbcir Leila	MAA	Université Mohamed Khider Biskra	Président
Titre	Bengueraichi Fatiha	MAA	Université Mohamed Khider Biskra	Rapporteur
Titre	Zeroual Samir	MAA	Université Mohamed Khider Biskra	Examineur

Année universitaire: 2020 – 2021

Remerciements

Un moment émouvant pour le magistrant est le jour où il entreprend d'écrire ses remerciements. Tout d'abord, cela signifie que la fin est proche, ce qui en soi est une très bonne nouvelle. Les travaux présentés dans cette mémoire ont été effectués à l'université Mohamed Khider Biskra. Ce travail a bénéficié du soutien de plusieurs personnes qu'il me fait plaisir de remercier. En premier lieu, je remercie Dieu le clément et miséricordieux qui par sa grâce m'a permis de réaliser ce modeste travail.

*A mon encadreur **BENGUERAICHI Fatiha**, A l'issue de ce travail de recherche, je tiens tout particulièrement à vous remercier pour avoir accepté de diriger avec beaucoup d'attention et de soin cette mémoire. Par votre dévouement pour la recherche vous avez contribué de manière objective à l'élaboration de cette mémoire, en je fais bénéficier de vos conseils et de votre expérience. Je lui suis très reconnaissante pour sa disponibilité, sa bienveillance et son soutien permanent, et d'avoir prêté un intérêt constant au sujet de la mémoire. Je lui dois beaucoup pour le contenu du travail présenté, pour ses critiques constructives et son aide aux différentes entraves rencontrées, pour sa gentillesse et ses qualités humaines et pour sa confiance. Veuillez trouver ici l'expression de mes remerciements les plus chaleureux.*

Je remercie les membres du jury, d'avoir accepté d'évaluer ce mémoire et tous ceux ou celles qui ont contribué de près ou de loin à l'accomplissement de ce mémoire.

*J'exprime mon remerciements à Monsieur le Pr **MOUSSI Abdelhamid** et à Monsieur le Dr **SOUDANI Abderrahmane**, qui nous ont aidés à fournir le matériel biologique nécessaire pour réaliser ce travail.*

*Je remercie **M Mohammed**, qui a fourni de l'azote liquide et a permis de travailler dans son laboratoire.*

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

Dédicace

Ce travail qui marque la fin des mes études pour l'obtention de mon diplôme de master c'est le moment pour moi de partager cette joie avec les êtres qui me sont les plus chers, dont beaucoup sont des guides pour la réussite de mes études. Je dédie ce travail à : A mes très chers parents BARBAR Ali et DEBILI Khadidja : merci pour m'avoir donné la vie et me soutenu tout au long de mes études. A ma très chère sœur et ma deuxième mère au même temps Fatma: merci pour ton disponibilité, ton amour et humour, ton soutien tout au long de mes études, ton collaboration et tes précieux conseils. A mes frères Mohamed Djaber et Saber : témoignage de ma très grande affection et amour. A ma deuxième famille « mes camarades » et mes très chères copines ; merci pour les cinq années universitaires que nous avons passées et partagées de bon souvenirs.

Table des matières

LISTE DES TABLEAUX.....	I
LISTE DES FIGURES.....	II
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	III
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1 : IDENTIFICATION MOLÉCULAIRE.....	2
1.1. Généralités sur la taxonomie.....	2
1.2. Concept morphologique de l'espèce.....	2
1.3. Concept phylogénétique de l'espèce.....	3
1.4. Barcode moléculaire.....	3
1.4.1. Définition.....	3
1.5. Pourquoi utiliser le barcoding en taxonomie ?.....	4
1.6. Choix de marqueur moléculaire.....	5
1.7. Qu'est ce qu'un bon marqueur génétique.....	5
1.8. Intérêt de l'identification.....	6
CHAPITRE 2. <i>LOCUSTA MIGRATORIA</i>.....	7
2.1. Généralités sur le criquet migrateur <i>Locusta migratoria</i>	7
2.2. Caractéristiques morphologiques de <i>Locusta migratoria</i>	7
2.3. Classification.....	7
2.4. Habitat et écologie.....	8
2.5. Répartition géographique	9
2.5.1. Dans le monde.....	9
2.5.2. En Algérie.....	10
CHAPITRE 3 : MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	11
3.1. Échantillonnage.....	11

3.2. Extraction et séquençage de l'ADN.....	11
3.2.1. Protocole d'extraction d'ADN selon H. Chen et <i>al.</i>	13
3.2.2. Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité.....	13
3.2.2.1. Estimation de la concentration de l'ADN par Nano drop.....	13
3.2.2.2. Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose.....	13
3.2.3. Amplification du gène COI par PCR.....	14
3.2.3.1. Préparation du mélange réactionnel de PCR.....	15
3.2.3.2. Déroulement de la PCR.....	15
3.2.3.3. Visualisation des fragments amplifiés.....	16
3.2.3.4. Elution et purification d'ADN.....	17
3.2.4. Séquençage.....	18
3.2.5. Assemblage et alignement des séquences.....	18
3.2.5.1. Correction de séquences.....	18
3.2.5.2. Alignement de séquences.....	18
3.2.5.3. Reconstruction phylogénétique.....	19

CHAPITRE 4 : RÉSULTATS ET DISCUSSION.....20

4.1. Protocole d'extraction d'ADN selon H. Chen et <i>al.</i>, (2010) (modifié).....	20
4.2. Estimation de la concentration de l'ADN et contrôle de leur qualité.....	20
4.2.1. Estimation de la concentration et de la pureté de l'ADN par Nano Drop.....	20
4.2.1.1. Ratio A260 nm/280 nm.....	21
4.2.1.2. Ratio A260 nm/A230 nm.....	21
4.2.2. Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose.....	22
4.3. Amplification du gène COI par PCR.....	22
4.4. Séquençage.....	23
4.5. DNA barcoding.....	22

CONCLUSION..... 26

BIBLIOGRAPHIE..... 27

ANNEXES

Liste des tableaux

Tableau 1. Taxonomie de <i>Locusta migratoria</i>	8
Tableau 2. Volumes des composants du mélange réactionnel de PCR.....	15
Tableau 3. Programme de PCR.....	16
Tableau 4. Concentration d'ADN extrait et les ratios d'absorbance.....	20
Tableau 5. Pureté de l'échantillon ADN.....	21

Liste des figures

Figure 1. <i>Locusta migratoria</i>	7
Figure 2. Schéma montrant les étapes du protocole d'extraction d'ADN.....	12
Figure 3. Préparation du gel d'agarose.....	14
Figure 4. Schéma montrant les étapes du protocole de visualisation des fragments amplifiés par PCR.....	16
Figure 5. Arbre phylogénétique généré avec la méthode de maximum de vraisemblance (<i>maximum likelihood</i>) basé sur le fragment de gène COI.....	26
Photo 01. Profil électrophorétique montrant l'intégrité de l'ADN génomique sur gel d'agarose.....	22
Photo 02. Profil électrophorétique montrant les fragments cibles du gène COI obtenu par PCR.....	23

Liste des abréviations

- ◆ **ADN** : Acide DésoxyriboNucléique
- ◆ **ARN** : Acide RiboNucléique
- ◆ **BOLD** : Barcode Of Life Database
- ◆ **COI** : Cytochrome Oxydase sous-unité I
- ◆ **CRBt** : Centre de recherche en Biotechnologie « Constanine »
- ◆ **EDTA**: Éthylène Diamine TétraAcétique
- ◆ **pb**: paire de base
- ◆ **PCR** : Polymerase Chain Reaction
- ◆ **SDS** : Sodium DodecylSulfate « PolyAcrylamide Gel Electrophoresis »
- ◆ **TAE** : Tris-Acétate-EDTA
- ◆ **UV**: UltraViolet

Introduction

Introduction

Dans le monde, il existe plus de 12000 espèces d'acridiens dont 500 environ peuvent causer des dégâts à l'agriculture.

La reconnaissance des insectes se réalise par une identification morphologique qui requière des clés complexes différentes pour tous les groupes taxonomique. Cette identification devient encore plus complexe lorsque l'on travaille sur des stades précoces du développement des insectes tels que : œuf, larve et nymphe. Cette identification nécessite le plus souvent les compétences spécifiques des entomologistes. Cependant le développement et l'utilisation d'outils moléculaires rend possible l'identification d'insectes pour tout professionnel chargé de la conservation du patrimoine sans avoir besoin au préalable de connaissance en entomologie.

