



République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud MAMMERRI de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de biologie Animal et Végétale.



En vue de l'obtention du diplôme de master en Biologie option :
entomologie appliquée à la médecine, à l'agriculture et à la
foresterie

Thème

**Détection moléculaire des *Acinetobacter*
sp. dans les poux de tête *Pediculus*
humanus capitis (De Geer, 1778) dans la
région de Bejaia.**

Présenté par :

Mlle SI KADIR Mounia & Mlle BENMEDDOUR Fariza

Soutenu le 06/07/2017 devant le jury composé :

Président	Mr BOUKHEMZA M.	Professeur	UMMTO
Promoteur	Mr KERNIF T.	Maître de recherche	Institut Pasteur d'Alger
Co- promotrice	Mme BRAHMI K.	Maître de conférences	UMMTO
Examineur	Mme KHITOUS K.	Maître de conférences .A	UMMTO
Examineur	Mme CHOUGAR S.	Maître assistant .A	UMMTO

Promotion : 2016-2017

Remerciements

Ce travail n'a pu être réalisé que grâce aux généreuses aides et soutiens de certaines personnes à qui nous tenons vivement à exprimer notre reconnaissance et gratitude.

*Premièrement, nous remercions tout particulièrement notre promoteur **Dr KERNIF T.** maître de recherche à l'Institut Pasteur d'Alger pour sa bonne volonté d'encadrer ce travail; nous tenons à lui exprimer notre haute estime et notre reconnaissance pour le temps qu'il nous a prodigués, pour ses précieux conseils et la qualité de son encadrement.*

*Nous présentons également nos vifs remerciements et notre profond respect à notre co-promotrice **Mme BRAHMI K.** maître de conférences à l'UMMTO pour son orientation et sa disponibilité.*

*Nous exprimons notre gratitude et reconnaissance à **Mme BENELEDJOUI A.** pour son aide apportée à notre travail de laboratoire au sein de l'Institut Pasteur d'Alger, ses précieux conseils, sa générosité et son encouragement.*

*Nos sincères remerciements vont tout particulièrement au **Dr HARRAT Z.** responsable du service d'éco-épidémiologie parasitaire et génétique des populations à l'Institut Pasteur d'Alger de nous avoir bien accueilli au sein de son service.*

*Nos profonds remerciement d'adressent également à **Mr BOUKHEMZA M.** professeur à l'UMMTO d'avoir accepté de présider le jury.*

*Nous tenons à remercier aussi **Mme KITOUS K.** et **Mme CHOUGUER S.** de bien vouloir examiner ce travail.*

*Nous remercions vivement **Mlle ALI AHMED S.** pour son aide à la réalisation de l'analyse statistique.*

*Nous témoignant également notre profonde reconnaissance et gratitude au **Dr AZZIBI** le directeur de l'Etablissement Public de Santé de Proximité de Bejaïa, le **Dr ZAICHI** médecin coordinateur, et le **Dr BOUDGHASSEN** responsable du service de la médecine de prévention de la wilaya de Bejaïa pour leur orientation et leur aide qui nous a facilité l'accès aux établissements pour faire les investigations.*

Nous remercions tous les directeurs des UDS et les directeurs des écoles qu'on a visitées pour leur gracieux accueil.

Nous remercions finalement tous ceux qui ont contribué de prêt ou de loin au bon déroulement de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

A la mémoire de mon père Messaoud, que je n'oublierai jamais et qui aurait comblé de bonheur s'il était encore dans ce monde, que dieu ait son âme et l'abrite dans son immense paradis.

A la bougie qui a éclairé mon chemin depuis ma naissance et qui m'a aidé énormément dans ce travail et sans elle je n'aurais pas pu arriver là que dieu la protège pour moi, à ma mère Sadia.

A mon très chère frère Akli à qui je dois tout le respect et à qui je souhaite toute la réussite et je le remercie pour sa confiance en moi.

A mes très chères sœurs et à leurs époux.

A mes neveux et a mes nièces.

A tous mes amies.

A mon très chère HAKIM qui m'a vraiment aidé par son encouragement et sa compréhension je te remercie énormément.

A toute la promotion entomologie appliqué 2016/2017.

A ma binôme Mounia et à tout sa famille.

FARIZA.

Dédicaces

Je dédie ce modeste travail :

*A mes très chers parents à qui je dois tout dans ma vie
pour leur soutien, patience et encouragement. Que Dieu
les garde pour moi*

*A mes très chers frères pour leur belle présence
derrière moi dans chaque pas ainsi qu'à mes belles-
sœurs et mes adorables neveux*

*A mes deux sœurs que j'aime énormément et leurs
adorables petites familles*

*A tous mes cousins et cousines que Dieu nous garde
unis pour toute la vie*

A mon très cher MOUSSA

A tous mes ami(e)s

*A mes camarades de la promotion d'entomologie
appliquée 20016/2017*

A ma binôme FARIZA et sa famille

MOUNIA.

SOMMAIRE

Remerciements	
Dédicaces	
Listes des figures, des tableaux et des annexes	
Liste des abréviations	
Introduction	1
Chapitre I. - Rappels bibliographique	
I.1. – Généralités sur les poux	
I.1.1.- Historique	3
I.1.2. – systématique	4
I.1.3. – Morphologie générale	4
I.1.3.1. – Description externe (<i>Pediculus humanus capitis</i>)	5
I.1.4. – Bio-écologie du pou de tête	7
I.1.4.1.- Habitat et alimentation	7
I.1.4.2.- Cycle de développement	7
I.1.5. - Génétique et origine des poux	8
I.1.6.- Rôle pathologique des poux de tête	8
I.1.7. - Rôle infectieux des poux de tête	9
I.1.7.1. – Infection par <i>Acinetobacter</i> sp.	9
I.1.7.2. – Infection par d'autres agents pathogènes	10
I.1.8. – Prévention et lutte anti-poux	11
I.2. Technique de la détection moléculaire	
I.2.1. La polymérase chaine réaction «PCR»	11
I.2.1.1. Les applications de la PCR	12
I.2.1.2. La PCR en temps réel «RT-PCR»	12
I.2.1.2.1. Le principe de la RT-PCR	13
I.2.1.2.2. Les étapes de la réalisation de la PCR	13
I.2.1.2.2.1. L'extraction de l'ADN	13
I.2.1.2.2.2.L'amplification	14

I.2.1.3. Avantages et inconvénients de la PCR	15
Chapitre II. Matériel et méthodes	
II.1. Présentation de la région d'étude	
II.1.1. Situation géographique de la région de Bejaia	17
II.1.2. La zone d'échantillonnage	17
II.2. Matériel	
II.2.1. Matériel biologique	18
II.3. Méthodologie de travail	
II.3.1. Méthode d'échantillonnage	18
II.3.2. Méthodologie de travail au laboratoire	19
II.3.2.1. Identification morphologique des spécimens	19
II.3.2.2. Diagnostique moléculaire d' <i>Acinetobacter</i> sp.	19
II.3.2.2.1. Extraction de l'ADN génomique	19
II.3.2.2.2. La PCR en temps réel	22
II.3.2.2.2.1. La préparation du mix	22
II.3.2.2.2.2. Amplification par SmartCycler	22
II.3.2.2.2.3. Vérification du produit par la PCR standard	23
II.3.2.2.2.3.1. Préparation du gel d'agarose	23
II.3.2.2.2.3.2. L'électrophorèse	24
II.3.3. Exploitation des résultats	25
II.3.3.1. Les indices parasitaires	25
II.3.3.2. L'analyse statistique des résultats de l'infestation et de la PCR	25
Chapitre III. Résultats	
III.1. Identification morphologique des poux de tête	26
III.2. Exploitation des résultats par les indices parasitaires	27
III.3. Résultats de l'analyse statistique de l'infestation	28
III.4. Résultats de la PCR en temps réel	30

Chapitre IV. Discussion

IV. Discussion sur l'identification morphologique 34

IV. Discussion des résultats des indices parasitaires et l'analyse statistique 34

IV. Discussion des résultats de la PCR 35

Conclusion et perspectives 37

Références bibliographiques

Annexes

Liste des figures

Figure 1 - Représentation de quelques espèces d'Anoploures (A; B et C).

Figure 2 - Systématique simplifiée des poux d'après Verax & Raoult, (2012)

Figure 3 - Représentant male des Pediculidae.

Figure 4 - Morphologie du pou de tête; A: *Pediculus humanus capitis*; B: la lente

Figure 5 - Etapes de vie d'un pou de tête.

Figure 6 - Représentation schématique de l'arbre phylogénique de différents clades des poux de tête.

Figure 7 - Infestation par les poux de tête. **A**: cheveux lourdement infestés par *Pediculus humanus capitis*; **B**: Pédiculose du cuir chevelu.

Figure 8 - Représentation d'*Acinetobacter baumannii* avec grossissement 26661×.

Figure 9 - L'amplification exponentielle des gènes en PCR.

Figure 10 - Profil d'une courbe de PCR en temps réel.

Figure 11 - Etapes de la l'amplification en PCR-RT.

Figure 12 - Situation géographique de la région de Bejaia.

Figure 13 - Examen sur les cheveux d'un patient.

Figure 14 - Principales étapes d'extraction d'ADN.

Figure 15 - Protocole expérimental de la PCR en temps réel.

Figure 16 - Protocole expérimental de la PCR standard avec le gel agarose.

Figure 17 – Etude morphologique d'un pou de tête. **A** : pou de tête femelle ; **B** : pou de tête male ; **C** : la tête; **D** : griffe du tibia droit chez le male; **E** : extrémité abdominale chez le male; **F** : extrémité abdominale chez la femelle.

Figure 18 – Prévalence d'infestation par les poux de tête en fonction du sexe.

Figure 19 – Résultats de la RT-PCR donnés par SmartCycler.

Figure 20 – prévalence d'infection des poux par *Acinetobacter* sp. selon les régions.

Liste des tableaux

Tableau 1 – composants du Mix de la PCR.

Tableau 2 – Sonde et amorces utilisés en PCR en temps réel.

Tableau 3 – Résultats des indices parasite des régions étudiées.

Tableau 4 – Prévalence d'infestation par régions.

Tableau 5 – Résultat du test de Kruskal-wallis pour l'infestation par régions

Tableau 6 – Prévalence d'infestation par sexe.

Tableau 7 – Résultats Du test de Wilcoxon

Tableau 8 – Résultats de l'infestation des poux par *Acinetobacter* sp. par RT-PCR

Liste des annexes.

Annexe I. – Matériel non biologique.

Annexe II. – Légende des résultats de la PCR En Temps Réel.

Annexe III.- Autorisations pour la réalisation des investigations.

Liste des abréviations :

ADN: Acide désoxyribose nucléique

AE: Elution Buffer

AL: Lysis buffer

AW1: Wash Buffer 1

AW2: Wash Buffer 2

PCR: Polymerase Chain Reaction

RT-PCR: Real Time PCR (PCR en temps reel)

***rpoB*:** gène codant pour la sous unité β du ribosome bactérien

UDS: Union démocratique et social

EPSP: Etablissement publique de santé de proximité

Introduction

Les poux (insecta: phthiraptera) sont des ectoparasites obligatoires des oiseaux et des mammifères (Allen et al., 2013). Connus depuis l'antiquité, les poux n'ont cessé de faire partie de la vie quotidienne des Hommes, suscitant ainsi la curiosité des chercheurs. Les démangeaisons qu'ils induisent, les soins qu'ils exigent et les redoutables maladies qu'ils véhiculent, n'ont jamais pu faire oublier leur présence parmi nous au fil des siècles (Eric., 2000). Une récente découverte de deux fossiles de poux le premier vieux de 44 millions d'années parasitait les oiseaux et le second, vieux de 140 millions d'années a permis d'estimer l'âge des poux à plusieurs millions d'années (Boutellis, 2014)

A ce jour, environ 4.900 espèces de poux ont été décrites chacune étant très spécifiquement associée à un hôte animal (Johnson et al., 2004). L'ordre des Phthiraptera regroupe deux sous-ordres: les Anoploures (sucking lice en anglais) et les Mallophages (chewing lice en anglais) (Boutellis et al., 2017). Les poux qui parasitent l'homme sont des hématophages qui appartiennent à deux familles dans le sous-ordre des Anoploures. On distingue ainsi, dans la famille des *Pediculidae*: le pou de tête (*Pediculus humanus capitis*) et le pou de corps (*Pediculus humanus corporis*) et dans la famille Phthiridea le pou pubien (*Phthirus pubis*) communément appelé morpion. (Li et al., 2010).

Le pou de tête vit et se multiplie sur les cheveux alors que le pou de corps occupe une niche écologique différente, à savoir les plis et les coutures de vêtements (Drali, 2014). L'infestation du pou de corps est très répandue parmi les populations précaires telles que les sans abri, les prisonniers et les réfugiés de guerre (Badiaga et Brouqui, 2012; Sangaré et al., 2014). Tandis que, les poux de tête affectent principalement à travers le monde des millions d'écoliers en dehors des conditions d'hygiène et de pauvreté (Chosidow et al., 1994). Trois bactéries pathogènes sont transmises par le pou de corps: *Rickettsia prowazekii*, agent du typhus épidémique; *Borrelia recurrentis*, agent de la fièvre récurrente; *Bartonella quintana*, responsable de la fièvre des tranchées, de bactériémies chroniques, de l'angiomatose bacillaire, d'endocardites et de lymphadénopathies (Houhamdi et al., 2005). En plus de ces pathogènes, *Acinetobacter baumannii* responsable des septicémies et des infections nosocomiales multi-résistantes ont été retrouvés chez les poux humains: poux de tête et poux de corps (Kempf et al., 2012).

Une étude phylogénétique basé sur les ADN mitochondriaux a permis de classer les poux humains dans quatre grands Clades de poux humains (A, B, C et D), le Clade A et D sont les seuls à regrouper aussi bien les poux de tete et les poux de corps (Drali et al., 2015). Chacun de ces stades possède une origine géographique spécifique (Raoult et al., 2008). Les poux de tête retrouvés en Algérie sont classés dans le clade B. (Boutellis et al., 2015). Mais

jusqu'à ce jour, aucune étude portée sur le rôle épidémiologique des poux en Algérie n'a été publiée.

Notre présente étude a pour objectif en premier lieu, de recenser le taux de parasitisme par les poux de tête chez les élèves provenant de quelques établissements scolaires dans la région de Bejaia. De plus, faire une identification morphologique de l'espèce *Pediculus humanus capitis*, et une détection de l'agent pathogène *Acinetobacter* sp. dans nos spécimens de poux de tête par la méthode de PCR en temps réel.

Ce présent manuscrit s'articule autour de quatre chapitres:

- le premier chapitre sera consacré à la synthèse bibliographique comprenant des généralités sur les poux de tête et le principe de la technique de la détection moléculaire des *Acinetobacter* sp.
- le deuxième chapitre fera le point sur les détails des méthodes de travail sur le terrain, et les expérimentations réalisés au sein de l'Institut Pasteur d'Alger et les techniques utilisées pour l'exploitation des résultats.
- le troisième chapitre aura pour objectif de représenter les résultats obtenus.
- le quatrième chapitre discutera les résultats représentés dans le chapitre III.

Enfin, ce mémoire sera conclu avec toutes les idées requises au cours de ce travail et les perspectives qui en dérivent.

Chapitre I.
Recherche
bibliographiques

Dans cette partie nous présentons des généralités sur les poux et le principe de la technique de détection moléculaire de l'agent pathogène.

I.1. - Généralités sur les poux

Cette partie représente les caractéristiques d'ordre biologique et écologique des poux en général et des poux de tête en particulier, leur nuisance et les méthodes de lutte contre ces parasites.

I.1.1. - Historique

L'histoire du pou est aussi ancienne que celle de l'humanité, nous pouvant la constituer grâce aux témoignages laissés au fil du temps par les chercheurs, les religieux et les artistes. En effet, Le plus ancien document scientifique qui parle fortuitement des poux nous a été laissé par Hyppocrate (460-377 avant J-C.). Ensuite, Aristote (384-322 avant J-C) donne la première définition du parasite: "Animaux qui naissent spontanément dans d'autres animaux". Parmi les parasites de l'Homme, il cite particulièrement les poux, les puces et les punaises. Pline l'Ancien (23-79 après J-C) rapporte que les poux naissent du sang des hommes, en particulier, ceux qui mangent du basilic. Ensuite, Avicenne différencie avec justesse les poux des paupières, ceux du corps et ceux de la tête; mais il estime qu'ils proviennent de la matière humide du cuir chevelu. Plus tard, Salicet déclare qu'ils sont capables de passer d'un individu à l'autre (**Eric, 2000**).