L'identification est basée sur l'utilisation d'une séquence d'ADN mitochondriale Cytochrome Oxydase I (COI). Une séquence d'ADN est représenté sous forme d'un code génétique constitué d'une succession de lettres AGTC (acide nucléiques). La séquence mitochondrial COI utilisée dans le cadre de l'identification moléculaire est constituée de 650 paires de bases environ et est typique à chaque espèce d'insectes. Le principe est appelé code-barres d'ADN ou Barcoding moléculaire. Un barcode moléculaire est un fragment d'ADN présent chez tous les organismes vivants. La séquence de ce fragment d'ADN est quasiment identique chez des individus qui appartiennent à la même espèce, et permet donc de déterminer l'espèce à laquelle appartient un individu en ne connaissant que la séquence de ce fragment d'ADN.

En ce sens, nous offrons notre contribution à la construction de la base de données (code-barres d'ADN) des Oedipodinae en Adrar et construire de l'arbre phylogénétique du genre *Locusta* pour la classification moléculaire des individus collectés dans cette région.

Première partie.

Partie Bibliographique

Chapitre 01.

Identification moléculaire

Chapitre 1 : Identification moléculaire

1.1. Généralités sur la taxonomie

En santé publique humaine et vétérinaire, en recherche ou par simple curiosité naturaliste, il est important de savoir reconnaître les taxa (entités, unités taxonomiques) auxquels nous sommes confrontés et en particulier l'espèce (Gérard Duvallet, 2017).

La taxonomie en éducation est une classification systématique et hiérarchisée d'objectifs d'apprentissage, définis avec précision et agencés selon un continuum de complexité croissante de développement (Gérard Duvallet, 2017).

La systématique est une discipline scientifique très ancienne qui a pour but d'identifier et de classer les espèces. 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 (Isabelle Mauz, 2013).

Un système de classification permet de résumer efficacement une variété de renseignements sur chaque taxon ou groupe. Une classification naturelle est destinée à refléter les relations généalogiques (historiques, phylogénétiques) connues ou présumées entre ces groupes. Une telle classification est bien sûr liée à la compréhension plus ou moins exacte de l'histoire évolutive d'un groupe et en dépend. Les entomologistes ont des points de vue variés en ce qui a trait à l'histoire évolutive des Insectes et proposent donc des systèmes de classification qui diffèrent considérablement. Les Insectes sont avant tout classés selon la structure de leurs ailes et de leurs pièces buccales et selon le type de métamorphose qui caractérise leur développement (Scudder, 2016).

1.2. Concept morphologique de l'espèce

La notion morphologique de l'espèce est souvent considérée comme une variation du concept de l'espèce typique consistant à réunir en une espèce des individus possédant des caractères morphologiques semblables. Ce n'est pas le cas, car elle est souvent une définition pratique. La morphologie est encore la méthode la plus commune d'identification des espèces : les arthropodes, les flores, les monographies font appel à des critères morphologiques (Site web 1).

Cependant, les critères biologiques de l'espèce, s'ils sont applicables pour certains organismes, ne sont que rarement employés pour l'identification et la taxinomie, pour des raisons pratiques. Dans la plupart des cas, il est impossible d'appliquer le critère précédent du

fait de difficultés de manipulation (limites pratiques) : reproduction complexe ou non maîtrisée, quantité de croisements à tester irréaliste, impossibilité de faire les croisements (fossiles). Ces difficultés ont conduit à la formulation d'un critère morphologique, délimitant une espèce comme un groupe d'individus partageant des caractères diagnostiques propres (« une ressemblance », programme de Terminale) à l'exclusion d'autres groupes semblables. Ce critère peut rencontrer des problèmes lorsque les différences entre deux groupes pourtant isolés sont indétectables (espèces jumelles) ou qu'il y a de très fortes différences entre les individus d'une même espèce (fort dimorphisme sexuel, par exemple) (Site Web 2).

1.3. Concept phylogénétique de l'espèce

La phylogénie moléculaire repose sur l'analyse comparative des séquences d'ADN. Cette discipline vient compléter les méthodes traditionnelles de classification basées sur l'observation des caractères morphologiques et anatomiques. La phylogénie moléculaire utilise les gènes des organismes vivants pour élaborer des arbres phylogénétiques en comparant les caractères moléculaires (séquences nucléotidiques ou protéiques). 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).

1.4. Barcode moléculaire

1.4.1. Définition

Un barcode moléculaire est un fragment d'ADN présent chez tous les organismes vivants. La séquence de ce fragment d'ADN est quasiment identique chez des individus qui appartiennent à la même espèce, et permet donc de déterminer l'espèce à laquelle appartient un individu en ne connaissant que la séquence de ce fragment d'ADN (Site Web 3).

Le fragment choisi est un gène du génome mitochondrial codant pour la première sous-unité du cytochrome oxydase (COI), une protéine qui intervient dans la chaîne respiratoire de la mitochondrie. Chaque cellule contenant de nombreuses mitochondries, le gène COI est présent en de nombreuses copies, ce qui facilite son séquençage. De plus, ce gène présente un niveau de variabilité intéressant : les différences entre les séquences de ce gène chez différents

individus, apparues par mutations au cours du temps, sont faibles entre les individus d'une même espèce et élevées entre des individus d'espèces différentes (Site Web 3).

C'est ainsi que cette séquence d'ADN peut être utilisée, à l'instar des codes-barres utilisés dans le commerce, comme un outil d'identification taxonomique des organismes vivants : tous les individus d'une espèce ont des séquences identiques ou très proches, ce qui va permettre l'identification d'un spécimen en comparant sa séquence avec celles des espèces connues. De nombreux barcodes ADN ont déjà été séquencés pour de nombreux organismes tels que les oiseaux, les poissons ou les insectes, dans le cadre de projets « barcoding of life », lancé en 2003 par P. Hebert et son équipe (Herbet *et al.*, 2003).

1.5. 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.

1.6. Choix de marqueur moléculaire

Les marqueurs moléculaires sont un type de marqueur génétique composé de fragments d'ADN qui servent de repères pour suivre la transmission d'un segment de chromosome d'une génération à l'autre, les marqueurs moléculaires révèlent directement les modifications du patrimoine génétique qu'ils se traduisent ou non par une modification phénotypique (phénotype), physiologique ou biochimique. Ces marqueurs moléculaires sont donc des indicateurs neutres de variabilité génétique qui permettent d'identifier le polymorphisme entre famille, genres, espèces, variétés, populations et même entre individus... Ainsi, les marqueurs moléculaires sont des outils très efficaces pour la phylogénie moléculaire puisqu'ils peuvent établir des relations de parenté entre individus (O.Oyieye, 2010).

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 gène. 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 (O.Oyieye, 2010).

1.7. Qu'est ce qu'un bon marqueur génétique

Un marqueur génétique idéal est :

- polymorphe : la matière première du généticien est la viabilité
- multiallélique
- codominant : l'hétérozygote présente simultanément les caractères de deux parents homozygotes, il peut donc être distingué de chacun homozygote parentaux.

- non épistatique : son génotype peut être lu à partir de son phénotype quel que soit le génotype aux autres locus. La codominance et la non épistasie peuvent être respectivement définies comme l'absence d'interactions intra et inter locus.
- neutre : les substitutions alléliques au locus marqueur n'ont pas d'autres effets phénotypiques (et donc éventuellement sélectifs) que ce qui permettent de déterminer son génotype. Dans leur très grande majorité, les polymorphismes moléculaires sont neutres.

Insensible au milieu : le génotype peut être inféré à partir du phénotype quel que soit le milieu (O.Oyeiye, 2010).

1.8. Intérêt de l'identification

Identifier les espèces d'un système biologique d'intérêt est primordial pour la compréhension du fonctionnement du système. En effet c'est par le nom unique de l'espèce que l'on accède à d'autres informations comme le comportement, la distribution géographique, la susceptibilité aux insecticides ou le rôle épidémiologique de l'entité considérée (Gérard Duvallet, 2017).

Chapitre 02.

Locusta migratoria

Chapitre 2. *Locusta migratoria*

2.1. Généralités sur le criquet migrateur *Locusta migratoria*

Le Criquet migrateur, *Locusta migratoria*, est un ravageur agricole notoire dans le monde entier. Comme d'autres espèces acridiennes, le Criquet migrateur présente des caractéristiques remarquables, telles qu'une transition de phase dépendant de la densité et une migration sur de longues distances, observée notamment sous forme d'essaims volants (Boris Uvarov S. , 1977; Boris Uvarov S. , 1966). La capacité migratoire de cette espèce de criquet se reflète dans sa vaste répartition, allant des zones tempérées aux zones tropicales de l'Ancien Monde (C. Ma et *al.*, 2012).

2.2. Caractéristiques morphologiques de *Locusta migratoria*

Espèce robustes de grande taille. Polymorphisme phasaire : Pronotum tectiforme et grosse tête globuleuse (solitaires), ou pronotum en selle (grégaires) coupé uniquement par le sillon typique. Tegmina dépassant l'apex des fémurs. Fémurs minces. Couleur uniforme ocre, brune ou verte. Pronotum à carène médiane très convexe ; bord postérieur en angle aigu ou droit. Tibias postérieurs beiges à rouges, rougeâtres. Rapport tegmen/fémur postérieur inférieur à 2. Ailes hyalines, vert jaunâtre dans le tiers basal. Mâle beaucoup plus petit que la femelle (Prakoso, 2017).



Figure 1. *Locusta migratoria* (Prakoso, 2017).

2.3. Classification

Taxonomiquement, le criquet migrateur *L. migratoria* est la seule espèce du genre *Locusta* de la sous-famille des Oedipodinae et le tableau 2 présente sa classification. Compte tenu de leur vaste répartition géographique, de nombreuses populations géographiques des

espèces de criquets migrants présentent des variations dans leur morphologie, leur cycle biologique, leur physiologie et d'autres caractéristiques biologiques (C.Ma et al., 2012).

Tableau 1. Taxonomie de *Locusta migratoria* (Fabricius, 1781)

Règne	Animal
Embranchement	Arthropodes
Sous- embranchement	Antennates
Classe	Insectes
Sous-classe	Ptérygotes
Section	Néoptères
Sous section	Néoptères exopterygogènes
Super-ordre	Orthopteroïdes
Ordre	Orthoptera
Sous ordre	Caelifera
Super-famille	Acridoïdea
Famille	Acrididae
Sous-famille	Oedipodinae
Genre	<i>Locusta</i>
Espèce	<i>Locusta migratoria</i>

2.4. Habitat et écologie

Espèce méditerranéenne présente en faible densité en plaine sur la frange littorale Méditerranée-Atlantique et dans l'Atlas tellien. Deux générations avec des oeufs diapausant ou non. Graminivore, fait localement des dégâts dans le sud algérien, Adrar, El Golea, sur les cultures de céréales sur pivots (Ould el Hadj, 2002 ; Benfekih, 2006). Dans l'Adrar, la deuxième génération de printemps-été donne une 3^{ème} génération d'hiver se reproduisant en post-diapause au début du printemps suivant (Benfekih et Petit, 2010). En faible densité dans des milieux secs. En période de pullulations, ils atteignent la phase transies, mais n'ont pas été observés grégaires (Benfekih et al. 2011).

2.5. Répartition géographique

2.5.1. Dans le monde

Le criquet migrateur fait partie des locustes, tout comme le criquet pèlerin ou le criquet nomade. Il existe au moins 12000 espèces d'acridiens (famille des criquets) dont environ 500 sont nuisibles à l'agriculture. La partie la plus aride de l'île, dans le bassin du lac Tchad et dans la région du Nil bleu au Soudan. Il est également connu sur le pourtour du bassin méditerranéen, en Asie Orientale et en Australie. Il sévit dans les steppes et savanes et se nourrit de céréales (BENKENANA, 2016).

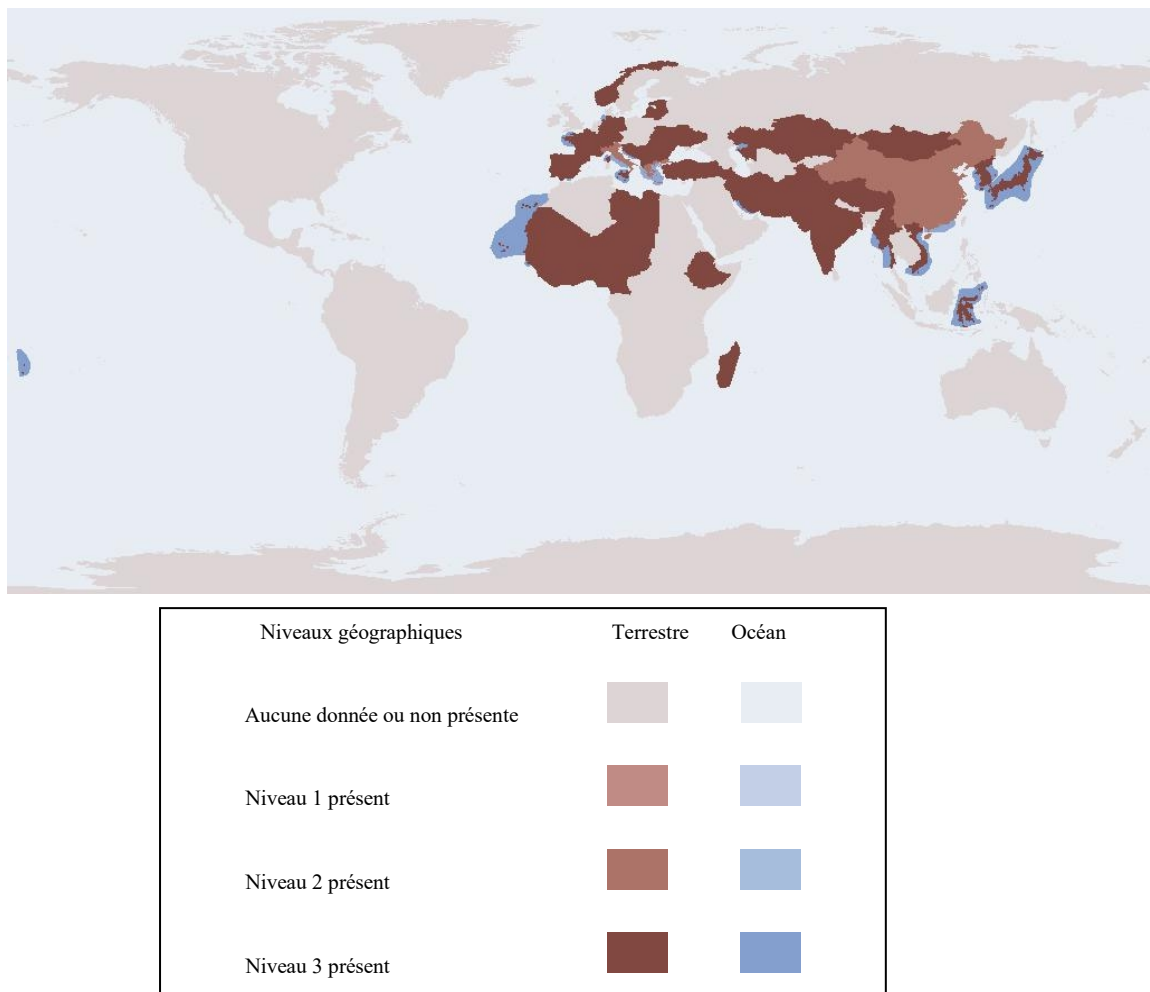


Figure 2. Répartition de l'espèce *Locusta migratoria* dans le monde selon Orthoptera Species File.

2.5.2. En Algérie

Plaines littorales de Tlemcen à El Kala: Lalla Maghnia [Tlemcen], Oran, Bordj Menaiel [Boumerdes], Matifou [Alger], Bouzarea [Alger], Fort de l'eau (= Bordj el Kiffan) (MNHN). Skikda, Chabet el Aneur [Tizi Ouzou] (MNHN) ; Arbaoun (= Beni Aziz) [Setif], Bou Saada [M'Sila], Tikjda [Bouira], Lac Goulmin [Tizi Ouzou] (Maurel, 2008). Plateaux steppiques: Batna, Chellala [Tiaret] (MNHN). Oasis : Bechar (MNHN) ; Biskra, El-Oued, Ghardaia, Ouargla, Laghouat, El Golea, Berriane, El Guerrara, Tamanrasset (Ould Elhadj, 2002 ; Benfekih, 2005 ; Moussi et *al.*, 2018) ; Biskra région sud (Harrat et Moussi, 2007). . Périmètres irrigués du Sahara Central, Adrar (Benfekih, 2005 ; Benfekih et *al.*, 2002 ; Benfekih et Petit, 2010).

Deuxième partie.

Partie expérimentale

Chapitre 3.