Ce n'est qu'au XVIII siècle qu'on a démontré définitivement l'inconsistance des théories sur la génération spontanée, et on a prouvé que le pou ne peut pas vivre dans des cavités closes mettant donc fin au vieil adage de l'origine de l'insecte. Entre temps, Linné en 1758 lui donne un nom: il s'agit du «*Pediculus humanus qui habitat in capite et vestimentis humanis*», le séparant nettement du pou du pubis. vingt ans plus tard, De Geer en 1778 différencie le pou de corps de celui de tête. En 1909, le directeur de l'Institut Pasteur de Tunis, Nicolle démontre le rôle du pou dans la transmission du typhus, grâce à quoi il recevra le prix Nobel de médecine en 1928. Après des millénaires d'anonymat, le pou a enfin un état civil. Quant à son arbre généalogique, des taxonomistes se lancent dans la systématique du pou dès 1818, systématique qui ne cessera d'évoluer au rythme des découvertes des entomologistes (**Eric, 2000**).

I.1.2. - Systématique

Les poux sont des insectes hématophages qui font partie de l'ordre des Phthiraptera (Johnson et al., 2004). A ce jour, environ 4.900 espèces de poux ont été répertoriées et réparties dans quatre sous-ordres: d'une part les poux mâcheurs (chewing / biting lice) comprenant les Rhynchophthirina, les Ischnocera et les Amblycera et d'autre part les anoploures (Anoplura) suceurs de sang (Drali, 2014). Le sous-ordre des anoploures comprend près de 500 espèces regroupées en une quinzaine de familles (Reed et al., 2004). Les Anoploures sont des ectoparasites permanents et obligatoires des mammifères, hématophages à tous les stades (sauf le stade embryonnaire) et dans les deux sexes (Eric, 2000). On distingue trois espèces de poux qui peuvent parasiter l'Homme: le pou de tête (*Pediculus humanus capitis*, De Gree, 1778) (Fig. 1 A) responsable de la pédiculose du cuir chevelu, le pou de corps (*Pediculus humanus corporis* Linné, 1758) (Fig. 1 B) agent de la pédiculose humaine corporelle, et le pou du pubis (*Phthirus pubis* Leach, 1815) (Fig. 1 C) responsable de la phthiriose humaine transmise sexuellement (Izri & Guiguen, 2013). La figure 2 représente la classification systématique des Anoploures comprenant où s'intègrent les trois parasites de l'homme est représentée par Verax et Raoult (2012).



Figure 1 - Représentation de quelques espèces d'Anoploures (A; B et C); **A:** *Pediculus humanus capitis* (Izri, 2013); **B:** *Pediculus humanus corporis* (Boutellis et al., 2017)
C: *Phthirus pubis* (Izri, 2013)

I.1.3. - Morphologie générale

Les anoploures se distinguent facilement des mallophages par leur tête qui est plus étroite que le thorax (Franc, 1994). Le pou est un petit insecte aptère de quelques millimètres. Son corps ovoïde, plus ou moins allongé, est aplati dorso-ventralement, et présente une

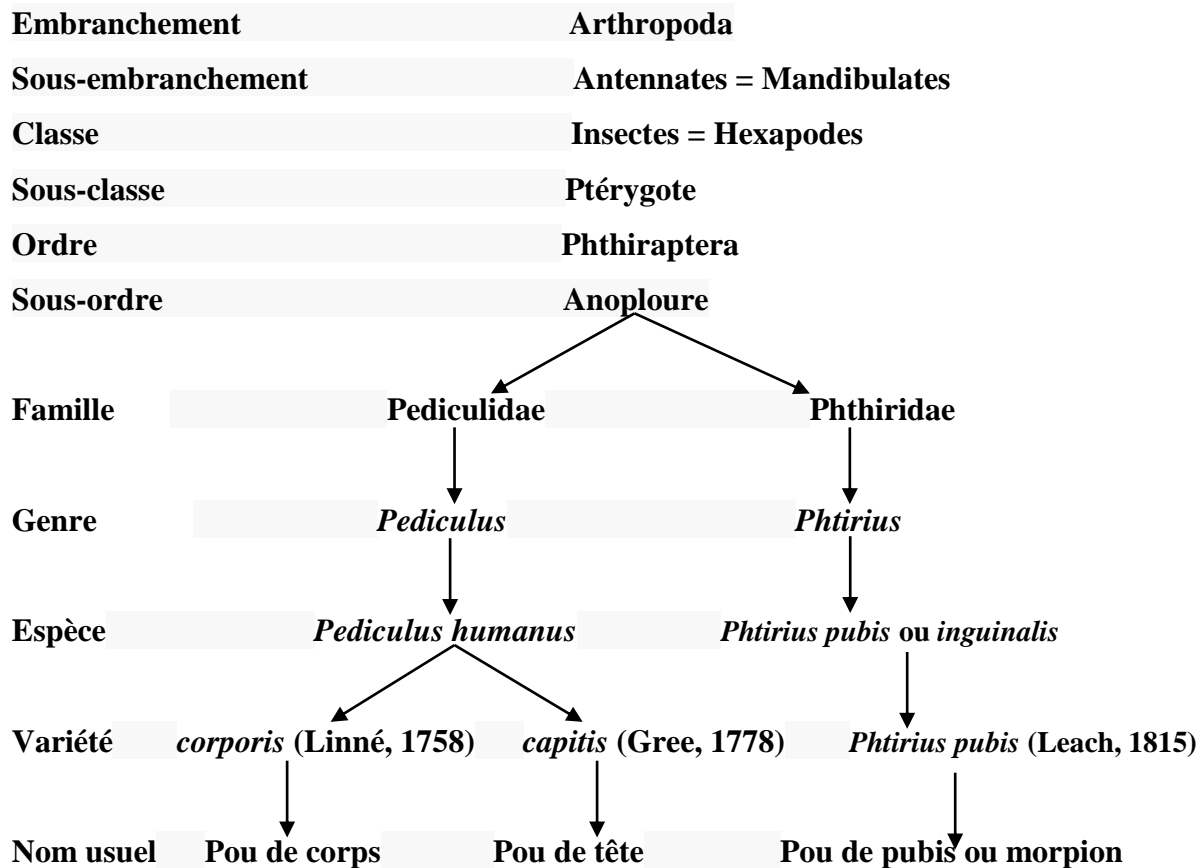


Figure 2 - Systématique simplifiée des poux d'après Verax et Raoult (2012)

couleur gris brun à jeun, et rouge après un repas sanguin. Comme tous les insectes, son corps est divisé en trois régions, tête, thorax et abdomen, recouvertes d'un tégument chitineux, la cuticule (Eric, 2000). Au sein des Pediculidae (Fig. 3), d'un point de vue morphologique, les poux de tête (*Pediculus humanus capitis*) et les poux de corps (*Pediculus humanus humanus*) sont très similaires, mis à part quelques différences comme la taille qui est relativement plus grande chez les poux de corps (Ferris, 1951), et la couleur plus foncée chez les poux de tête (Ewing, 1926). Les poux de tête et les poux de corps, comme leurs noms l'indiquent, vivent dans deux écosystèmes distincts (Verax et Raoult, 2012).

I.1.3.1. - Description externe (*Pediculus humanus capitis*)

Les adultes mâles ont une longueur de 1,6 à 2,6 mm et les femelles de 2,7 à 3,3 mm (Fig. 4 A). La tête porte deux yeux simples et deux antennes de 5 articles. Le thorax possède une segmentation peu distincte. Les pattes sont fortes et trapues. Le tibia antérieur porte, près de l'apex, une forte dent sur son bord interne, formant ainsi avec la griffe très puissante qui arme le tarse unique une pince très efficace (Boutellis et al., 2017).

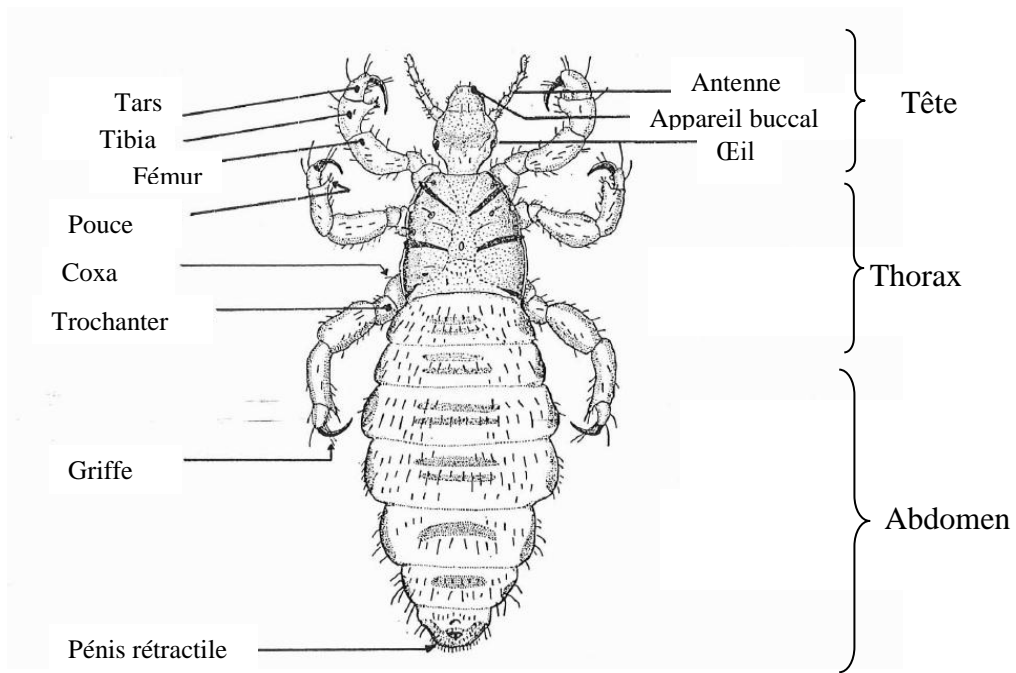


Figure 3 - Représentant male des Pediculidae (**Eric, 2000**).

L'abdomen représente les deux tiers du corps en longueur et comporte neuf segments aplatis terminés par l'appareil génital mâle ou femelle (**Eric, 2000**). Le dimorphisme sexuel est discret: chez les femelles le dernier segment est échancré et l'avant-dernier porte une paire de gonopodes latéraux et une plaque génitale médiane sclérifiée, chez le mâle le dernier segment n'est pas échancré et le pénis est proéminent en zone médiane (**Franc, 1994**).

Les lentes (œufs) (**Fig. 4 B**) sont de petits corps ovales, brillants, mesurant de 0,3 à 0,8 mm (**Soto et al, 2012**), elles éclosent au bout de 7 à 12 jours donnant naissance à une larve qui ressemble à l'adulte en plus petit, elle mesure environ 1 mm (**Ripert, 2007**).

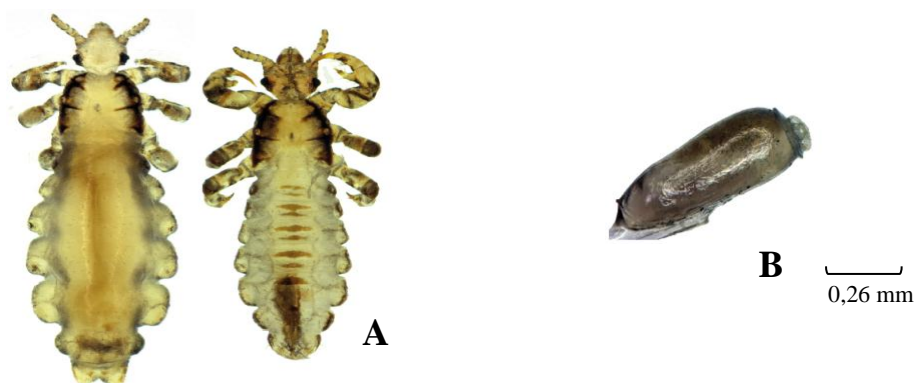


Figure 4 - Morphologie du pou de tête; A: *Pediculus humanus capitis* (femelle a gauche male a droite); B: Lente de *Pediculus humanus capitis* (**Boutellis et al., 2017**).

I.1.4. - Bio-écologie du pou de tête

I.1.4.1. - Habitat et alimentation

Les poux de tête sont des ectoparasites obligatoires (**Veracx et Raoult, 2012**). Leur habitat exclusif est l'homme, à l'exclusion de tout autre mammifère. *Pediculus humanus capitis* vit dans la chevelure de l'Homme. Il se localise surtout dans la région occipitale: derrière les oreilles et le haut de la nuque (**Cavier, 1970**). Toute la vie du pou se déroule sur la tête (**Eric, 2000**). Mâles, femelles et larves sont hématophages stricts et se nourrissent exclusivement de sang humain qu'ils prélèvent en piquant le cuir chevelu 2 à 4 fois par jour. Pour les poux, le cuir chevelu constitue une formidable niche écologique où ils peuvent vivre au chaud, se cacher, se nourrir et se reproduire (**Izri et Guiguen, 2013**).

I.1.4.2. - Cycle de développement

La durée de vie d'un pou est d'environ 6 à 8 semaines. Durant cette période, la femelle est capable de pondre régulièrement jusqu'à 10 lentes par jour dont l'éclosion survient au bout de 6 à 10 jours. Après éclosion, la larve mue trois fois pour devenir adulte, chaque stade larvaire dure en moyenne 5 jours. Un à deux jours après la dernière mue, la maturité sexuelle de l'adulte est atteinte et les accouplements des mâles et des femelles peuvent reprendre (**Nicolas, 2013**) (**Fig. 5**)

Ces poux ont un taux de reproduction élevé. Doté de 2 paires de testicules, un pou mâle peut féconder 18 femelles à la suite, sans repos. Les poux adultes s'accouplent plusieurs fois car les femelles sont dépourvues de spermathèques (**Boutellis et al, 2015**).

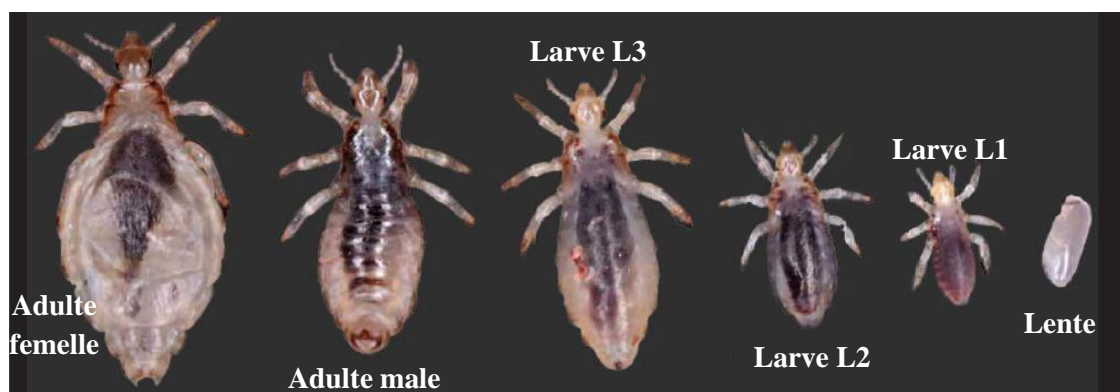


Figure 5 - Stades du cycle biologique de *Pediculus humanus* (femelle, mâle, 3 stades immatures, lente) (**Boutellis et al., 2017**).

I.1.5. - Génétique et origine des poux

L'origine des poux reste obscure, car leurs fossiles sont très difficile à retrouver; les études phylogénétiques ont montré que les Anoploures et les Mallophages sont monophylétiques et ils dérivent tous d'un ancêtre non hématophage qui a développé ses pièces buccales afin de s'adapter à un mode d'alimentation hématophage (Reed *et al.*, 2007). Les poux de corps et les poux de tête ont le plus petit génome des insectes à ce jour (108 Méga bases pour les femelles et 109 Mb pour les mâles). Ils ont un organisme diploïde (2n chromosomes) comportant 11 mini chromosomes (5 chromosomes métacentriques et 6 télocentriques) (Veracx et Raoult, 2012). La différence la plus frappante entre poux de tête et poux de corps reste leur écologie et leur couleur, cependant les caractères morphologiques ont été remis en question par des études génétiques. Quatre grands clades phylogénétiques (A, B, C et D) de poux de tête sont décrits en analysant l'ADN mitochondrial, le gène Cytochrome b « Cytb » et la première sous-unité « α » du gène codant pour le cytochrome «oxydase Cox1». Parmi ces clades, le clade A et D sont les seuls à regrouper aussi bien les poux de tête que les poux de corps (Drali *et al.*, 2015). Ainsi, chaque clade possède une distribution géographique qui lui est spécifique (Fig. 6) (Boutellis *et al.*, 2012).