Matériel et méthodes

Chapitre 3 : Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes

3.1. Échantillonnage

Cette étude a été menée sur des échantillons collectés dans la région d'Adrar. Les spécimens ont été capturés soit à la main soit avec un filet fauchoir par Dr Soudani Abderrahmane le 05/09/2019. Un total de 6 individus de l'espèce *Locusta migratoria* ont été collectés et conservés dans de l'éthanol absolu (100%) à 4°C jusqu'à l'extraction de l'ADN, et leur morphologie a été déterminée par le professeur Moussi Abdelhamid.

3.2. Extraction et séquençage de l'ADN

L'ADN s'est révélé être un outil très puissant pour aider dans l'identification des espèces (Eaton et al., 2009). Etant donné que l'industrie des biotechnologies continue de se développer et que le prix du séquençage moléculaire baisse, les diagnostics basés sur l'ADN représentent une méthode beaucoup plus efficace en terme de traçabilité dans l'identification de routine des différents groupes taxonomiques. Avec une base de données exhaustive, l'ADN génomique extrait des spécimens est utilisé pour les identifier jusqu'au niveau de l'espèce (Dawnay et al., 2007). À cet effet, la sous unité I du cytochrome c oxydase (COI) du génome mitochondrial est devenu un standard universel dans l'identification des espèces en utilisant les « codes-barres » génétiques.

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

Le tissu musculaire du fémur postérieur a été utilisé pour extraire l'ADN génomique. On a mis le tissu de chaque individu dans un micro-tube de 1.5 ml et appliqué le protocole suivants.

- ❖ 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 ;
- ❖ Le tampon de lyse SDS se compose de 0.5% (w/v) SDS dilué dans 200 mM Tris, 25 mM EDTA, 250 mM Na Cl;
- ❖ Les étapes du protocole d'extraction d'ADN sont résumées par un schéma simple.

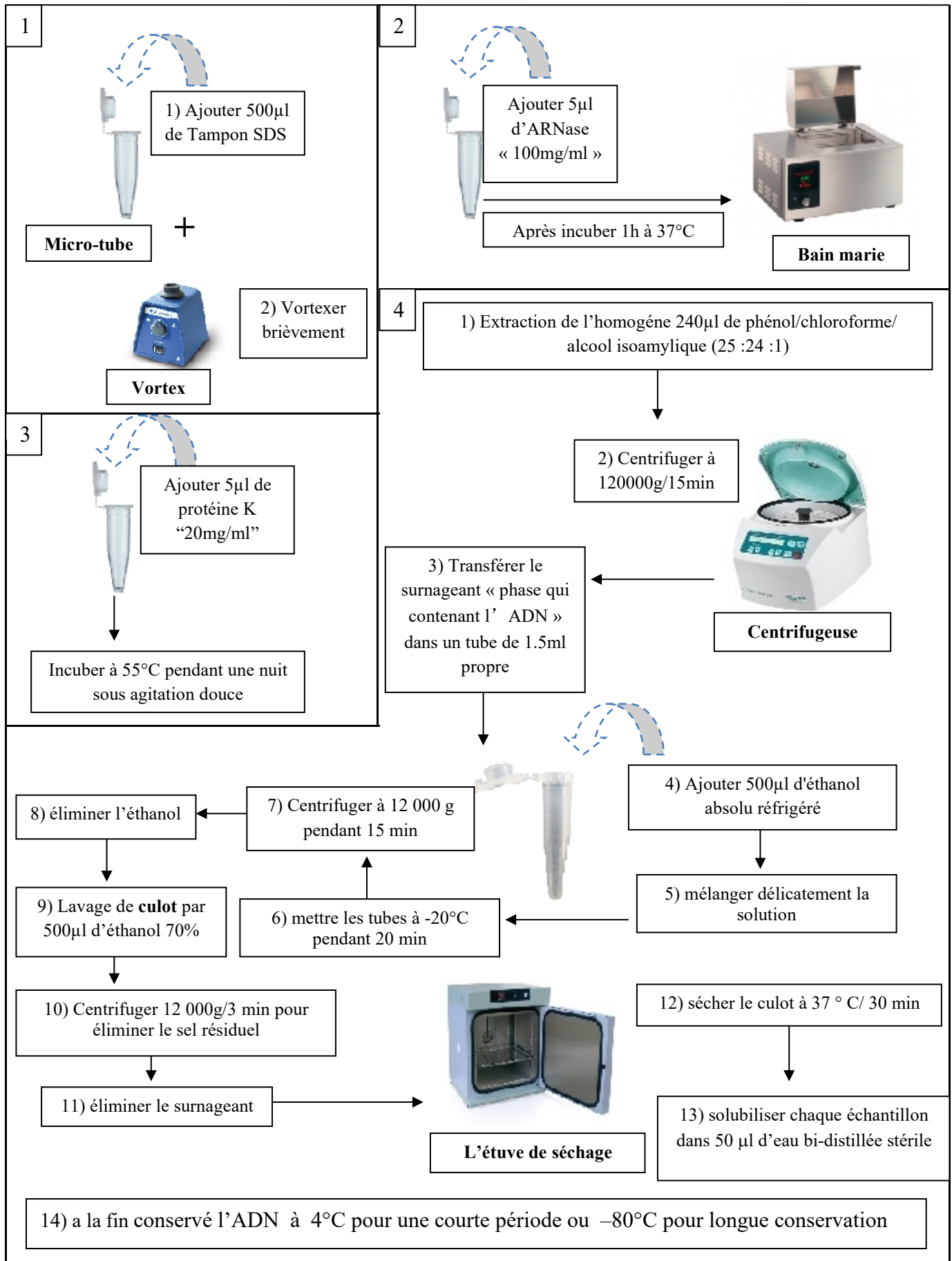


Figure 2. Schéma montrant les étapes du protocole d'extraction d'ADN

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

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

Il y'a deux méthodes sont couramment utilisées pour la quantification de l'ADN :

- La spectrométrie basée sur la mesure de l'absorbance des acides nucléiques dans l'UV.
- La fluorométrie basée sur la mesure de la fluorescence des fluorophores spécifiques des acides nucléiques

Le spectrophotomètre permet de mesurer les absorbances dans l'UV et l'appareil le plus utilisé est le NanoDrop. Cet appareil a l'avantage d'utiliser seulement 1 μL d'échantillon sans avoir besoin d'utiliser de réactif ou de solution supplémentaires pour les mesures. La gamme dynamique de la quantification sur le NanoDrop est large allant de 0,2 $\text{ng}/\mu\text{L}$ à 27 500 $\text{ng}/\mu\text{L}$ pour un ADN double brin.

Même après une purification, les ADN ou les ARN peuvent encore contenir des contaminants. Certains contaminants impactent significativement les applications de biologie moléculaire et sont responsables d'analyses erronées, de résultats incohérents ou non reproductibles ... Il est alors important de contrôler systématiquement la pureté des acides nucléiques en amont de toute application pour identifier les contaminants. La spectrophotométrie est la méthode qui permette de vérifier la pureté d'un acide nucléique grâce aux deux ratios $A_{260 \text{ nm}}/A_{280 \text{ nm}}$ et $A_{260 \text{ nm}}/A_{230 \text{ nm}}$.

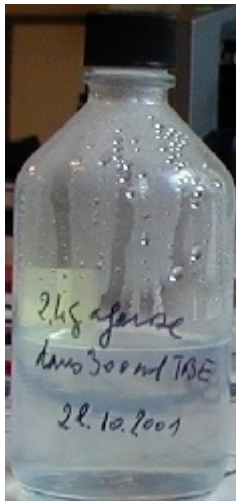
3.2.2.2. Contrôle de la qualité d'ADN sur gel d'agarose

L'analyse des fragments d'ADN en fonction de leur taille est un procédé usuel en biologie moléculaire. Cette méthode repose sur une technique électrophorétique qui peut s'utiliser sur différents supports. L'agarose, qui est un polysaccharide extrait d'une algue, permet d'analyser de manière très simple des fragments d'ADN d'une centaine à quelques dizaines de milliers de nucléotides, obtenus après hydrolyse par des endonucléases de restriction ou amplifiés par PCR (S.Korchane,2014).