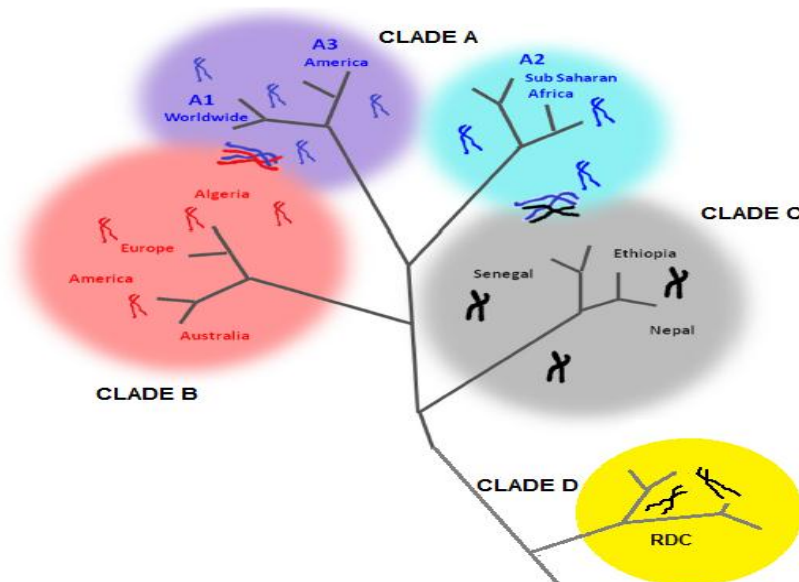


Figure 6 - Représentation schématique de l'arbre phylogénétique de différents clades des poux de tête (Boutellis, 2014).

I.1.6. – Rôle pathologique des poux de tête

Les poux de tête affectent principalement à travers le monde des millions d'écoliers en dehors des conditions d'hygiène et de pauvreté (Chosidow *et al.*, 1994). *Pediculus humanus*

capitis détermine un prurit au niveau du cuir chevelu: la pédiculose (**Golvan, 1983**) (**Fig. 7 A**). Ce prurit, très vif, entraîne des lésions de grattage dont la surinfection provoque l'impétiginisation. La multiplication des piqûres, lorsque le parasite pullule, provoque le suintement d'un liquide au niveau des excoriations cutanées qui agglutine les cheveux. Les lésions de grattage surinfectées peuvent s'accompagner d'adénopathies cervicales (**Pajot, 2000**). Un grattage trop vigoureux peut produire une plaie qui ouvre la porte aux agents extérieurs, aux bactéries ce qui cause parfois une infection (**Izri et Guiguen, 2013**). D'autres manifestations cliniques sont possibles, quoiqu'elles soient moins fréquentes, notamment une conjonctivite ou un eczéma du cuir chevelu principalement localisé derrière les oreilles ou à l'occiput (**Soto et al., 2012**). Le diagnostic d'une infestation active (**Fig. 7 B**) par les poux réside dans la détection de poux vivants et mobiles et/ou de lentes vivantes (**Gavinet, 2007**). En cas d'infestation discrète, chercher des lentes dans les cheveux situés derrière les oreilles c'est là que l'on a le plus de chance d'en trouver (**Ripert, 2007**). Elles s'observent alors de plus en plus loin de la racine des cheveux, pouvant persister plusieurs mois, sur les cheveux ; elles sont plus faciles à repérer chez un sujet aux cheveux bruns. Les poux sont plus difficiles à mettre en évidence. Ils sont recherchés sur le cuir chevelu en écartant les cheveux, mèche par mèche (**Williams, 2001**).

La transmission des poux est interhumaine. Elle s'effectue par contact direct ou indirect. Le contact est direct quand le pou passe sur une nouvelle tête lors du rapprochement des chevelures. Ou alors, le contact est indirect. Dans ce cas, le parasite qui ne sait ni voler ni sauter attend impatiemment un nouvel hôte sur divers objets appartenant à un enfant contaminé (**Eric, 2000**).

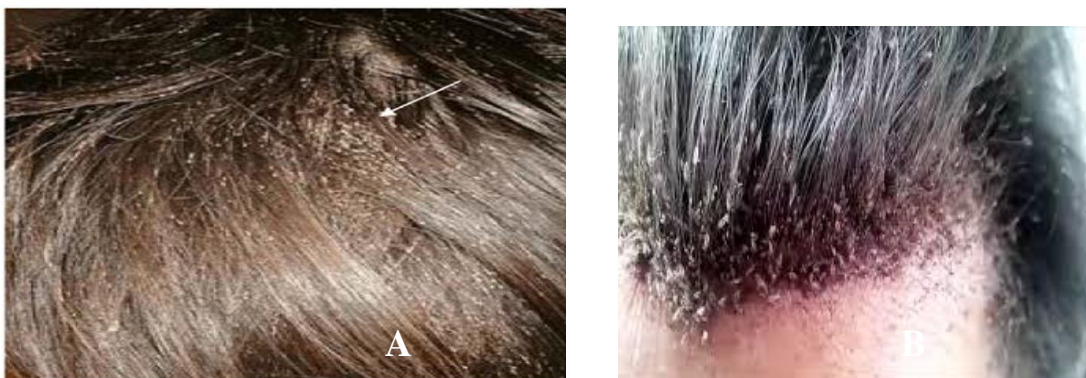


Figure 7 - Infestation par les poux de tête (**A**: cheveux lourdement infestés par *Pediculus humanus capitis*; **B**: Pédiculose du cuir chevelu) (**Li et al, 2010**).

I.1.7. - Rôle infectieux des poux de tête

I.1.7.1. - Infection par *Acinetobacter* sp.

L'histoire du genre *Acinetobacter* commence au début du XX^{ème} siècle avec la description par un microbiologiste néerlandais Martinus Wiliem Beijerinck d'un microorganisme dénommé *Micrococcus calcoaceticus* isolé à partir de prélèvement de sol. C'est en 1954 que Brisou et Prévost proposent la désignation du genre *Acinetobacter* (du grec akinetos « Incapable de bouger ») (Boudia, 2014). Une avancée majeure dans l'histoire du genre *Acinetobacter* a été réalisée en 1986 grâce aux techniques d'hybridation ADN/ADN de Bouvet et Grimont qui sont parvenus à distinguer 12 espèces génomiques. A ce jour, 35 espèces bactériennes d'*Acineioacter* ont été décrites, dont 26 espèces nommées et neuf espèce génomiques (Howard et al., 2012). *Acinetobacter* sp. (Fig. 8) appartient à la famille des *Moraxellaceae*, et l'ordre Pseudomonadales. Les souches du genre *Acinetobacter* sont constituées de coccobacilles, elle est de 0,9 à 1,6 µm de diamètre et de 1,5 à 2,5 µm de longueur, à Gram négatif, immobiles (Bernards, 2004).

Acinetobacter croît rapidement sur des milieux usuels (gélose de sang de mouton) à 37°C. Les colonies d'*Acinetobacter* apparaissent lisses, opaques, de couleur jaune pâle à grisâtre. *Acinetobacter* est sphérique et généralement par paires ou en amas (Taleb, 2013). La plupart des espèces du genre *Acinetobacter* sont ubiquitaires (sol, eau, végétaux, hommes). Elle peut être commensale ou à faible potentiel pathogène chez les individus sains et à pouvoir pathogène important chez les immunodépressifs (Kempf et al., 2012). Les espèces d'*Acinetobacter* sont des bactéries marquées par leur extrême capacité à acquérir des mécanismes de résistance vis-à-vis de la plupart des nouveaux antibiotiques (Boscher, 2014). Cette bactérie est dernièrement isolée à partir des poux de tête et des poux de corps humain en Ethiopie et en Sénégal (Kempf et al., 2012), isolée aussi à partir des poux de tête au niveau des écoles élémentaires parisiennes (Bouvresse et al.,2011).

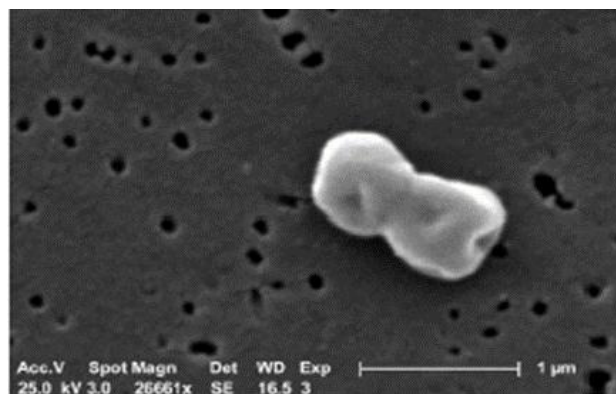


Figure 8 - Représentation d'*Acinetobacter baumannii* avec grossissement 26661× (Swenson et al., 2004)

I.1.7.2. - Infection par d'autres agents pathogènes

En plus des désagréments cutanés qu'ils occasionnent, les poux peuvent être, dans certaines circonstances, vecteurs de graves infections mortelles (**Eric, 2000**). A l'heure actuelle, le pou de corps est le principal vecteur responsable d'épidémie de typhus (*Rickettsia prowazekii*), de fièvre récurrente (*Borrelia recurrentis*) et de la fièvre des tranchées (*Bartonella quintana*) (**Raoult et al., 2006**). Un quatrième agent pathogène mortel, *Yersinia pestis*, l'agent de la peste est suspecté dans la transmission à travers le pou de corps (**Houhamdi et al., 2006**). Cependant, l'ADN de *Bartonella quintana* fut détecté chez les poux de tête de Clade A (**Boutellis et al., 2012**) et de Clade C (**Sasaki et al., 2006**); l'ADN de *Bartonella recurrentis* chez les poux de tête de Clade C (**Boutellis et al., 2013**). D'autres bactéries comme *Serratia marcescens* ont été retrouvées chez les poux humains (**Kampf et al., 2012**).

I.1.8. - Prévention et lutte anti-poux

La lutte contre la pédiculose est certainement une très ancienne préoccupation de l'homme (**Sangaré, 2015**). La lutte contre les poux existe depuis l'antiquité. On pratiquait alors un épouillage manuel ou à l'aide d'instruments et des peignes spéciaux (**Gavinnet, 2007**). La suppression des poux à la main ou avec un peigne à poux, le rasage du cuir chevelu et du corps, et le blanchiment des vêtements sont quelques-unes des plus anciennes méthodes de contrôle des poux humains avant l'avènement des pédiculicides (**Mumcuoglu, 1996**). Pendant ces dernières décennies, différents composés chimiques comprenant des organochlorés (DDT, lindane), organophosphates (malathion), les carbamates (carbaryl), les pyréthrinés (pyrèthre), et pyréthrinoïdes (perméthrine, la phénothrine, et bioalléthrine) ont été développés pour lutter contre la pédiculose (**Mumcuoglu, 1996**). Malheureusement les poux ont pu développer une résistance contre la plupart de ces molécules (**Clark et al., 2013**). L'ivermectine semble donner de résultats encourageants dans le traitement des poux de tête (**Parisen et al., 2013**), bien que dans des conditions de laboratoire une résistance potentielle à cette molécule été démontrée (**Yoon et al., 2013**). Aujourd'hui, seul le développement de nouvelles stratégies basées sur l'utilisation des antibiotiques, spécialement la doxycycline ou en combinaisons pourra changer la donne (**Sangaré et al., 2015**).

I.2. - Techniques de la détection moléculaire

Dans cette deuxième partie du chapitre I, représente les informations de base d'une des techniques de la détection moléculaire (la PCR), ses applications, son principe, ses avantages et inconvénients.

I.2.1. - Polymérase Chaîne Réaction « PCR »

Le développement de la réaction en chaîne par polymérase (PCR) est l'une des innovations qui ont changé le cours de la science moléculaire avec son impact couvrant d'innombrables sous-disciplines de la biologie. Le processus théorique a été décrit par Keppe et ses collègues en 1971; cependant, la procédure PCR complète a été décrite et appliquée expérimentalement par Kary Mullis en 1985 (Todd, 2012). La technique de Polymérase Chain Réaction (PCR) est un moyen rapide, peu coûteux et simple pour copier des fragments d'ADN spécifiques à partir de quantités minimales d'un matériel ADN source (Fig. 9). C'est un procédé d'amplification moléculaire qui mime le processus naturel de synthèse de l'ADN (Tran, 2008). Il existe des variantes de la PCR : real-time PCR, PCR compétitive, PCR in situ, RT-PC... (Nîmes, 2007).

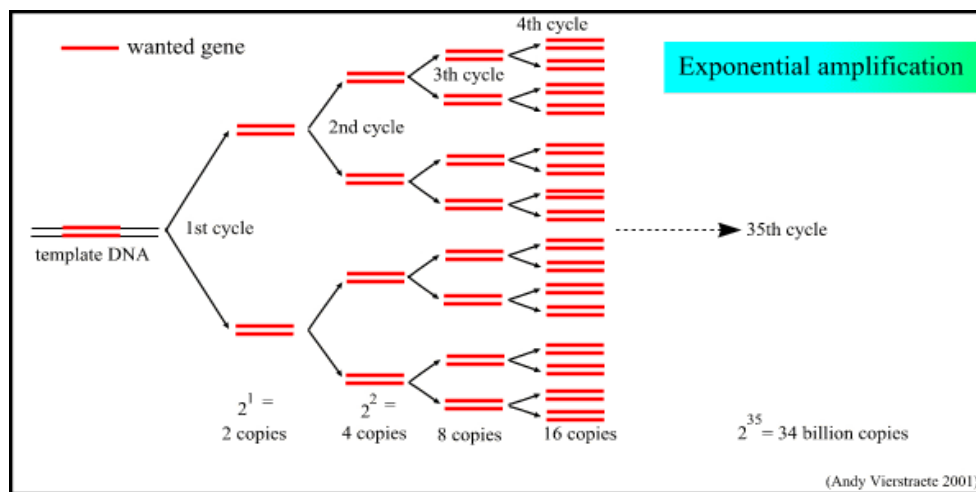


Figure 9 - Amplification exponentielle des gènes en PCR (Andy Vierstraete, 2001)

I.2.1.1. - Applications de la PCR

Les applications de la PCR sont multiples. C'est une technique désormais incontournable en biologie cellulaire et moléculaire. Elle permet notamment en quelques heures le « clonage acellulaire » d'un fragment d'ADN grâce à un système automatisé, alors qu'il faut plusieurs jours avec les techniques standard de clonage moléculaire. D'autre part, la PCR est largement utilisée à des fins de diagnostic pour détecter la présence d'une séquence d'ADN spécifique de tel ou tel organisme dans un fluide biologique. Elle est aussi employée pour réaliser des empreintes génétiques, qu'il s'agisse de l'identification génétique d'une

personne dans le cadre d'une enquête judiciaire, ou de l'identification de variétés animales, végétales ou microbiennes destinée à des tests de qualité alimentaire, de diagnostic ou de sélection variétale. La PCR est encore indispensable à la réalisation d'un séquençage ou d'une mutagenèse dirigée (Nîmes, 2007).

I.2.1.2. - La PCR en temps réel «RT-PCR»

Russell Higuchi fut l'un des premiers à faire l'analyse des cinétiques de la PCR (polymerase Chain Reaction) en élaborant un système qui détectait le produit de la PCR au fur et à mesure qu'il s'accumulait. Ce système en « temps réel » utilisait le bromure d'éthidium comme agent intercalant dans chacune des réactions d'amplification et un thermocycleur modifié pour stimuler l'émission des échantillons par rayonnements UV. L'émission de la fluorescence était détectée à l'aide d'une caméra CCD (charge-coupled device) (Fig. 10). (Poitras et Houde, 2002). Les utilisations typiques de PCR en temps réel comprennent la détection des pathogènes, l'analyse de l'expression des gènes, l'analyse du polymorphisme nucléotidique simple (SNP), l'analyse des aberrations chromosomiques et, plus récemment également la détection des protéines par immuno-PCR en temps réel (Kubista et al., 2006).

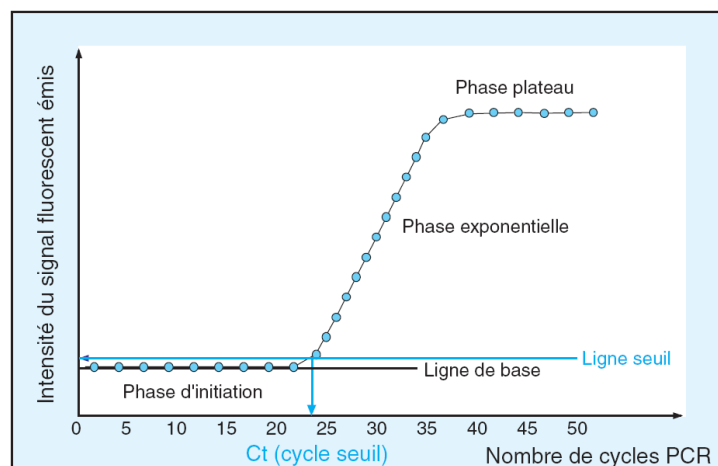


Figure 10 - Profil d'une courbe de PCR en temps réel.

I.2.1.2.1. - Le principe de le RT-PCR

La PCR en temps réel est basée sur la détection et la quantification d'un reporter fluorescent dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons générés pendant la réaction de PCR (Poitras et Houde, 2002). Cette technologie combine l'amplification avec la détection et la quantification d'un signal fluorescent. En observant la quantité de fluorescence émise à chaque cycle, il devient possible de suivre la réaction PCR durant sa phase exponentielle. La première augmentation significative de la quantité d'amplicons est en corrélation directe avec la quantité initiale de la matrice cible (template)

(Elyse, 2002). L'intensité de la fluorescence à chaque cycle est proportionnelle à la concentration d'amplicons, le cycle seuil (Ct) représente le nombre de cycles requis où le signal d'émission de fluorescence est statistiquement et significativement plus élevé que la ligne de base (Tran, 2008).

I.2.1.2.2. - Etapes de la réalisation de la PCR

La réalisation de la PCR dans son ensemble implique deux étapes : l'extraction de l'ADN et l'amplification.

I.2.1.2.2.1. - Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN est une technique qui consiste à isoler l'ADN à partir d'une cellule pour permettre son analyse (Rasmussen & Morrisay, 2008). Cependant, elle comprend toujours trois étapes :

- La lyse: consiste à dissocier les cellules, les tissus, les enveloppes et de libérer les acides nucléiques.
- L'éluion: les ADN sont extraits du mélange protéique le plus souvent par la méthode d'extraction phénol-chloroforme. Après centrifugation, l'ADN se retrouve dans une phase aqueuse dépourvue de protéines.
- La purification et précipitation de l'ADN : l'ADN est précipité en présence d'alcool et de sels de façon à l'obtenir pur et concentré. (Vassias, 2012).

I.2.1.2.2.2. - L'amplification

La technique de PCR est constituée d'une trentaine de cycles, chacun d'eux comportant trois étapes (Fig. 11). Ces étapes sont réalisées dans un tube dans lequel tous les protagonistes de la réaction ont été ajoutés. Le tube est placé dans un thermocycleur qui permet de monter le tube à la bonne température très rapidement (Vassias, 2012).

- **La dénaturation d'ADN:** Elle permet de séparer par la chaleur les deux brins d'ADN. Le mélange réactionnel est amené à 94 °C, température à laquelle les deux brins d'ADN se séparent. (Vassias, 2012) (Fig. 11 A)
- **L'hybridation des amorces:** Deux amorces d'ADN d'environ 20 bases s'hybrident de façon spécifique grâce à la complémentarité des bases, sur un brin d'ADN ou son complémentaire. Cette opération est réalisée à une température dépendante de la composition en bases puriques et pyrimidiques de ces amorces, en général entre 45 °C et 65°C. Les amorces encadrent la région à amplifier. Le choix des amorces est déterminant, il doit tenir compte de nombreux paramètres afin de permettre une hybridation spécifique (Vassias, 2012) (Fig. 11 B)

➤ **L'élongation des amorces:** Une ADN polymérase (la Taq polymérase est la plus utilisée) allonge les amorces en y incorporant des bases complémentaires de la séquence matrice. Cette opération est réalisée à 72 °C, température optimale pour l'action de la polymérase. Elle synthétise l'ADN de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' (Vassias, 2012) (Fig. 11 C).

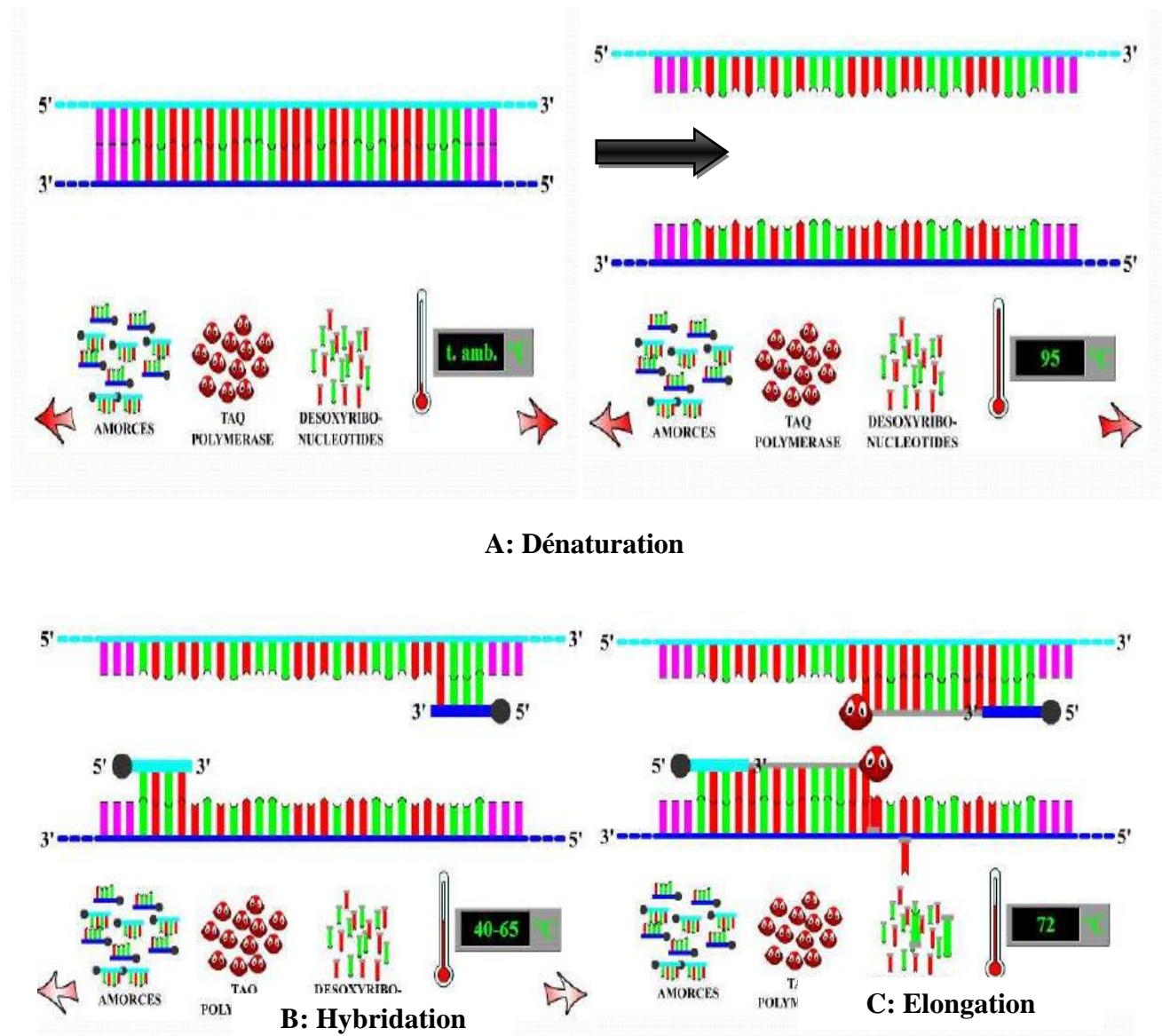


Figure 11 - Etapes de la l'amplification en PCR-RT

I.2.1.3. - Avantages et inconvénient de la PCR

L'apparition de la PCR a représenté un progrès méthodologique décisif. Ces applications sont nombreuses en pathologie (recherche de parasites, bactéries, virus, oncogène translocation, etc.), en diagnostic anténatal ou comme étape vers une autre technique comme

le séquençage. C'est une technique rapide, sensible et spécifique. Elle comporte cependant des inconvénients qui en font une méthodologie délicate à mettre en œuvre :

- l'optimisation de la PCR en vue d'une meilleure spécificité et sensibilité est une étape importante. Elle dépend de multiples facteurs comme la composition en bases des amorces, de celle du tampon salin, de la température d'hybridation, du nombre de cycles, etc.
- la propreté de l'ADN cible est prépondérante, une bonne extraction éliminant les inhibiteurs de PCR est donc indispensable ;
- enfin, le problème majeur consiste à éliminer tout risque de contamination. En effet, si du produit amplifié contamine un tube de PCR prêt à être amplifié, celui-ci sera automatiquement positif. Le contrôle de ces contaminations nécessite la présence de contrôles négatifs lors de l'amplification, mais surtout une organisation rigoureuse au niveau des pièces et du matériel. En effet les étapes d'extraction, préparation de l'amplification et détection des amplicons doivent se faire dans des pièces séparées avec des matériels distincts (**Vassias, 2012**).

Chapitre II.
Matériel et Méthodes

Après le choix des zones d'échantillonnages, les méthodes de travail sur le terrain et les méthodes utilisées au laboratoire telles que l'identification des poux, diagnostic moléculaire par la PCR, et les techniques employées pour l'exploitation des résultats sont traités et développées dans ce chapitre.

II.1. - Présentation de la région d'étude

II.1.1. - Situation géographique de la région de Bejaia

Bejaïa se situe sur le Golfe de Bejaia dans le nord-est de l'Algérie, et s'étend sur 120,22 km². L'altitude minimale est de 1 m, l'altitude maximale est de 660 m. qui s'ouvre sur la mer méditerranée avec une façade maritime de plus de 100Kms, alternant crique rocheuses et plages de sable fin d'est vers l'ouest, elle partage ses frontières avec la wilaya de Jijel du coté Ouest, Sétif du Sud-ouest, Bordj Bou Arreridj du coté Sud, Bouira du sud-est et la wilaya de Tizi-Ouzou de l'est (**Fig. 12**).

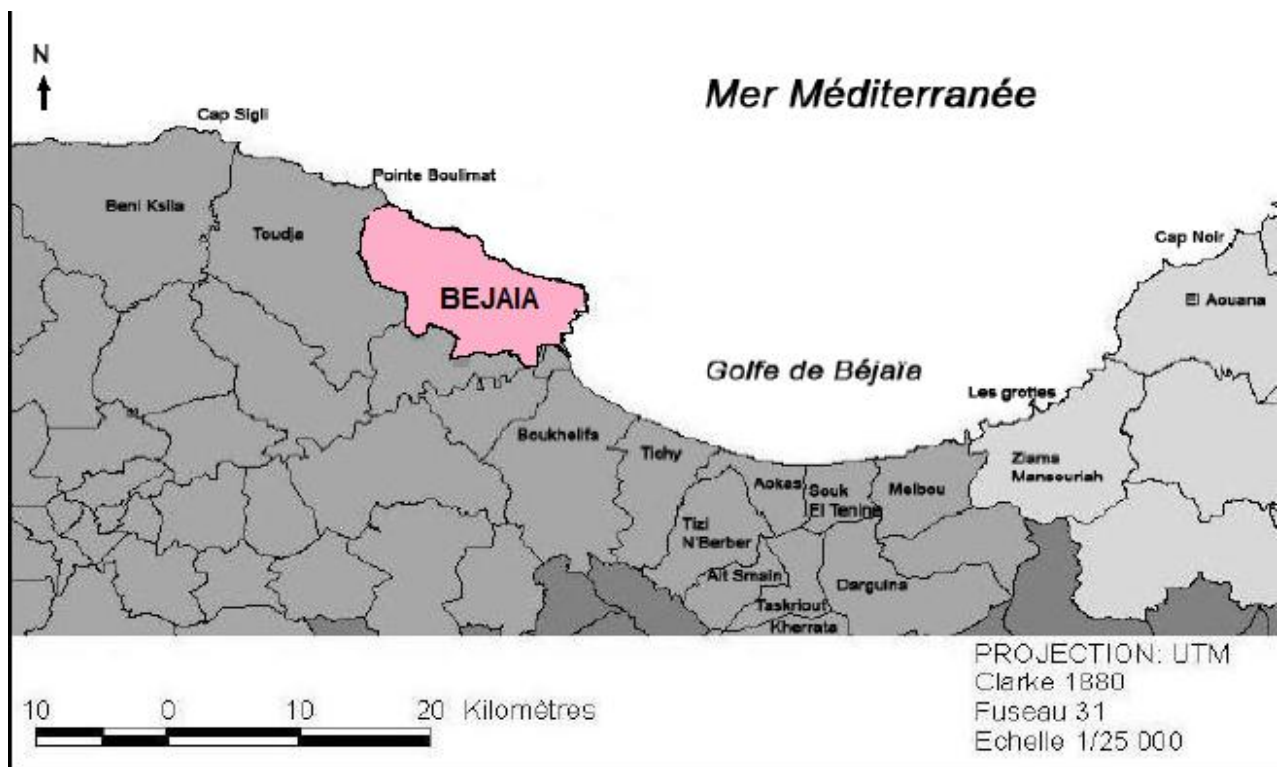


Figure 12 - Situation géographique de la région de Bejaia

II.1.2. - La zone d'échantillonnage

Notre région d'échantillonnage est représentée par quatre zones appartenant toutes à la commune de Bejaia. Elle compte: Iheddaden ufela, Ighil ouzougue, Tizi, et Sidi-Ahmed. Six écoles primaires appartenant à ces régions ont été visitées.

II.2. - Matériel

II.2.1. - Matériel biologique

Il s'agit de l'ensemble des poux de tête collectés à différents stades de développement lentes, larves et adultes.

II.3. – Méthodologie de travail

II.3.1. - Méthode d'échantillonnage

Le travail réalisé sur le terrain, consiste un prélèvement direct des poux de tête sur les élèves des écoles primaires dont l'âge est compris entre 5 et 11 ans (**Fig. 13**). Avec l'autorisation de la direction de la santé de la wilaya de BEJAIA, et l'autorisation d'accès aux différents UDS de l'EPSP de BEJAIA, et en collaboration avec le service de la médecine de prévention et des médecins coordinateurs; la collecte a été menée sur une durée de quatre semaines entre le mois de Février et le mois de Mars à raison de trois sorties par semaines.

Un examen attentif des cheveux de chaque patient a été réalisé à l'œil nu et avec des mains gantées. Les cheveux des patients atteints de la pédiculose du cuir chevelu est confirmée si des lentes, des larves ou des adultes ont été observés. Les ectoparasites sont collectés à la main et sont directement introduits dans des tubes à sec codifiés où ils seront conservés dans de l'éthanol à 90°. Le nom, le prénom, l'âge, le sexe et le nombre de poux collectés de chaque patient sont respectivement mentionnés en correspondance avec le code d'échantillonnage inscrit sur chaque tube.



Figure 13 - Examen sur les cheveux d'un patient (**Originale, 2017**)

II.3.2. - Méthodes de travail au laboratoire

II.3.2.1. - Identification morphologique des spécimens

Les poux de tête collectés sont observés sous la loupe binoculaire (Gr ×40) et sont affiliés au genre et à l'espèce en se basant sur la clé dichotomique de **Pajot (2000)**.

II.3.2.2. - Diagnostique moléculaire d'*Acinetobacter* sp.

La détection moléculaire de l'ADN des *Acinetobacter* sp par la technique de la RT-PCR (PCR en temps réel) en utilisant des amorces spécifiques au gène amplifié.

II.3.2.2.1. - Extraction de l'ADN génomique

Principe: Désorganiser les membranes cellulaires en émulsionnant leurs lipoprotéines à l'aide d'un détergent, puis faire précipiter l'ADN.

Cette technique est réalisée à l'aide d'un Kit spécial : QIA amp (kit QIAGEN®, Hilden, Germany) selon le protocole ci-dessous (**Fig. 14**).