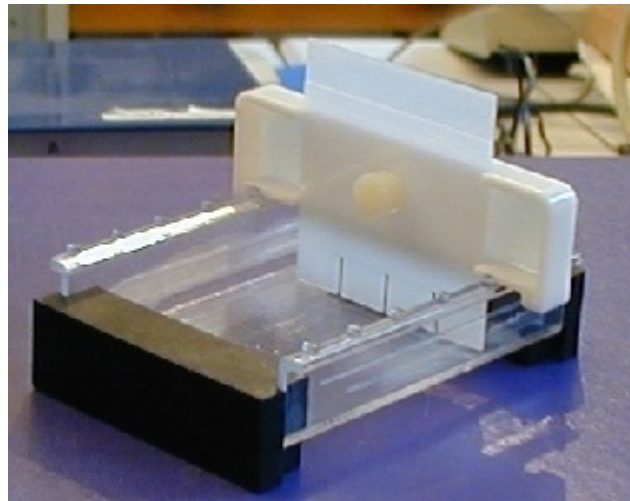
➤ Préparation de gel d'agarose

- Mélanger tampon TAE et agarose à raison de 0,8 g d'agarose pour 100 mL de tampon (la proportion d'agarose dépend de la taille des molécules d'ADN à séparer) ;
- Faire fondre l'agarose au four à micro-ondes en surveillant pour éviter les projections ou au bain marie. Agiter de temps à autre pour homogénéiser le mélange ;

- Laisser refroidir jusqu'à ce qu'il devienne possible de saisir le flacon à main nue (environ 60 °C) ;
- Placer les joints fournis avec la cuve pour fermer le support de gel et positionner le peigne à 1 mm du fond et à environ 1 cm de l'extrémité du support. Régler le niveau pour que le support de gel soit horizontal ;
- Certains peignes sont réglables avec une vis : il y a alors une cale pour régler leur hauteur. D'autres sont pré-adaptés au support et ne nécessitent pas de cale ;
- Couler lentement le gel sur 3 à 5 mm d'épaisseur en veillant à ce qu'il entoure bien les dents du peigne ;
- Laisser refroidir, enlever le peigne et les joints. Le gel est prêt pour le dépôt des échantillons ;



Gel d'agarose
(0,8 g/100 mL)



Mise en place du peigne et des joints de coulage
(minicuve pour gel 8 x 6,5 cm)

Figure 3. Préparation du gel d'agarose

3.2.3. Amplification du gène COI par PCR

La PCR (Polymerase Chain Reaction ou réaction de polymérase en chaîne) est une technique d'amplification d'ADN *in vitro*. Elle permet d'obtenir un très grand nombre de copies d'une séquence d'ADN choisie.

Chaque cycle de PCR est constitué de trois étapes: **une dénaturation de l'ADN** par chauffage pour séparer les deux brins qui le composent, **une hybridation des amorces** aux extrémités de la séquence recherchée, puis **une élongation** grâce à l'action d'une

ADN polymérase. Ce cycle est répété un grand nombre de fois pour obtenir une multiplication exponentielle de la séquence d'ADN cible. La réaction de PCR se fait dans un thermocycleur. Le thermocycleur est alors programmé pour effectuer les différents cycles de la PCR. Ainsi, chaque cycle est composé d'une succession de paliers de température prédéterminée, et d'une durée bien définie.

- Les amorces utilisées sont:


COBU 5'-TYTCAACAAAYCAYAARGATATTGG-3'

COBL 5'-TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3' selon Huang et *al.*, 2013

3.2.3.1. Préparation du mélange réactionnel de PCR

Tableau 2. Volumes des composants du mélange réactionnel de PCR

Mix de PCR	Quantité (en μ l)
AND	100 μ g (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)	1
Amorce sens (10 mM)	1,5
Amorce antisens (10 mM)	1,5
H ₂ O distillé	QSP

 Le volume total est : 50 μ l.

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

3.2.3.2. Déroulement de la PCR

Les tubes contenant le mélange à amplifier sont placés dans le thermocycleur « Techne, Grande bretagne », selon le programme indiqué dans le tableau 2.

Tableau 3. Programme de PCR

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

3.2.3.3. Visualisation des fragments amplifiés

Les produits d'amplification sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose à 1% quand la réaction de PCR est achevée.

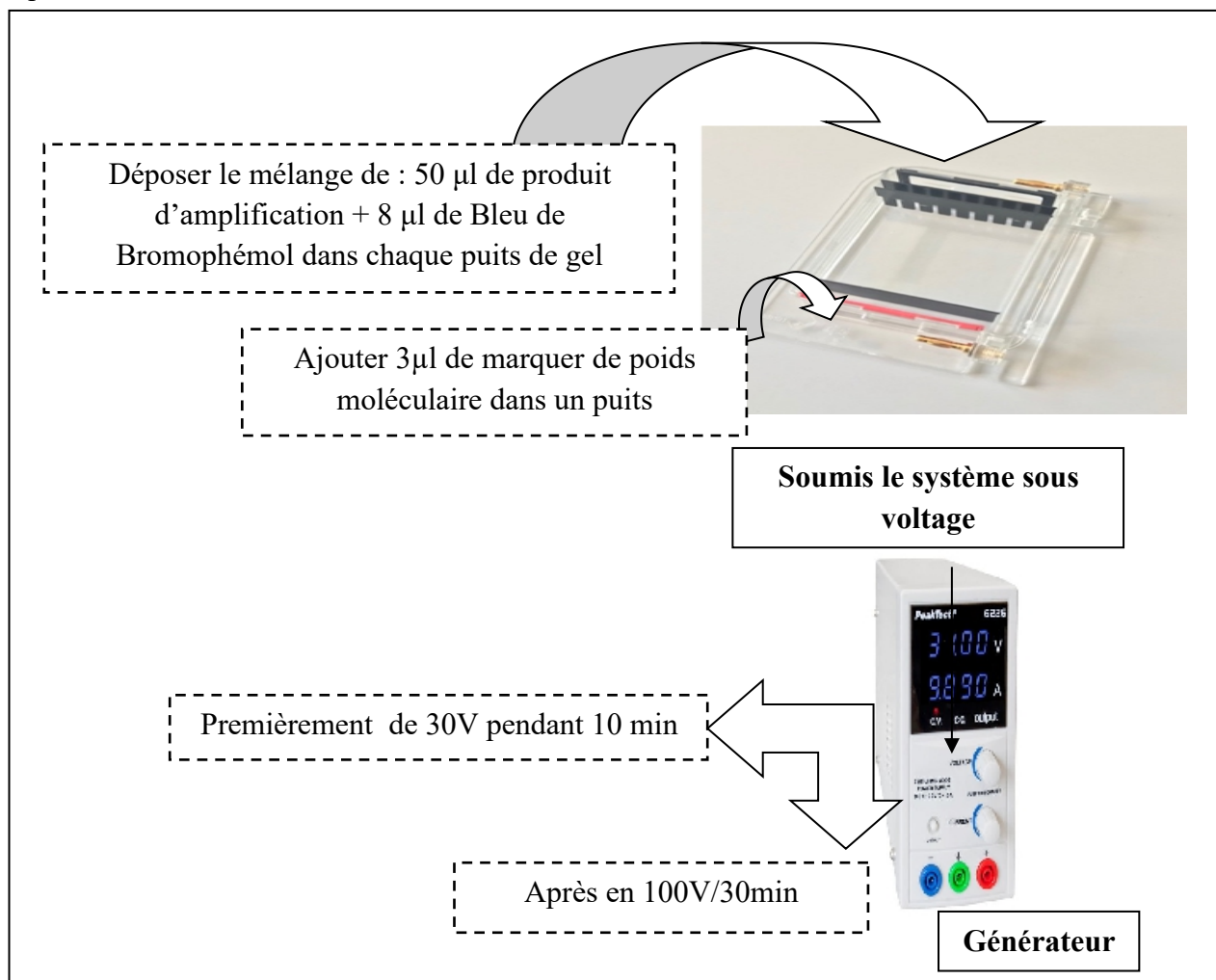


Figure 4. Schéma montrant les étapes de visualisation des fragments amplifiés.

3.2.3.4. 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

- 1- **Exciser la bande.** Exciser le fragment d'ADN d'intérêt du gel d'agarose avec un scalpel ou une lame de rasoir propre et aiguisé. Coupez l'excès de gel pour minimiser la quantité d'agarose;
- 2- **Peser le gel.** Pesez la tranche de gel dans un tube incolore taré ;
- 3- **Solubiliser le gel.** Ajoutez 3 volumes de gel de la solution de solubilisation du gel à la tranche de gel. En d'autres termes, pour chaque tranche de 100 mg de gel d'agarose, ajouter 300 µl de solution de solubilisation du gel. Incuber le mélange de gel à 50-60 °C pendant 10 minutes, ou jusqu'à ce que la tranche de gel soit complètement dissoute. Vortexer brièvement toutes les 2-3 minutes pendant l'incubation pour aider à dissoudre le gel;
- 4- **Préparer la colonne de liaison.** Placer la colonne G GenElute dans un tube de collecte de 2 ml (fournis). Ajouter 500 µl de la solution de préparation de colonne à chaque colonne de liaison. Centrifuger pendant 1 minute. Jeter le liquide d'écoulement. (La solution de préparation de colonne maximise la liaison de l'ADN à la membrane, ce qui se traduit par des rendements plus cohérents);
- 5- **Ajouter de l'isopropanol.** Ajouter 1 volume de gel d'isopropanol à 100% et mélanger brièvement jusqu'à ce que le gel soit homogène ;
- 6- **Lier l'ADN.** Charger le mélange de solution de gel solubilisé de l'étape 5 dans la colonne de liaison qui est assemblée dans un tube de collecte de 2 ml ;
- 7- **Laver la colonne.** Ajouter 700 µl de la 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. Remettre 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;
- 8- **Eluer l'ADN.** Transférer la colonne de liaison à un tube de collecte frais. Ajouter 50 µl de solution d'éluion au centre de la membrane et incuber pendant 1 minute. Centrifuger pendant 1 minute.