➤ **Etape 01: La lyse**

- ✓ Rincer à l'eau distillée stérile le matériel biologique à extraire son ADN afin d'éliminer toute trace d'alcool.
- ✓ Couper les échantillons en petit morceaux et les introduire dans des tubes Eppendorfs préalablement numérotés et codés.
- ✓ Ajouter 180µl de **Genomic Digestion Buffer** (Broyage chimique).
- ✓ Ajouter 20µl de la **protéinase K**, puis agiter rapidement à l'aide du vortex.
- ✓ Incuber les échantillons dans un bain à sec à 55° C pendant une nuit.
- ✓ Faire une centrifugation rapide à 8000 tr/min pendant 30 seconde.
- ✓ Ajouter 200µl d'**AL**, puis agiter 15 secondes au vortex.
- ✓ Mettre les échantillons au bain sec à 70° C pendant 10 minutes, et centrifuger rapidement.
- ✓ Ajouter 200µl d'**éthanol**, et agiter pendant 15 secondes.
- ✓ Verser le mix dans les tubes collecteurs à filtre.
- ✓ Centrifuger les tubes pendant 1minute à 8.000 tr/min.

➤ **Etape 02: Purification**

- ✓ Jeter l'éluât et placer le filtre dans un nouveau tube collecteur.
- ✓ Faire un premier lavage avec 500µl d'**AW1**.
- ✓ Centrifuger 1minute à 8.000 tr/min.
- ✓ Jeter l'éluât et placer le filtre dans un nouveau tube collecteur.
- ✓ Faire un deuxième lavage avec 500µl d'**AW2**.
- ✓ Centrifuger 4 minutes à 10.000 tr/min.

- ✓ Jeter l'éluat et placer le filtre dans un nouveau tube collecteur.
- ✓ Centrifuger une nouvelle fois 1 minute à 10.000 tr/min.
 - **Etape 03: Elution**
- ✓ Placer le filtre dans un nouveau tube Eppendorf
- ✓ Ajouter 200µl de tampon **AE**
- ✓ Incuber 1 à 5 minutes à température ambiante et centrifuger une dernière fois pendant 1 minute à 8.000 tr/min.
- ✓ Récupérer l'éluat qui contient l'échantillon d'ADN
- ✓ Conserver le résultat à + 4°C

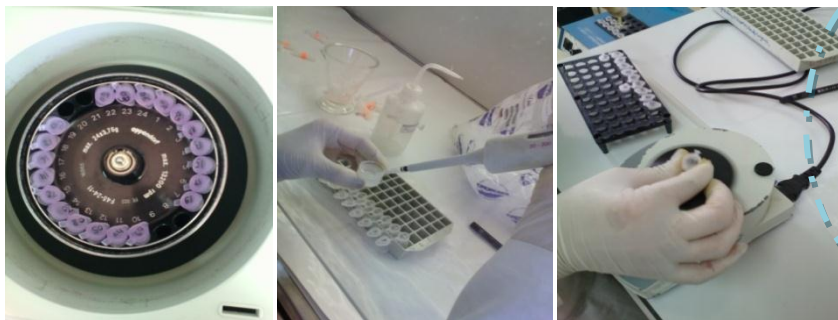
Chapitre II. Matériel & méthodes



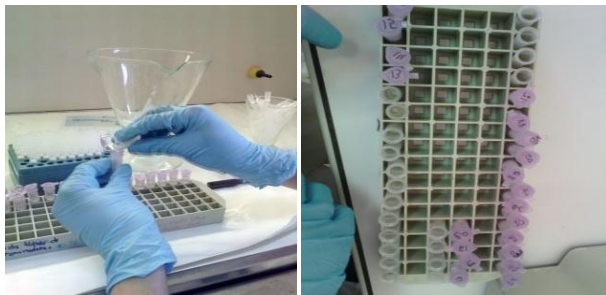
Rincer les poux avec de l'eau distillée puis on coupe l'échantillon longitudinalement et le mettre dans des Eppendorf, et ajouter 180µl Du broyeur chimique.



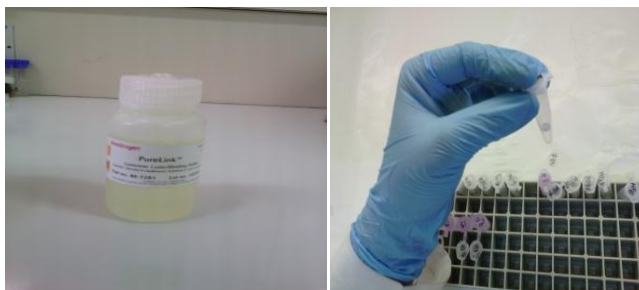
Ajouter 20µl de la protéinase K, puis mélanger au vortex et incubé les échantillons dans le bain à sec à 37°C une nuit.



Centrifuger rapidement à 5000 tr/min pendant 30secondes, et ajouter 180µl d'AL, puis mettre au vortex et incubé 10 min au bain à sec. Ajouter 200µl d'éthanol et remettre au vortex.



Verser le mix dans les tubes collecteurs à filtre, centrifuger 1 min à 8000 tours.
Jeter l'éluât et placer le filtre dans un nouveau tube collecteur.



Effectuer un 1^{er} lavage avec 500 µl d'AW1, centrifuger 1 min à 8000 tr/min. Jeter l'éluât et placer le filtre dans un nouveau tube collecteur, puis un 2^{ème} lavage avec 500 µl d'AW2 et centrifuger à 14000 tr/3min récupérer l'éluât contenant l'ADN.

Figure 14 - Principales étapes d'extraction d'ADN (Originale 2017).

II.3.2.2.2. - La PCR en temps réel

II.3.2.2.2.1. - Préparation du mix :

Elle est réalisée sous conditions aseptiques pour éviter toute contamination (sous une hotte-biocap). Le volume et le rôle de chacun des composants du Mix de la PCR sont représentés dans le tableau suivant:

Tableau 1. : Composants du Mix de la PCR :

Produit	Rôle	Volume pour un échantillon	Concentration totale
Master mix	Remplace le Kit	10 µl	1X
Primer 1	Le reverse et le forward	0,5 µl	0,5 µM
Primer 2		0,5 µl	0,5 µM
Sonde	Spécificité et la lecture	2 µl	0,2 µM
Eau distillée stérile	Pour l'équilibre	2 µl	
total mix	-	15 µl	
total avec ADN		20 µl	

Chaque constituant du mix est multiplié par le nombre d'échantillons étudiés, puis 20µl de ce mélange est distribué dans chaque tube avec 5 µl de l'échantillon d'ADN à tester (issu de l'extraction) alors que :

- Témoin négatif : 5µl d'eau distillé stérile plus 20µl du mix
- Témoin positif : 5µl d'ADN positif avec 20µl du mix

II.3.2.2.2.2. - Amplification par Smart Cycler

La RT-PCR utilisée est basée sur la technologie TaqMan mise en œuvre sur des prélèvements biologiques, elle utilise les sondes et amorces citées dans le Tableau 2.

Tableau 2. Sonde et amorces utilisées en PCR en temps réel.

Organisme ciblé	Amorces et sonde	Séquence (5`-3`)
<i>Acinetobacter</i> sp.	Forward: F	5`-TAC-TAC-TAT-ACC-GAA-AAG-AAA-CGG-3`
	Forward: R	5`-GGY-TTA-CCA-AGR-CTA-TAC-TCA-A-3`
	Sonde: S	6FAM-CGC-GAA-GAT-ATC-GGT-CTS-CAA-GC-TAMRA

L'amplification est réalisée sur l'automate Smart Cycler qui est couplé à un spectrofluorimètre piloté par un ordinateur qui permet l'acquisition et le suivi en temps réel

des données ainsi que leur traitement (**Fig. 15**). Cet appareil présente l'avantage d'avoir 32 puis fonctionnant indépendamment les uns des autres et permet de lancer différentes PCR en même temps. L'amplification comprend deux étapes : activation de la Taq polymérase (chauffage à 95° pendant 2 minutes puis activation pendant 15 minutes). Suivie de 40 cycles d'amplification de 75 secondes chacun:

- Dénaturation de l'ADN : 15 secondes à 95°C
- Hybridation : 30 secondes à 60°C
- Extension : 30 secondes à 72°C.

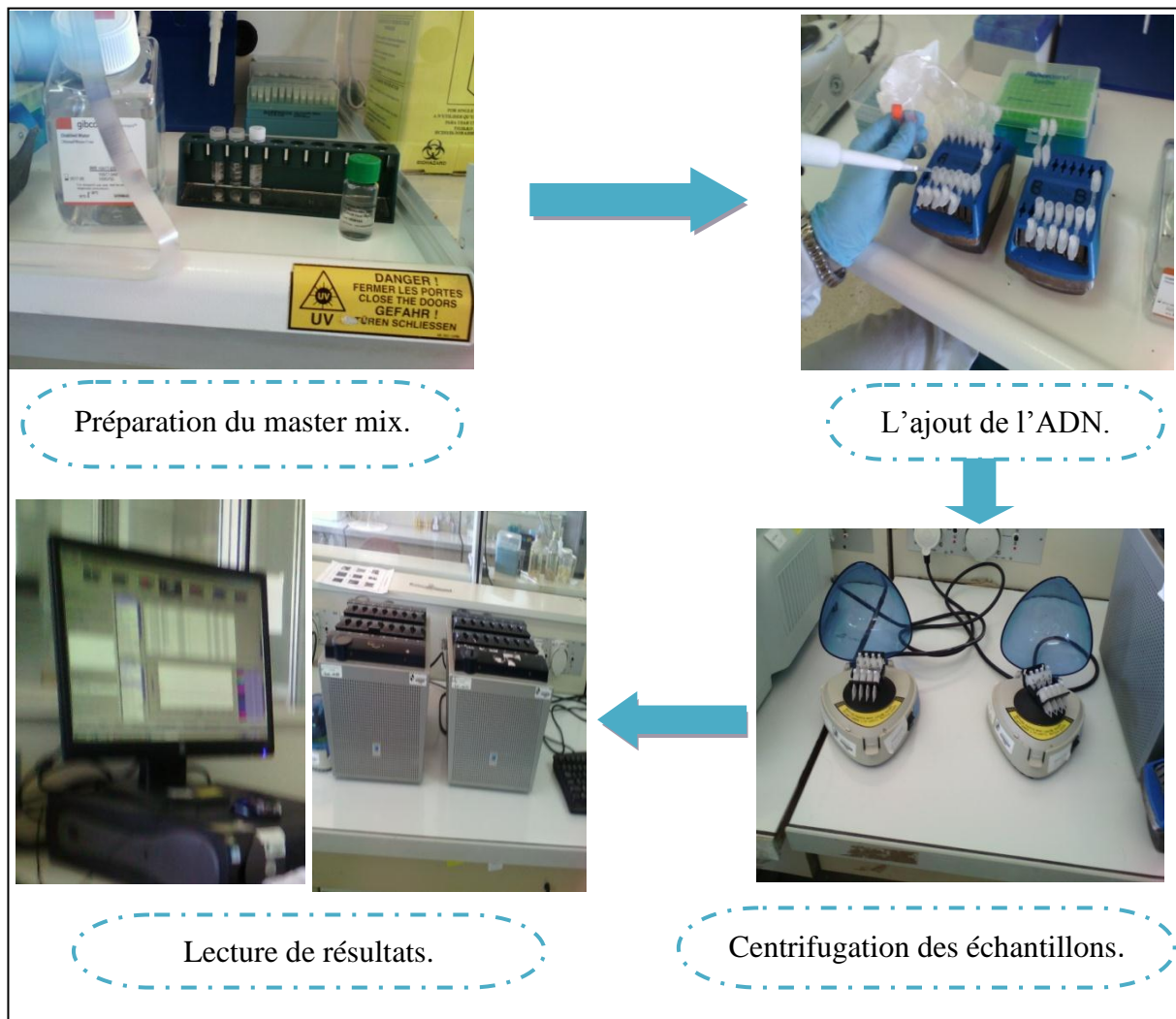


Figure 15 - Protocole expérimental de la PCR en temps réel (Originale, 2017).

II.3.2.2.3. - Vérification du produit par la PCR standard

II.3.2.2.3.1. - Préparation du gel d'agarose 1,5%

- Peser 6 g d'agarose dans une bouteille en verre
- Ajouter 400 ml de Tampon **TBE** 0,5X

- Faire fondre la préparation aux micro-ondes
- Ajouter 15 µl de Sybr safe
- Verser 50 ml du mélange dans un grand support
- Verser 30 ml du mélange dans un support moyen

La polymérisation se fait entre 10 à 15 min à température ambiante.

Le gel polymérisé peut se conserver 24h au réfrigérateur, enveloppé dans du parafilm.

II.3.2.2.3.2. - L'électrophorèse

- Oter le peigne et immerger le gel et son support dans la cuve de migration contenant du tampon TBE 0,5X (**Fig. 16**).
- Mélanger 6 µl de produit de PCR et 2 µl de bleu de charge (Blue juice loading buffer).
- Déposer 6 µl de ce mélange dans un puits. Procéder ainsi pour chaque échantillon.
- Procéder à la migration à 135 volts pendant 20 min.
- La lecture se fait sous un transilluminateur UV.

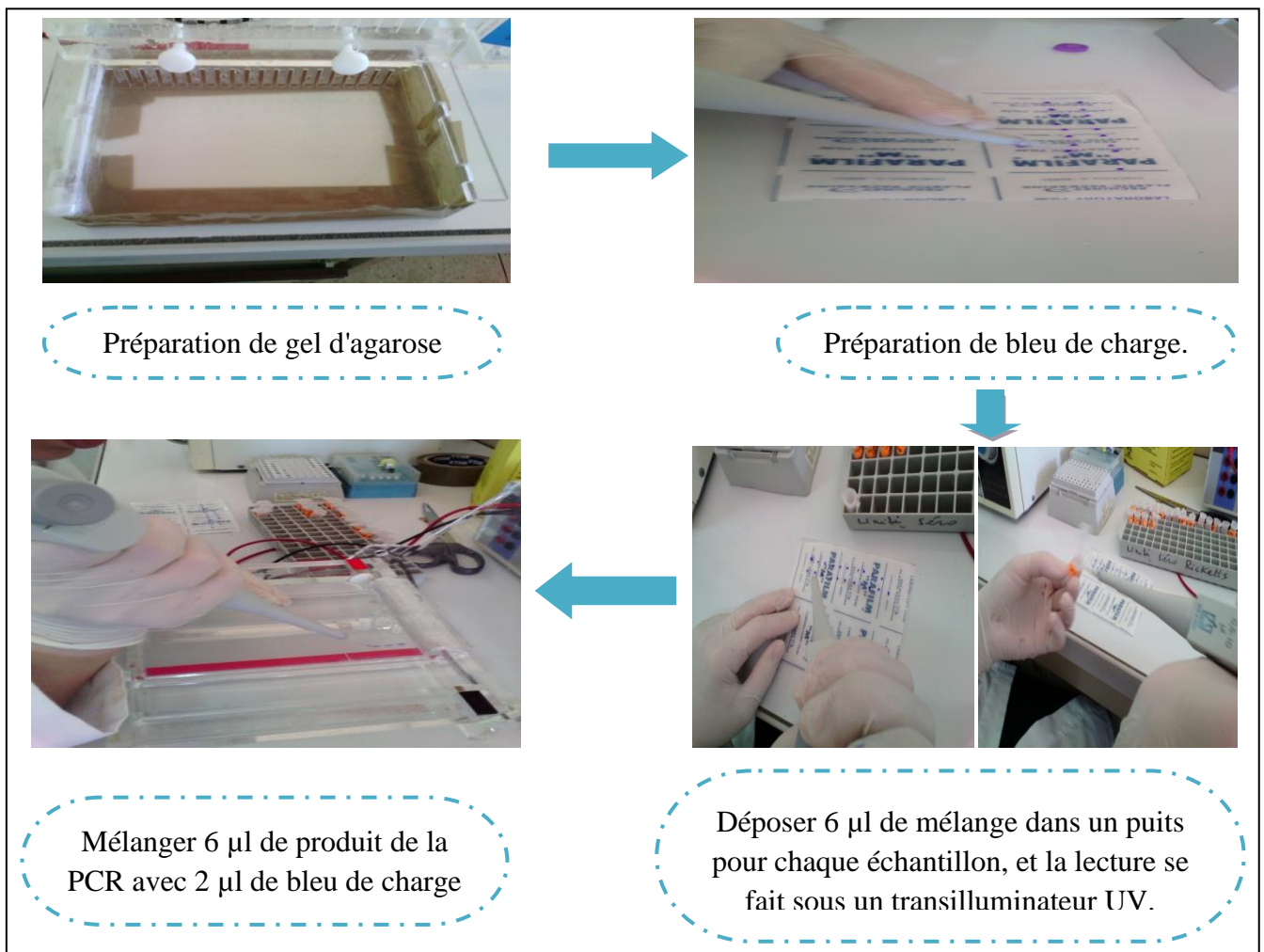


Figure 16 - Protocole expérimental de la PCR standard avec le gel agarose (**Originale 2017**).