3.2.4. Séquençage

Le séquençage d'un ADN, c'est-à-dire la détermination de la succession des nucléotides le composant, est aujourd'hui une technique de routine pour les laboratoires de biologie. Cette technique utilise les connaissances qui ont été acquises depuis une trentaine d'années sur les mécanismes de la réplication de l'ADN.

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

3.2.5. Assemblage et alignement des séquences

3.2.5.1. Correction de séquences

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

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 par la comparaison de la séquence nucléotidique obtenue avec le chromatogramme (GHANIA, 2011).

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 SYSTEM respectivement par une analyse des séquences qui évaluée par rapport à toutes les séquences.

3.2.5.2. Alignement de séquences

Les séquences sont disposées de manière à maximiser la similitude entre elles au cours d'alignement qui ce dernier consiste à poser pour chacun des sites des séquences comparées une hypothèse d'homologie primaire.

Le résultat de l'alignement permet d'estimer le degré de diversité nucléotidique au sein d'une matrice d'alignement. Les séquences ont été alignées en utilisant l'algorithme Clustal W (Thompson *et al.*, 2002) à l'aide de MEGA X 10.1.7 (Kumar *et al.*, 2018) avec des paramètres par défaut .

3.2.5.3. Reconstruction phylogénétique

La phylogénétique, considérée comme synonyme de la phylogénie, met en exergue les liens de parenté entre les organismes, de leur généalogie (classification, méthode de reconstruction phylogénétique), ou qui est relatif au cours de l'évolution d'un groupe. Elle est la branche de la génétique qui étudie les modifications génétiques des espèces au cours de l'évolution (BENKENANA, 2016).

La phylogénie moléculaire a pour but de reconstruire les relations de parenté entre des séquences de nucléotides ou d'acides aminés. On peut ainsi étudier les relations de parenté entre les espèces qui les portent mais, aussi, l'évolution du génome. L'arbre phylogénétique est une construction-clé dans l'histoire de la biologie et de la géologie. Son succès opérationnel ne s'est jamais démenti (BENKENANA, 2016).

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

Chapitre 4 : résultats et discussion

Ce chapitre présente les résultats qui sont obtenus par l'extraction d'ADN au genre *Locusta migratoria* puis l'amplification des fragments par le marqueur des gènes COI ensuite son séquençage et à la fin la construction d'arbre phylogénétique pour ces individus.

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

Dans la biologie moléculaire et ses applications l'isolement de l'acide nucléique ADN est une étape très importante et essentielle.

L'application de protocole de l'extraction d'ADN, H.Chen et *al.* (2010), est donné 5/6 extraits d'ADN génomique avec une bonne qualité et quantité.

Les modifications apportées à ce protocole sont :

- On a 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) ;
- On a 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 à été examiné par spectrophotométrie Nano Drop et par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8%.

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

Le tableau 4 ci-dessous résume la concentration de l'ADN extrait et les ratios d'absorbances résultants par le spectrophotomètre Nano Drop qui ce dernier estimé la pureté et la quantité de l'ADN (le tableau obtenu par le Nanodrop est représenté en annexe 1).

Tableau 4. Concentration d'ADN extrait et les ratios d'absorbance.

Echantillon	Concentration	Units	260/280	260/230
E1	817.6	ng/μl	1.84	1.99
E2	654.7		1.74	1.69
E3	64.07		1.59	0.92
E4	635.2		1.75	1.8
E5	160.1		1.75	1.56
E6	171.6		1.81	1.4

Tableau 5. Pureté de l'échantillon ADN

Ratio	Valeur	Indication de pureté
260/280	1,8	ADN pur
	< 1,8	Présence de protéines, phénol et autres contaminants
	> 1,8	Contamination ARN
260/230	2,0 - 2,2	ADN pur
	< 2,0	Contaminants co-purifiés (solvants, sels, contaminants organiques)

4.2.1.1. Ratio A260 nm/280 nm

Initialement en 1942, Warburg et Christian avaient publié un rapport expliquant l'intérêt de l'utilisation du ratio A260 nm/280 nm pour détecter la contamination d'acides nucléiques présente dans une solution de protéines. Maintenant, ce ratio est plus souvent utilisé pour évaluer la contamination de protéines dans une solution d'acides nucléiques.

D'une manière générale, 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.

Comme ce ratio varie significativement en fonction du pH et de la force ionique, il est important de prendre en compte ces paramètres pour interpréter ce ratio.

Le rapport 260/280 des échantillons E2, E3, E4 et E5 est inférieure à 1.8 alors que ce rapport est compris entre 1,8 – 2,0 pour les échantillons E1 et E6. Ces résultats nous indiquent que les extraits d'ADN de quatre échantillons sont légèrement contaminés par des protéines et que l'extrait d'ADN de deux échantillons (E1 et E6) est pur.

4.2.1.2. Ratio A260 nm/A230 nm

Le ratio A260/A230 est un deuxième indicateur de pureté, il est généralement plus élevé que le ratio A260/A280. Un ratio A260/A230 compris entre 2,0 – 2,2 indique une bonne pureté des acides nucléiques. Lorsque ce ratio est significativement plus faible que 2,0 – 2,2, cela révèle la présence de contaminants absorbant à 230 nm dans la solution. Plusieurs contaminants absorbant à 230 nm proviennent de l'échantillon ou de la purification, comme

par exemple le phénol, l'isothiocyanate de guanidine, les carbohydrates, les peptides, l'EDTA, les polysaccharides Leur présence est détectable grâce à ce ratio.

Nos résultats obtenus indiquent que les valeurs des tous échantillons sont inférieurs ou l'intervalle [2,0-2,2] c'est-à-dire que ils sont contaminés par le phénol qui n'est pas éliminé totalement au cours de l'extraction d'ADN.

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

Dans le gel d'agarose coloré au bromure d'éthidium, les bandes d'ADN des échantillons E1, E2, E4, E5 et E6 montrent que les extraits d'ADN sont de bonne qualité (ADN intact) (Photo 01).

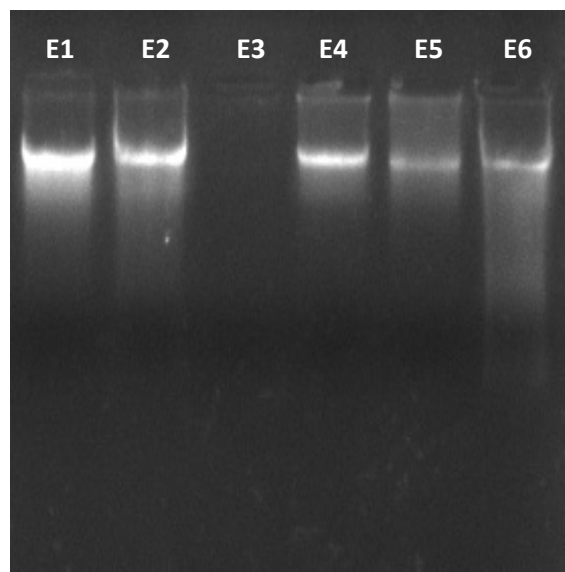


Photo 01. Profil électrophorétique montrant l'intégrité de l'ADN génomique sur gel d'agarose à 0,8% à 100 volts pendant 30 min, après coloration au bromure d'éthidium et visualisation sur UV.

On a constaté que tous les échantillons ont une bonne quantité et qualité sauf l'échantillon numéro 3.

4.3. Amplification du gène COI par PCR

La PCR amplifie l'ADN génomique par l'utilisation des amorces spécifiques produisant un fragment de taille 658 pb. L'amplification réussie a été confirmée par électrophorèse sur un gel d'agarose à 1% (Photo 02).