II.3.3. - Exploitation des résultats

II.3.3.1. - Les indices parasitaires

La prévalence ainsi que l'abondance et l'intensité moyenne des poux collectés ont été calculés avec les indices parasitaires proposés par (Marjoli et al., 1982) par les formules suivantes:

La prévalence (P) : c'est le rapport en pourcentage du nombre d'élèves infestés par les poux de tête (N) par le nombre d'élèves examinés (H).

$$P (\%) = N/H \times 100$$

L'Abondance (A) : elle comprend le rapport du nombre total des espèces parasites (p) par le nombre total d'élèves examinés (H)

$$A = p/H$$

L'intensité (I) : elle correspond au rapport du nombre total des espèces parasites (p) par le nombre d'élèves infestés (N)

$$I = p/N$$

II.3.3.2. – analyse statistique des résultats de l'infestation

L'analyse statistique des résultats de l'infestation par les poux de tête est réalisée par l'application de deux tests statistiques : test de Wilcoxon (test paramétrique) et le test de Kruskal-Wallis (test non paramétrique).

L'emploi de ce test dans notre présente étude a pour but de comparer les prévalences d'infestation et d'infection selon plusieurs catégories.

Chapitre III.

Résultats

Dans cette partie, nous traitons les différents résultats obtenus lors de notre étude concernant l'identification morphologique, l'exploitation par les indices parasitaires et l'analyse statistique ainsi que les résultats de la PCR.

III.1. - Identification morphologique des poux de tête

Les échantillons ont été prélevés des têtes des écoliers, cet emplacement nous indique qu'il s'agit des poux de tête.

Suivant la clé de **Pajot (2000)**, des critères morphologiques bien déterminés observés chez nos spécimens sous la loupe binoculaire confirment l'espèce *Pediculus humanus capitis* :

- Les proportions des segments antennaires
- Les proportions du fémur de la deuxième paire de patte
- Le nombre et la forme des soies des sternites abdominaux

La détermination du sexe telle qu'elle est décrite par **Pajot (2000)** se fait sur la base de:

- La taille des individus
- La forme de l'extrémité abdominale

La présence d'une griffe au niveau du tibia droit chez le mâle qui lui sert à accrocher la femelle lors de l'accouplement.

Les poux de tête sont donc de petits insectes au corps allongé deux fois plus long que large ne dépasse pas 4 mm de long, la femelle (**fig. 17.A**) est souvent plus grande que le male (**fig. 17.B**), la couleur d'un pou est varié entre brune et grise, la tête (**fig. 17.C**) porte une paire d'antenne courtes formées de 5 segments et une paire de lentilles distinctes, abdomen allongé, plus large que le thorax, avec des paratergites en forme de lobes ou de cupules sclérifiées, les pattes sont toute subégales en taille et en forme avec une griffe sur le tibia droit chez le male qui lui permet d'accrocher le femelle lors de l'accouplement (**figure 17.D**).

L'extrémité abdominale est formée d'un pénis rétractile triangulaire couvert de petites soies chez le male (**figure 17.E**), et d'une échancrure chez la femelle (**figure 17.F**). Cette échancrure est formée d'une paire de gonopodes pointus couverts de soies qui servent à déposer et fixer les œufs lors de la ponte.

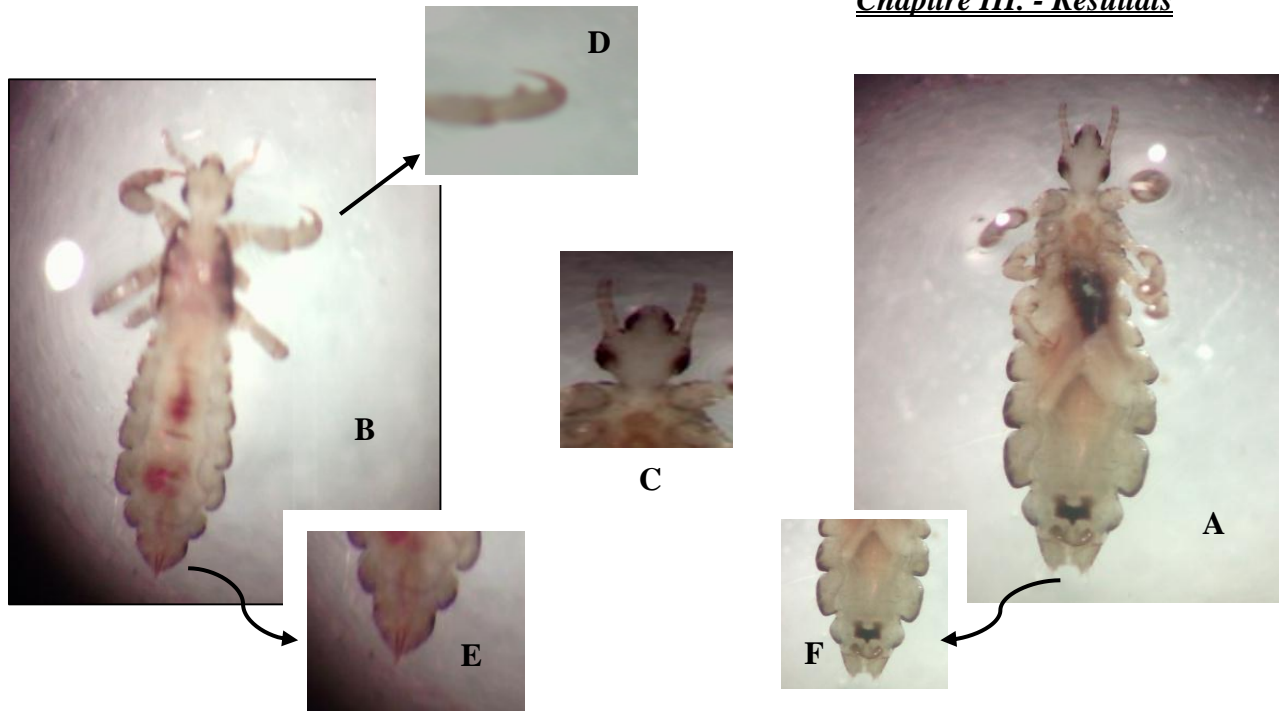


Figure 17 – étude morphologique d'un pou de tête (Originale, 2017).

A : pou de tête femelle ; **B** : pou de tête male ; **C** : la tête ; **D** : griffe du tibia droit chez le male ; **E** : extrémité abdominale chez le male ; **F** : extrémité abdominale chez la femelle.

III.2. - Exploitation des résultats par les indices parasitaires

Les résultats de l'échantillonnage des poux de tête de la région de Bejaia sont regroupés et exploités par le calcul des différents indices parasitaires représentés dans le tableau ci-dessous. (Tableau 3).

Tableau 3 - Résultats des indices parasitaires des régions étudiées.

Régions		H Nombre total des patients	N Nombre de patients infestés	p Nombre d'espèces parasite	P Prévalence %	A Abondance	I Intensité
Iheddaden oufela	Ecole 1	242	2	1	0,8	0,004	0,5
Sidi Ahmed	Ecole 2	307	4	1	1,3	0,003	0,25
	Ecole 3	278	1	1	0,3	0,003	1
Tizi	Ecole 4	554	8	1	1,4	0,001	0,125
Ighil ouzougue	Ecole 5	250	5	1	2	0,004	0,2
	Ecole 6	269	0	1	0	0	0
Total		1892	20	1	1,05	0,0005	0,05

Sur un total de 1892 élèves (994 filles et 898 garçons) examinés dans 6 écoles primaires de la région de Bejaia, 20 patients ont été porteurs de poux sur leurs têtes. Cela nous donne une prévalence d'infestation de 1,05%.

Le taux d'infestation le plus important est marqué au niveau de l'école 5 avec une prévalence de 2%, suivi par l'école 4 et l'école 2 avec un petit écart de prévalence : respectivement 1,4% et 1,3%. La prévalence est moins importante dans les écoles 1 et 3 et atteint 0% au niveau de l'école 6.

Il est à noter que les deux écoles qui ont marqué le plus haut taux d'infestation (école 5) et le plus bas taux d'infestation (école 6) appartiennent à la même zone d'étude (Ighil ouzougue).

III.3. - Résultats de l'analyse statistique de l'infestation

Dans le but de comparer la prévalence d'infestation entre nos 4 zones d'étude et aussi la prévalence d'infestation par sexe, différents tests statistiques ont été appliqués.

III.3.1. - Infestation par régions

Pour exploiter les résultats de l'infestation par région on a prit en considération la prévalence de l'infestation par région qui sont regroupés dans le tableau 4. Et les résultats de l'analyse statistique par le test de Kruskal-Wallis sont représentés dans le tableau 5.

Tableau 4 – Prévalence d'infestation par région.

Région		Prévalence (%)	Total (%)
Iheddaden ufella	Ecole 1	0,8	0,8
Sidi Ahmed	Ecole 2	1,3	0,8
	Ecole 3	0,3	
Tizi	Ecole 4	1,4	1,4
Ighil ouzougue	Ecole 5	2	1
	Ecole 6	0	

L'infestation la plus importante est marquée dans la région de Tizi avec un taux de 1,4%, suivie par la région de Ighil ouzougue avec un taux de 1%, et 0,8% pour les deux autres régions (Iheddaden ufella et Sidi Ahmed).

Pour l'étude de la différence d'infestation par régions la normalité a été vérifié par le test de Shapiro-Wilk qui a révélé que : $p(0,8819) > 0,05$. Donc un test non paramétrique est appliqué (test de Kruskal-Wallis) et nous a donné les résultats présentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau 5 – Résultats du test de Kruskal-Wallis pour l’infestation par région

Paramètres	DDL	SC	CM	P-value
Totaux	30,27333	0,09111	0,0729	0,9691

L’analyse statistique révèle que $p > 0.05$ et cela signifie que la différence d’infestation entre les 4 zones d’étude est non significative.

III.3.2. - Infestation selon le sexe

Pour exploiter les résultats de l’infestation par sexe on a prit en considération la prévalence de l’infestation par sexe qui sont représentés dans le tableau 6 et la figure 18. Et les résultats de l’analyse statistique par le test Wilcoxon sont représentés dans le tableau 7.

Tableau 6 : Prévalence d’infestation par sexe.

Régions		Garçons	Filles
Iheddaden oufela	Ecole 1	0	2
Sidi Ahmed	Ecole 2	0	4
	Ecole 3	0	1
Tizi	Ecole 4	1	7
Ighil ouzougue	Ecole 5	1	4
	Ecole 6	0	0

Un deuxième paramètre de comparaison de l’infestation des écoliers par les poux de tête dans cette étude est le sexe; sur les 1892 élèves examinés on a trouvé 18 fille sur 994 qui sont infestées par les poux de tête soit un pourcentage de 1.81%, et seulement 2 garçons sur les 898 examinés sont infestés soit un taux de 0.22%. Cela dit que la pédiculose capillaire est présente beaucoup plus chez les filles que chez les garçons. **La figure 18** montre ce résultat en histogramme.

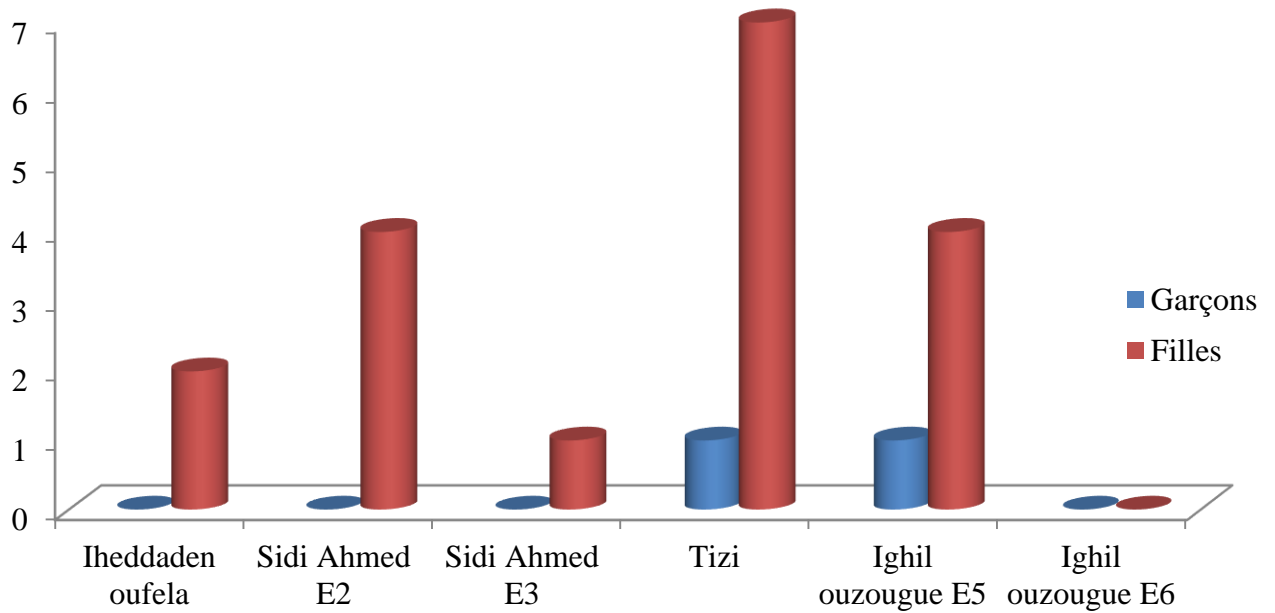


Figure 18. Prévalence d’infestation par les poux de tête en fonction du sexe.

Le test student (Wilcoxon) a été appliqué après la vérification de la normalité par le test de Shapiro-Wilk afin de définir la différence d’infestation entre les filles et les garçons, et les résultats du test sont représentés dans le tableau suivant :

Tableau 7: Résultats du test de Wilcoxon.

Paramètres	W	P-value
Totaux	31,00	0,03615

Le test de Wilcoxon montre que $P\text{-value} < 0,05$; cela signifie que la différence d’infestation entre les deux sexes est statistiquement significative cela confirme l’hypothèse que l’infestation par les poux de tête touche beaucoup plus les filles que les garçons.

III.4. - Résultats de la PCR en temps réel

La technique de la PCR en temps réel a été appliquée afin de détecter les *Acinetobacter* sur les échantillons de poux de tête. Sur un total de 81 poux collectés l’analyse par la RT-PCR a été menée sur 20 spécimens choisis aléatoirement.

Un résultat dit positif signifie que l'ADN bactérien est présent dans les spécimens, cet ADN est directement détecté grâce à des amorces spécifiques et une sonde d'hybridation pour le genre bactérien *Acinetobacter* (*rpoBF* et *rpoBR*).

Les résultats de cette analyse sont représentés dans le graphe (Fig. 19) légendés en annexes (Annexe III) et sont détaillés dans le tableau 8.

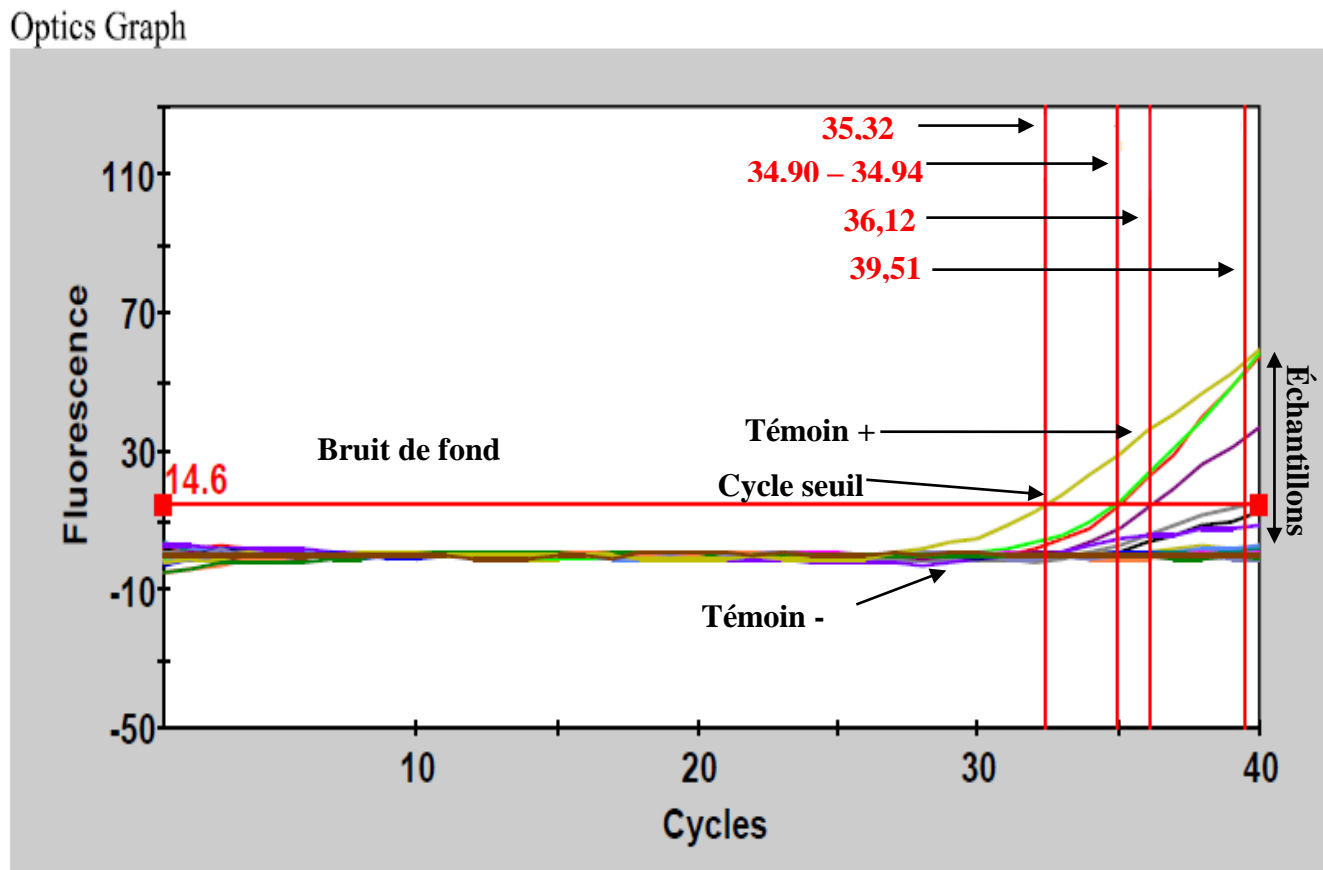


Figure 19 : Résultats de la RT-PCR donnés par SmartCycler. (Originale, 2017)

La figure 19 représente la quantité de l'ADN des poux de tête amplifiée qui est exprimée par le taux de fluorescence au bout de 40 cycles de la PCR.

La concentration des spécimens en *Acinetobacter* est contrairement liée aux nombres de cycles d'amplification : plus la concentration est élevée moins il faudra de cycles pour atteindre le cycle seuil. L'ADN bactérien est amplifié et dupliqué à chaque cycle jusqu'à atteindre une concentration seuil au bout du cycle n°32 sur le graphe qui marque le début de la phase exponentielle. A ce niveau, un marqueur chimique fluorescent se fixe sur les séquences de l'ADN bactérien pour indiquer la présence des *Acinetobacter* dans les échantillons.

Sur le graphe on remarque 3 phases bien distinctes de l'évolution de la fluorescence au cours du temps :

- La phase du bruit du fond qui va de 0 au cycle n°32 : dans cette phase la quantité de l'ADN amplifié n'est pas assez importante pour marquer un signal fluorescent.
- La phase exponentielle (cycle n°32-cycle n° 40) : la concentration de l'ADN bactérien dépasse le seuil de détection fluorescente du thermocycleur.
- La phase de plateau : marquée au niveau du cycle n° 40 où l'amplification de l'ADN bactérien est limitée par le nombre de molécules de Taqman.

Tableau 8 : résultats de l'infestation de poux par *Acinetobacter* sp. Par la RT-PCR.

Régions		Nombre de patients infestés	Nombre total des poux	Nombre de poux examinés	Résultat de la PCR-RT (Nombre de poux infestés)%
Iheddadhen oufela	Ecole 01	2	14	2	0 = (0%)
Sidi Ahmed	Ecole 02	4	12	4	2 = (50%)
	Ecole 03	1	1	1	0 = (0%)
Tizi	Ecole 04	8	34	8	1 = (12,5%)
Ighil ouzougue	Ecole 05	5	20	5	1 = (20%)
	Ecole 06	0	0	0	0 = (0%)
Total		20	81	20	4 = (20%)

L'examen de la PCR en temps réel nous a révélé un pourcentage de 20% de poux infectés par *Acinetobacter*. Soit un nombre total de 4 poux infectés sur les 20 poux examinés.

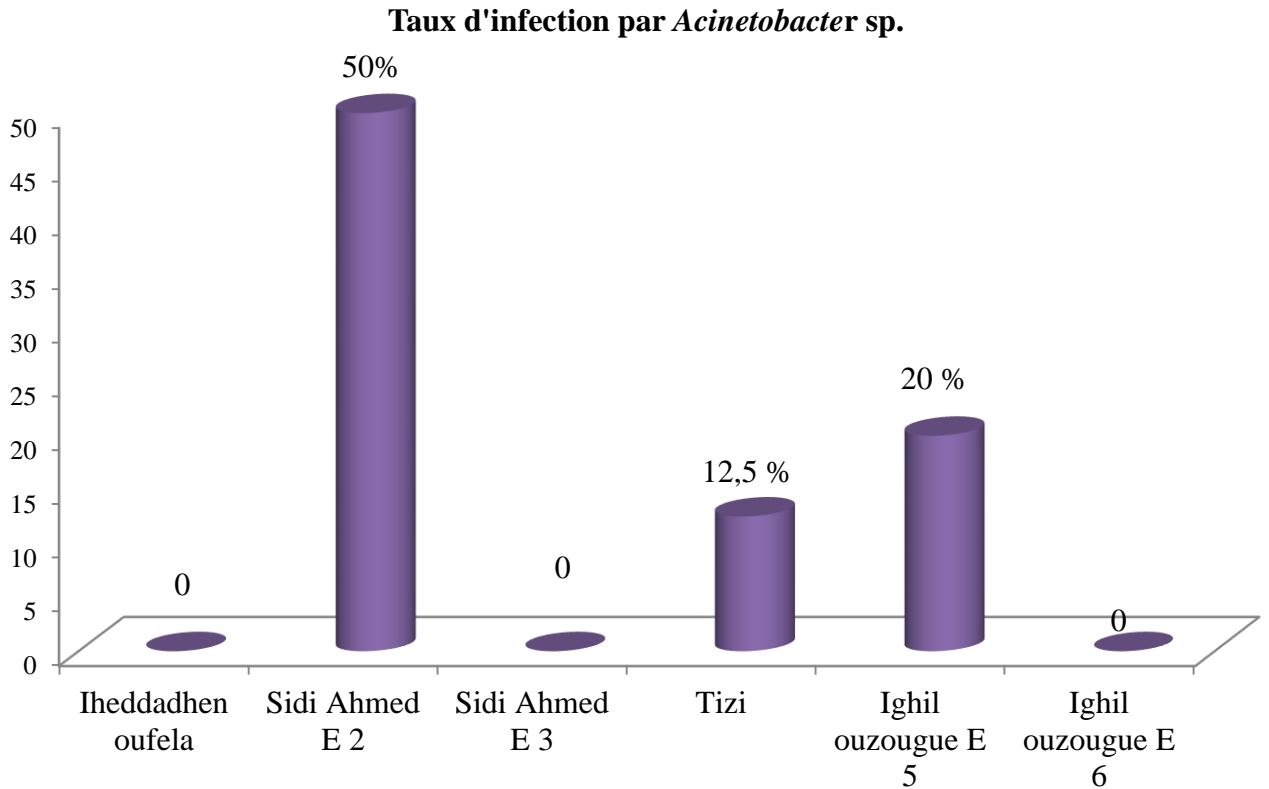


Figure 20 : prévalence d'infection des poux par *Acinetobacter* sp. selon les régions.

Le pourcentage le plus élevé d'infection est indiqué au niveau de la région de « sidi Ahmed » avec une prévalence d'infection de 25% (50% pour l'école 2 et 0% pour école 3), suivit par la région de « Tizi » avec une prévalence de 12,5%, puis la région de « Ighil ouzougue » avec prévalence d'infection de 10%. Les poux provenant de la région de « Iheddadhen oufela » n'ont marqués aucune infection par *Acinetobacter* sp.

Chapitre IV.

Discussion

Les différents résultats obtenus concernant l'identification morphologique, les indices parasitaires et l'analyse statistique ainsi que les résultats de la RT-PCR sont comparés aux résultats d'autres travaux similaires et discutés dans cette partie.

IV.1. - Discussion sur l'identification morphologique

Les 81 poux collectés ont été observés soigneusement sous la loupe binoculaire pour identification morphologique. L'affiliation au genre et à l'espèce de *Pediculus humanus capitis* a été réalisée en mettant en évidence des caractères morphologiques observés sur le corps des poux et définis par **Pajot (2000)**: les proportions du fémur et de la deuxième paire de pattes, le nombre et la forme des sternites abdominales ainsi que les proportions des segments antennaires en revanche **Guezi (2015)** s'est basé dans son étude sur le séquençage du gène *Cytb* afin de confirmer l'espèce *Pediculus humanus capitis*.

La détermination du sexe suivant la clé de **Pajot (2000)** est basée sur la comparaison de la taille des individus adultes, la forme de l'extrémité abdominale et la présence d'une griffe sur le tibia droit du mâle lui permettant d'accrocher la femelle lors de l'accouplement.

IV.2. - Discussion des résultats des indices parasitaires et de l'analyse statistique

Sur un total de 1892 élèves (994 filles et 898 garçons) qui ont été examinés, seulement 20 élèves sont porteurs de poux sur leurs têtes. Les résultats ont révélé un taux d'infestation général de 1,05% des patients positifs à la pédiculose du cuir chevelu. L'analyse statistique par test de Kruskal-Wallis a révélé que la différence d'infestation est statistiquement non significative entre les quatre régions où s'est déroulée la collecte. Par contre, le test de student (Wilcoxon) a démontré le taux d'infestation qui est significativement plus élevé chez les filles (1,81%) que chez les garçons (0,22%). Nos résultats confirment ceux des travaux réalisés par Boutellis et ses collaborateurs en 2011 qui ont collecté 26 poux des têtes de filles uniquement dans la région Ouest d'Alger (**Boutellis et al., 2015**). Certaines études réalisées dans différentes régions en Algérie ont prouvé également par le calcul du Khi-2 que la différence d'infestation est significative selon le sexe et non significative selon les différentes zones d'études; en effet, une étude menée sur 1096 élèves (592 filles et 504 garçons) provenant de quatre régions de l'Est d'Alger a révélé que le taux d'infestation chez les filles était de 23,08% largement plus élevé que le taux des garçons (5,85%) (**Guezi, 2015**). Une autre étude réalisée dans quatre régions de l'Ouest de Tlemcen a révélé que sur 252 filles examinées 26,96% ont été infestées par contre sur 204 garçons 7,69% seulement ont été

infestés (**Ouis, 2016**). À Tizi-ouzou, une autre étude menée dans quatre régions du centre-ouest affirme que sur un total de 1532 patients examinés, le taux d'infestation était nettement plus élevé en faveur des filles (2,77%) comparé à celui des garçons (0,30%) (**Houchi et Kara, 2016**). Une récente étude menée sur 1477 élèves (669 filles et 808 garçons) dans quelques établissements scolaires de wilaya de Sétif a révélé que la pédiculose est très marquée chez le sexe féminin que chez le sexe masculin une prévalence de 4,87% chez les filles et 1,90% chez les garçons ce qui traduit une différence d'infestation statistiquement significative (**Ameyri et Choudar, 2017**).

En outre, beaucoup d'auteurs à travers le monde ont déclaré que la pédiculose capillaire atteint plus souvent les filles que les garçons. En effet, Doroodger et ses collaborateurs en 2014 ont trouvé que la prévalence d'infestation par les poux de tête dans les milieux urbain d'Aran et Bidgol (Iran) était de 47%, dont 42% était des filles et 5% seulement des garçons (**Doroodger et al., 2014**). Aussi Eric en 2000 dans son travail sur les pédiculoses humaines souligne que les filles sont plus infestées que les garçons: 60% contre 40%. Cela est dû au fait que les filles laissent pousser leurs cheveux ce qui facilite le déplacement des poux et rend difficile le repérage de lentes et la procédure d'épouillage (**Badiaga et Brouqui, 2012**). Mis à part ce rôle controversé, la femelle pou produirait plus de vitamines du genre B lorsqu'elle prend son repas sur un hôte féminin ce qui favorise sa fécondité. (**Eric, 2000**).

IV.3. - Discussion des résultats de la PCR en temps réel

Les 20 poux qui ont été sélectionnés pour l'identification morphologique sont ensuite traités par une chaîne de réactions afin d'extraire leurs ADN génomique qui a été testé par la RT-PCR avec des amorces et une sonde spécifique afin de détecter la présence de bactérie du genre *Acinetobacter*.

Effectivement, nos résultats révèlent que 20% des poux testés sont positifs. Cette prévalence est bien moins importante que celles retrouvées dans d'autres études réalisées précédemment dans différentes régions d'Algérie; notamment le taux d'infection à Alger-Est était de 64.44% (**Guezi, 2015**), à Tizi-ouzou 75% d'après l'étude de **Houchi et kara (2016)**, 75% également à l'ouest de Tlemcen d'après **Ouis (2016)**, et 45% à Sétif d'après l'étude de **Ameyri et Choudar (2017)**. Cette bactérie a été également trouvée dans des poux de tête collectés à partir des écoliers de Paris (France) avec une prévalence de 47% (**Bouveresse et al., 2012**) et dans des poux de tête (7,1%) et des poux de corps (69%) collectés en Ethiopie (**Kempt et al., 2012**).

Dans notre étude nous avons ciblé le genre *Acinetobacter*, mais dans d'autres travaux des chercheurs ont détecté l'espèce *Acinetobacter baumannii* et ont révélé que le taux d'infection des poux de tête par cette bactérie varie d'un pays à l'autre: 45,4% au Sénégal, 4,34% au Mali, et 21,4% à la République Démocratique du Congo (**Sangaré et al., 2014**). Elle a également été identifiée dans des poux de tête en Thailand avec un taux d'infection de 20% (**Sunantarapom, 2015**).

La présence de *Acinetobacter baumannii* dans un large spectre d'arthropodes laisse supposer que c'est une bactérie endosymbionte (**Bouveresse et al., 2012**). En effet, ces dernières années, l'ADN de *Acinetobacter baumannii* a été trouvé dans différentes espèces de mouches (*Melophagus ovinus*) collectés sur des animaux domestiques en Ethiopie (**Kumsa et al., 2012**), dans le phlébotome (*Luizomyia longipalpis*) au Brésil (**Gouveia et al., 2008**), et le psylle de la pomme de terre (*Bacteracera cockerelii*) aux Etats-Unis (**Nechappa et al., 2011**). Cependant, malgré plusieurs investigations de transmission de nombreux agents infectieux, aucune preuve concluante n'a démontré que les poux de tête peuvent contribuer à la transmission de maladies comme le pou de corps (**Bouveresse et al., 2011**) et cela a été traduit par des chercheurs par le fait que l'activité phagocytaire du système immunitaire chez les poux de tête est plus élevé par rapport aux poux de corps, ce qui explique la compétence vectorielle très élevé chez ces derniers comparé aux poux de tête (**Kim et al., 2011**).

Conclusion et perspectives

Au terme de ce travail mené sur la détection moléculaire par RT-PCR des *Acinetobacter* sp. sur les poux de tête dans la région de Bejaïa plusieurs observations pertinentes dans le cadre entomologique et épidémiologique ont été mises en avant.

L'étude est initiée par un échantillonnage de poux de tête prélevés directement à partir des cheveux des élèves dans les établissements visités entre février et mars 2017. Un total de 81 poux est collecté puis identifié comme *Pediculus humanus capitis* en se basant sur la clé de Pajot (2000).

Parmi les 1892 élèves examinés, 20 ont été infestés par les poux marquant une prévalence de 1,05% avec un taux d'infestation nettement plus élevé chez les filles (1,81%) que chez les garçons (0,22%), l'analyse statistique par le test de student révèle que la différence d'infestation selon les quatre zones d'étude n'est pas significative alors qu'il existe une différence statistiquement significative entre les deux sexes.

L'analyse des ADN extraits des poux collectés a confirmé la présence d'*Acinetobacter* sp. dans 4 poux (adultes) sur les 20 poux testés soit une prévalence d'infection de 20% ce qui traduit un risque probable de la transmission de cet agent pathogène à l'hôte (l'Homme).