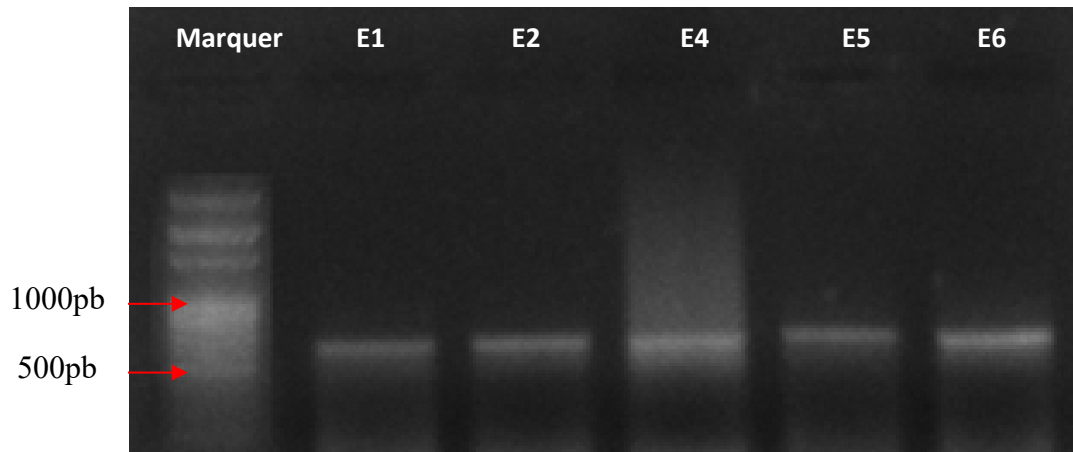


Photo 02. Profil électrophorétique montrant les fragments cibles du gène COI obtenu par PCR. Un fragment de 656 pb a été amplifié par PCR dans les conditions indiqués préalablement et qui correspond à une séquence ciblée de COI. Cette séquence a été migrée sur gel d'agarose à 1% et visualisée sur UV après coloration au bromure d'éthidium. Marqueur : marqueur du poids moléculaire 100 pb ladder.

4.4. Séquençage

Le centre de recherche en biotechnologie de Constantine nous a fourni des séquences de bonne qualité qui peuvent être utilisées pour construire l'arbre phylogénétique.

4.5. DNA barcoding

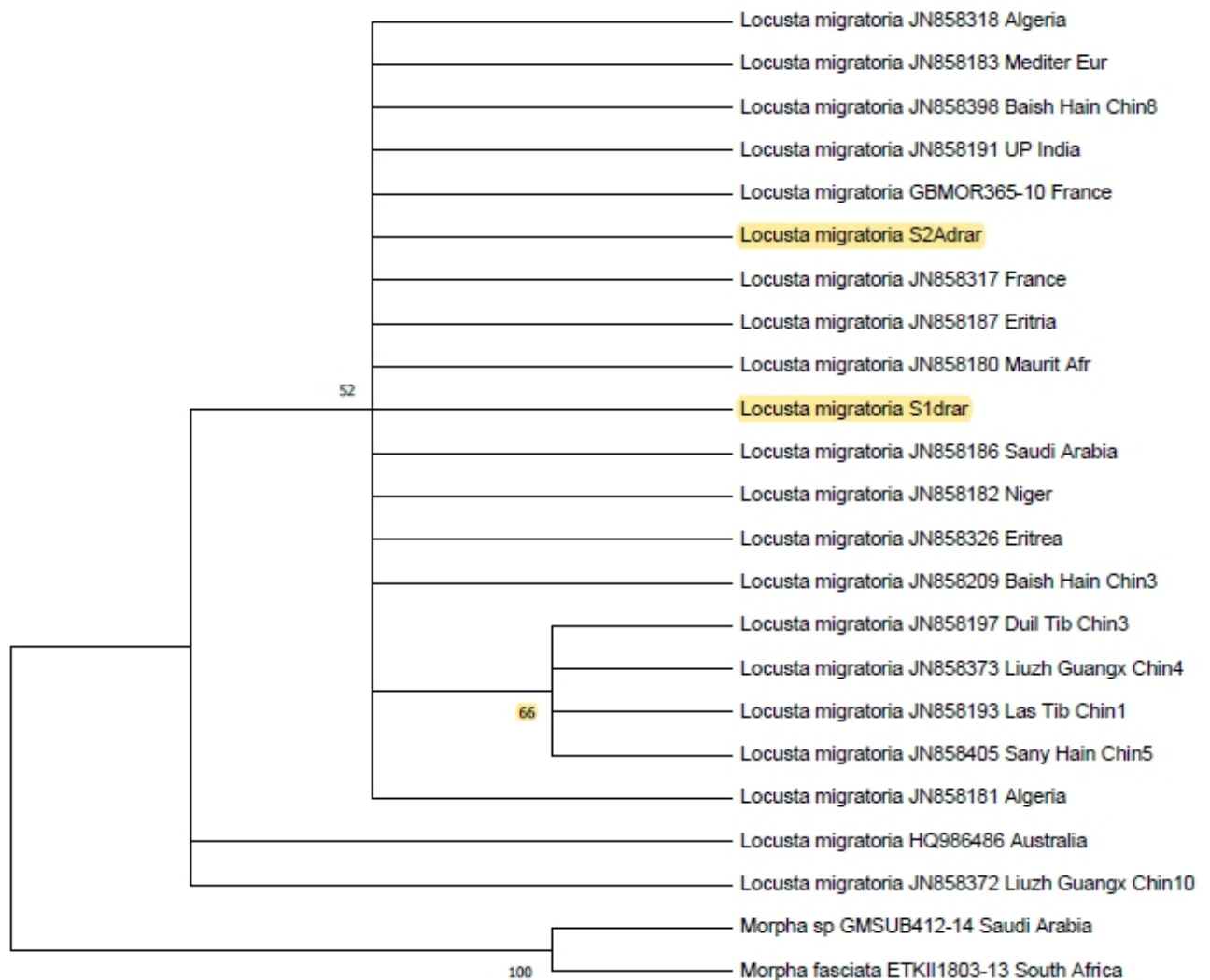


Figure 5. Arbre phylogénétique construit par la méthode de maximum de vraisemblance (*Maximum Likelihood*) basé sur l'ensemble de données du gène COI. Les valeurs aux nœuds représentent le bootstrap.

Nous avons inclus un total de 23 séquences appartenant à 2 espèces dans les analyses, 2 spécimens appartenant à l'espèce *Locusta migratoria* ont été récemment séquencés, 19 séquences supplémentaires de *Locusta migratoria* ont été obtenues à partir des bases de données NCBI et BOLD et deux séquences appartenant au genre *Morphacris* ont été utilisées comme out-groupe.

L'arbre phylogénétique montre un seul clade réunissant toutes les séquences de *Locusta migratoria*. Malgré que cet arbre phylogénétique confirme que nos deux séquences appartiennent à la même espèce *L. migratoria*, il y a une variabilité génétique entre eux

dont l'espèce se divise en plusieurs unités. Cela pourrait indiquer une orientation vers une diversité cryptique. C'est pourquoi, d'autres analyses génétiques sont nécessaires.

Cet arbre phylogénique confirme la présence de *Locusta migratoria* en Adrar dont présente les deux séquences étudiées « S1 et S2 » alors qu'il faut l'OSF de actualiser ses données sur cette espèce et cité l'Algérie dans la carte géographique de sa distribution.

Conclusion

Conclusion

Notre recherche a été menée dans l'identification moléculaire de l'espèce *Locusta migratoria* dans le sud algérien de la région d'Adrar par la construction de l'arbre phylogénétique.

Le protocole d'extraction d'ADN appliqué dans notre étude a présenté 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 indiquons que l'ADN des échantillons a une pureté et une quantité acceptables sauf l'échantillon 3. Le gel d'agarose révèle que l'ADN extrait est de bonne qualité et qu'aucune dégradation de l'ADN des extraits n'a été observée.

L'amplification du gène COI par PCR produit des fragments d'une taille de 658 pb. Le séquençage a fourni les séquences nécessaires à l'étude phylogénétique. Ces séquences savent être soumises à des bases de données internationales telles que l'NCBI ou BOLD.

Les deux séquences obtenues ont également été importées dans BioEdit v7.2.5 pour la correction puis importées à MEGA X 10.1.7 pour l'alignement, avec 21 séquences appartenant à 2 espèces, par l'algorithme ClustalW. Ensuite, le résultat de l'alignement a été utilisé par MEGA X 10.1.7 afin de construire l'arbre phylogénétique

L'arbre phylogénétique a confirmé l'identification morphologique de nos individus qui appartenant à la même espèce *Locusta migratoria*.

Bibliographie

Bibliographie

- Abdelhamid Moussi, Abba A., Harrat A. and Daniel Pierre Petit. 2011. Desert acridian fauna (Orthoptera, Acridomorpha): Comparison between steppic and oasian habitats in Algeria . *Comptes Rendus Biologies* 334(2):158-67
- Benfekih L. 2016. Recherche quantitatives sur le criquet migrateur *Locusta migratoria* dans le sahara algérien: acridologie. Thèse de doctorat d'état, Institut National Agronomique EL HARRACH, ALGERIE, 181p.
- BENKENANA N. 2016. Analyse biosystématique, écologique et quelques aspects de la biologie des espèces acridiennes. Thèse de doctorat d'état, Biologie Entomologie Acridologie, constantine, Algérie.
- Boris Uvarov S. 1966. *Grasshoppers and locusts*. London: Centre for Overseas Pest Research.
- Boris Uvarov S. 1977. *Grasshoppers and locusts*. London: Centre for Overseas Pest Research.
- Ma, C., Yang, P., Jiang, F., Chapuis, M. P., Shali, Y., Sword, G. A., & Kang, L. (2012). Mitochondrial genomes reveal the global phylogeography and dispersal routes of the migratory locust. *Molecular ecology*, 21(17), 4344–4358.
- Gérard Duvallet D. F. 2017. Entomologie médicale et vétérinaire , Versailles: INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT, Marseille. 688p.
- GHANIA B. 2011. Effet du laurier rose sur le criquet migrateur. EL HARRACH, zoologie agricole et forestière. Algérie. 148p.
- Isabelle Mauz E. F. 2013. LES SYSTEMECIENS A L'EPREUVE DU BARCORDING. *Revue d'anthropologie des connaissances* 433-459.
- Huang J, Zhang A, Mao S, Huang Y (2013) DNA Barcoding and Species Boundary Delimitation of Selected Species of Chinese Acridoidea (Orthoptera: Caelifera). *PLoS ONE* 8(12)
- Malaury L. 2015. Sodium Lauryl Ether Sulfate CAS No.68585-34-2

- Meir Paul Pener S. J. 2009. *Advances in Insect Physiology*, vol. 59. ELSEVIER, Amestrdam.182p.
- Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, Fassan M, Mafficini A, Malpeli G 2013. DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. *Plos One*, 8(6):e62692
- Oyieye H. 2010. Congruence entre différenciation morphologique et moléculaire (Barcode moléculaire) pour sept espèces de la famille des Phytoseiidae (Acari : Mesostigmata). Thèse de doctorat, École doctorale : Systèmes Intégrés en Biologie, Agronomie, Géosciences, Hydrosociences, Environnement, Paris, 297p.
- Prakoso B. 2017. Biodiversitas Belalang (Acrididae: ordo Orthoptera) pada Agroekosistem (zea maysl.) dan Ekosistem Hutan Tanaman di Kebun Raya Baturaden, Banyumas . Université Ma'arif Nahdlatul Ulama (UMNU) Kebumen, Indonesia. (34)2:80-88.
- Scudder, G., *Classification des Insectes (2015)*. Dans *l'Encyclopédie Canadienne*. Repéré à <https://www.thecanadianencyclopedia.ca/fr/article/classification-des-insectes>
- Sid-Ahmed BELLAL, Mohamed HADEID, Tarik GHODBANI et Ouassini DARI. 2016. Accès à l'eau souterraine et transformations de l'espace oasien : le cas d'Adrar (Sahara du Sud-ouest algérien). Faculté des Sciences de la Terre et de l'Univers Département de Géographie et d'Aménagement du Territoire, Université d'Oran 2, Algérie. 28p.
- Sonia Korchane. 2014. Développement d'une méthode de séparation électrocinétique de biomarqueurs de la polyneuropathie amyloïde familiale à transthyrétine: vers une miniaturisation de l'analyse: Chimie analytique. Thèse de doctorat, UNIVERSITE PARIS-SUD, France, 187p.
- Darlu P. et Tassy P. 2004. LA RECONSTRUCTION PHYLOGÉNÉTIQUE. France, p. 258.

Lien électronique

❖ Site web 01

<http://insectes-nuisibles.cicrp.fr/fr/identification-moleculaire>

❖ Site web 02

<http://www.snv.jussieu.fr/bmedia/ATP/bioch1.htm>

❖ Site web 03

<https://www.vienne-nature.fr/orthopteres/>

❖ Site web 04

<https://planet-vie.ens.fr/thematiques/ecologie/qu-est-ce-qu-un-barcode-moleculaire>

❖ Base des données

<http://orthoptera.speciesfile.org/HomePage/Orthoptera/HomePage.aspx>

Annexes

Annexes

Annexe 01. Concentration d'ADN extrait et les ratios d'absorbance.

Sample ID	Date	Conc.	Units	A260	A280	260/280	260/230	Conc. Factor (ng/ul)	Cursor Pos.	Cursor abs.	340 raw	DNA Type
E1	2/14/2021	817.6	ng/ul	16.352	8.894	1.84	1.99	50	260	16.352	0.057	DNA-50
E2	2/14/2021	654.7		12.704	7.299	1.74	1.69	50	260	12.704	1.015	DNA-50
E3	2/14/2021	64.07		1.281	0.805	1.59	0.92	50	260	1.281	0.517	DNA-50
E4	2/14/2021	635.2		13.093	7.475	1.75	1.8	50	260	13.093	0.76	DNA-50
E5	2/14/2021	160.1		3.202	1.827	1.75	1.56	50	260	3.202	0.324	DNA-50
E6	2/14/2021	171.6		3.432	1.892	1.81	1.4	50	260	3.432	-0.472	DNA-50

الملخص

يستخدم علماء التصنيف وعلماء البيئة الباركود لتحديد العينات. تجعل هذه الاستراتيجية من الممكن التعرف على الأنواع الموجودة في البيئة. الهدف من عملنا هو بناء شجرة من الجراد المهاجر والمساهمة في تكوين قاعدة بياناتها. تم استخدام أفراد من الجراد المهاجر الذين تم جمعهم في أدرار. تم تطبيق بروتوكول SDS / الفينول / الكلوروفورم لاستخراج الحمض النووي. يوفر هذا البروتوكول مقتطفات من الحمض النووي بجودة وكمية كافية للتضخيم الناجح أجزاء COI. تم استخدام MEGA X 10.1.7 لمحاذاة الأجزاء المتسلسلة ، وكذلك لبناء شجرة النشوء والتطور بأسلوب الاحتمالية القصوى. أكدت شجرة النشوء والتطور أن عيناتنا تنتمي إلى النوع *Locusta migratoria*.
الكلمات المفتاحية : *Locusta migratoria*, شريط الجينات، MEGA، الشجرة الفيلوجينية.

Résumé

Le code-barres est utilisé par les taxinomistes et les écologistes pour identifier des spécimens. Cette stratégie permet d'identifier les espèces présentes dans un milieu. Le but de notre travail est de construire un arbre phylogénétique de *Locusta migratoria* et de contribuer à la constitution de sa base de données. Des individus de *Locusta migratoria* collectés à Adrar ont été utilisés. Le protocole SDS/phénol/chloroforme a été appliqué pour l'extraction d'ADN. Ce protocole fournit des extraits d'ADN de qualité et de quantité suffisante pour une amplification réussie des fragments COI. Le MEGA X 10.1.7 a été utilisé pour aligner les fragments séquencés, ainsi que pour construire l'arbre phylogénétique par la méthode du maximum de vraisemblance. L'arbre phylogénétique a confirmé que nos échantillons appartiennent à l'espèce *Locusta migratoria*.

Mots clés : *Locusta migratoria*, code barre, MEGA, arbre phylogénétique.

Abstract

Barcoding is used by taxonomists and ecologists to identify specimens. This strategy allows identifying the species present in an environment. The aim of our work is to build a phylogenetic tree of *Locusta migratoria* and to contribute to its database. Individuals of *Locusta migratoria* collected in Adrar were used. The SDS/phenol/chloroform protocol was applied for DNA extraction. This protocol provides DNA extracts of sufficient quality and quantity for successful amplification of COI fragments. MEGA X 10.1.7 was used to align the sequenced fragments, as well as to construct the phylogenetic tree using the maximum likelihood method. The phylogenetic tree confirmed that our samples belong to the species *Locusta migratoria*.

Key words: *Locusta migratoria*, barcode, MEGA, phylogenetic tree.