Les poux de tête affectent chaque année des centaines de millions d'enfants à travers le monde indépendamment des conditions d'hygiène et des classes sociales auxquelles ils appartiennent, cependant la transmission et la pullulation du parasite est favorisée chez les enfants d'âge scolaire qui vivent en collectivités. Jusque là, aucun rôle vecteur des agents pathogènes par les poux de tête n'a été prouvé, mais l'émergence préjudiciable des bactéries pathogènes montre que le risque de transmission par les poux de tête est loin d'être absent ce qui représente un défi mondial de sécurité sanitaire qui peu être minimisé en établissant des mesures de préventions et de lutte anti-poux puis en développant des méthodes plus efficaces de détection des pathogènes dans les poux.

Enfin, ce travail représente une première étude sur les poux de tête dans la région de Bejaia et leur rôle épidémiologique, cependant plusieurs axes de travail peuvent être envisagés afin de faire suite à cette étude en établissant les perspectives suivantes:

– Dans un premier temps, élargir l'étude vers d'autres sites de la région de Bejaia et les régions avoisinantes pour que l'étude soit plus représentative de la région en question et pour approfondir nos connaissances sur la relation hôte-parasite-environnement.

Conclusion et perspectives

- Il serait favorable de maintenir une étude durant toute l'année afin de préciser les périodes où l'infestation est plus importante et en définir les causes.
- Dans un second temps, il serait plus intéressant de faire une détection des différentes espèces d'*Acinetobacter* notamment la confirmation de l'espèce *Acinetobacter baumannii* dans les poux de tête par séquençage direct des gènes spécifiques ou par culture en milieu spécifique.

Annexe I. – Matériel non biologique

➤ **Les appareils**



Loupe binoculaire



Vortex



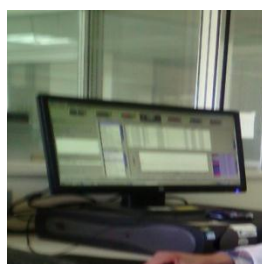
Centrifugeus



Bain a sec



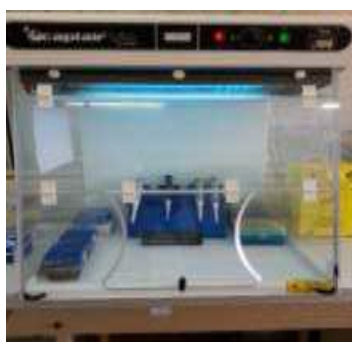
Smart cycler



Ordinateur

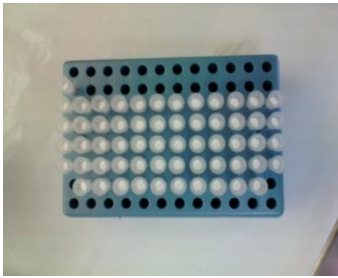


Mini centrifugeuses

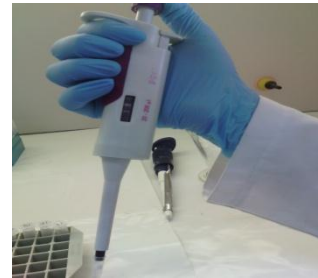


Hotte biocap

➤ **Petit matériels**



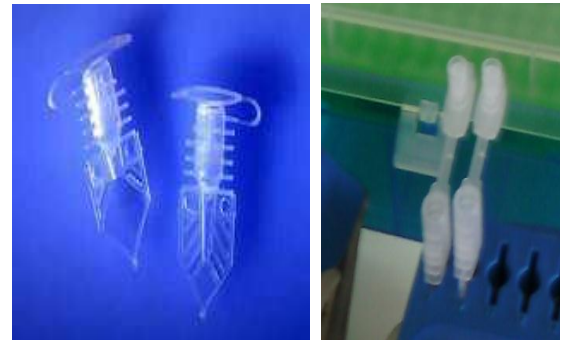
Embouts



Micropipette

























Eppendorf



Tubes smart cycler

Annexe III. - Légende des résultats de la PCR en temps réel

Site ID	Sample ID	FAM Ct	Protocol
A3 	MF1	0.00	Quantitec-FAM
A4 	MF2	0.00	Quantitec-FAM
A5 	MF3	0.00	Quantitec-FAM
A6 	MF4	0.00	Quantitec-FAM
A7 	MF5	0.00	Quantitec-FAM
A8 	MF6	0.00	Quantitec-FAM
A9 	MF7	34.96	Quantitec-FAM
A10 	MF8	34.90	Quantitec-FAM
A11 	MF9	0.00	Quantitec-FAM
A12 	MF10	0.00	Quantitec-FAM
A13 	MF11	0.00	Quantitec-FAM
A14 	MF12	0.00	Quantitec-FAM
A15 	MF13	39.51	Quantitec-FAM
B3 	MF14	36.12	Quantitec-FAM
B4 	MF15	0.00	Quantitec-FAM
B5 	MF16	0.00	Quantitec-FAM
B6 	MF17	0.00	Quantitec-FAM
B7 	MF18	0.00	Quantitec-FAM
B8 	MF19	0.00	Quantitec-FAM
B9 	MF20	0.00	Quantitec-FAM
B10 	T+	32.35	Quantitec-FAM
B11 	T-	0.00	Quantitec-FAM

*Références
bibliographiques*

- Allen J.M., C.O. Worman, J.E. Light, et D.L. Reed, 2013** - Parasitic lice help to fill in the gaps of early hominid history. *In Primates, Pathogens and Evolution*. E. Pechenkina and J. Brinkworth (eds), Springer, pp. 161-186.
- Ameyri I. et Choudar Z., 2017** – Contribution à l'étude de l'infection des poux de tête *Pediculus humanus capitis* (De Geer, 1778) par *Acinetobacter* sp. dans quelques établissements scolaires de la wilaya de Sétif. Mémoire de Master en Parasitologie, Biologie, Ecologie et Environnement. Université des Sciences et de la Technologie HOUARI BOUMEDIENE. P 26.
- Badiaga S. et Brooqui P., 2012**. Human louse-transmitted infectious diseases. *Clinical Microbiology and Infection*. 18: 332-337.
- Bernards A. T. Harinck HIJ, Dijkshoorn L, van der Reijden TJK et van den Broek PJ., 2004** - Persistent *Acinetobacter baumannii* Look inside your medical equipment. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 25, 1002-1004
- Boscher C., Llorens M., et Gette S., 2014** - Epidémie d'*Acinetobacter baumannii* multirésistant en réanimation : épidémiologie et facteurs de risque. Abstract SP 146. XXIVe Congrès National de la Société Française d'Hygiène Hospitalière.
- Boudia S., 2014** - Contribution à l'étude floristique de *Cakile maritima* Scop. (Brassicacées) dans le littoral de la région de Tlemcen. Thèse master en écologie générale et environnement. Université Abou Bekr Belkaid- Tlemcen. (91p.)
- Boutellis A., Abi-Rached L., et Raoult D., 2014** - the origine and distribution of human lice in the world. *Infect. Genet. Evol. Vol.*, 23:209-217.
- Boutellis A., Bérenger JM., et Raoult D., 2017** – Les poux (Phthiraptera). Chapitre 20 : 421p. *In press*.
- Boutellis A., Bitam I., Fekir K., Mana N., et Raoult D., 2015** – Evidence that clade A and clade B head lice live in sympatry and recombine in Algeria. *Medical and Veterinary Entomology. Vol.*, 29(1): 94-98.
- Boutellis A., Mediannikov O., Bilcha K-D., Ali J., Campelo D., Barker S-C., et Raoult D., 2013** – *Borrelia recurrentis* in head lice Ethiopia. *Emerg Infect Dis. Vol.*, 19:796-798.
- Boutellis A., Veracx A., Abrahao J. et Raoult D., 2012** - Amazonian head licespecific genotypes are putatively pre-Colombian. *Am J Trop Med Huy*. 88: 1180-1184.
- Bouvresse S., Socholovshi C., Bredjane Z., Durand R., Iziri A., Raoult D., Chosidow O., et Brooqui P., 2011** – No evidence of *Bartonella quintana* but detection of *Acinetobacter baumannii* in head lice from elementary school children in Paris. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases. Vol.* 34:475-477.

- Cavier R, 1970** – parasitologie. Société d'Édition d'Enseignement Supérieur: Paris, 1970. 194-202.
- Chosidow O., Chastang C., Brue C., Bouvet E., Izri M., Monteny N., Bastuji-Garin S., Rousset JJ., Revuz J., 1994** - Controlled study of malathion and d-phenothrin lotions for *Pediculus humanus* var capitis-infested schoolchildren. *Lancet* 344: 1724-1727.
- Christian Ripert, 2007** – épidémiologie des maladies parasitaires Tome 4 : affections provoquées ou transmises par les arthropodes, Lavoisier, Paris, 580p.
- Clark JM., Yoon KS., Lee SH., Pittendrigh BR., 2013**- Human lice: Past, present and future control. *Pestic Biochem Physiol* 106: 162-171
- Doroodgar A., Sadr F., Paksa A., Mahbobe S., Doroodrar M., Sayyah M., Tashakkor Z. et Doroodgar M., 2014**- The prevalence of pediculosis capitis and relevant factors in primary school student of Kashan Central Iran., *Asian Pac J Trop Dis.* 4(6): 500-504.
- Drali R., 2014** – Poux humains: différenciation, distribution phylogéographique, Host Switching et contrôle. Thèse Doc., pathologie. Ecole doctorale des sciences de la vie et de la santé, faculté de médecine, Marseille, p220.
- Drali R., Shako J.C., Davoust B., Diatta, G., et Raoult D., 2015.** A New Clade of African Body and Head Lice Infected by Bartonella quintana and Yersinia pestis-Democratic Republic of the Congo. *Am J Trop Med Hyg.*, 93(5):990-3
- Elyse P., 2002** - La PCR en temps réel: principes et applications. *Biology and Biotechnology*, 2002, 2-11.
- Eric A., 2000** – Pédiculoses humaines: historique et actualité officinales. Thèse doctorat d'État en pharmacie. Université Lorraine, France, p131.
- Ewing, H.E., 1926** - A revision of the American lice of the genus *Pediculus*, together with a consideration of the significance of their geographical and host distribution. *Proceedings US National Museum*, vol. 68, art. 19 : 1-30.
- Ferris, g. F., 1951.** The sucking lice. *Memoirs of the Pacific Coast Entomological society.*
- Franc M., 1994** – Poux et méthodes de lutte. *Rev. Sci. Tech. Off Int. Epiz.* Vol. 13(4): 1039-1051
- Gavinet F., 2007** – Pédiculose du cuir chevelu : Traitement et conseil à l'officine. Thèse Doc. En pharmacie. Univers. Limoge France, Faculté de pharmacie, 116p.
- Golvan Y., 1983**- éléments de parasitologie médicale. 4e éd. Paris : Flammarion, impr. 1983, cop. 1983, 1 vol. (571 p.)
- Gouveia, C., M. D. Asensi, V. Zahner, E. F. Rangel, and S. M. Oliveira. 2008**- Study on the bacterial midgut microbiota associated to different Brazilian populations of *Lutzomyia longipalpis* (Lutz & Neiva) (Diptera: Psychodidae). *Neotrop. Entomol* 37.597-601.

- Guezi, L., 2015** - Détection moléculaire des *Acinetobacter* sp dans les poux de tête (*Pediculus humanus capitis* De Geer, 1778) chez les écoliers d'Alger-Est. Mémoire de Master Université des Sciences et de la Technologie Houari Boumediene, p 52.
- Houchi K. et Kara S., 2016** - Détection moléculaire des *Acinetobacter* sp. dans les poux de tête (*Pediculus humanus capitis* De Geer, 1778) dans la région de Tizi-ouzou. Mémoire de Master en Entomologie appliquée à la médecine, à l'agriculture et à la foresterie. Université Mouloud Mammeri de Tizi-ouzou. P 22-27.
- Houhamdi L., Lepidi H., Drancourt M., Raoult D. 2006** - Experimental model to evaluate the human body louse as a vector of plague. *J. Infect. Dis.*, 194: 1589-1596.
- Houhamdi L., Parola P., Raoult D., 2005** – les poux et les maladies transmises à l'homme. *Medecine tropicale*. Vol., 65(1) : 13-23.
- Howard A., O'Donoghue M., Feeney A. et Sleator R.D., 2012.** *Acinetobacter baumannii* an emerging opportunistic pathogen. *Virulence; Volume 3, issue 3*.
- Izri A., 2014** – Les ectoparasites. CALIN, 3eme journée régionale : Hygiène et Prévention du risque infectieux en Etablissements Médico-sociaux. Parasitologie-Mycologie CHU Avienne, Université Paris 13, 93009 Bobigny, France.
- Izri A., Guiguen C., 2013** – la pédiculose et le rôle du laboratoire. *Rev. Francophone des Laboratoires*. Vol., 454 :33-39.
- Johnson K. P., K. Yoshizawa, et V. S. Smith, 2004** - Multiple origins of parasitism in lice. *Proc. Biol. Sci.* 271, 1771–1776.
- Kempf M., Abdissa A., Diatta G., Trape J-F., Angelakis E., Medianicov O., La Scola B., et Raoult D., 2012** – Detection of *Acinetobacter baumannii* in human and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *International Journal of Infectious Diseases*. Vol., 41:332-339.
- Kim J.H., Min J.S., Kang J.S., Kwon D.H., Yoon K.S., Strycharz J., Koh Y.H., Pittendrigh B.R., Clark J.M., Lee S.H., 2011**-Comparison of the humoral and cellular immune responses between body and head lice following bacterial challenge. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 41, 332–339.
- Kubista M., Andrede JM., Bengtsson M., Forootan A., Jonak J., Lind K., Sjoback R., Sjogreen B., Strambom L., Stahlberg A., et Zonic N., 2006** – the real time polymerase chain reaction. *Mol. Aspect. Med.* Apr-Jun; 27 (2-3): 95-125.
- Kumsa B., Socolovschi C., Parola P. et Raoult, D., 2012** - Molecular Detection of *Acinetobacter baumannii* in the Lice and Keds of Domestic Animals in Oromia Regional State, Ethiopia. *PLoS.ONE*. Submitted. 2012. Ref Type: Journal (Full).

- Li, W., Ortiz, G., Fournier, P.E., Gimenez, G., Reed, D.L., Pittendrigh, B., Raoult, D., 2010** - Genotyping of human lice suggests multiple emergencies of body lice from local head louse populations. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 4, e641.
- Marjoli, L., G W., Holmes, J C., Kuris, AM. et Shad, GA. 1982** - The use ecological termes in parasitology (Report of an ad hoc committee of the American Society of Parasitologists). *Journal of Parasitology.* 68: 131-133.
- Mumcuoglu KY., 1996** - Control of human lice (Anoplura: Pediculidae) infestations: past and present. *American Entomologist*, 42(3), 175-178
- Nachappa P., Levy J., Pierson E. et Tamborindegy C. 2011** - Diversity of endosymbionts in the potato psyllid, *Bactericera cockerelli* (Triozidae), vector of zebra chip disease of potato. *Curr.Microbiol.* 62:1510-20.
- Nicolas C., 2013** – la prise en charge des poux, toujours d’actualité à l’officine. *Actualités pharmaceutiques*, vol 529- oct. 2013.
- Nimes M., 2007** – la reaction de polymerization en chaine (PCR) : principe et applications, Ecole de l’ADN, Nîmes cedex, France. Vol. 30015 :21-23.
- Ouis I, 2016** - Détection moléculaire des *Acinetobacter* sp. dans les poux de tête (*Pediculus humanus capitis*) chez les écoliers de Tlemcen-ouest. Mémoire de Master en microbiologie appliqué. Université de Tlemcen. P 50.
- Pajot X., 2000** – les poux (Insecta, Anoploura) de la région Afrotropicale. Ed., IRD, Paris, 294p.
- Pariser DM., Meinking TL., et Ryan WG. (2013)** - Topical ivermectin lotion for head lice. *N Engl J Med* 368(10):967.
- Poitras E. et Houde A., 2002** - La PCR en temps réel : principe et applications. *Rev. in Biology and Biotechnology.* Vol., 2(2) :2-11.
- Raoult D ., Reed DL ., Dittmar K., Kirchman JJ., Rolain JM., Guillen S. et Light JE.,2008** - Molecular identification of lice from pre-Columbian mummies . *Journal of Investigative Dermatology.*197 : 535-543.
- Raoult D., Dutour O., Houhamdi L., Jankauskas R., Fournier P.E., Ardagna Y.,Drancourt M., Signoli M., La V.D., Macia Y., et Aboudharam G., 2006** - Evidence for louse-transmitted diseases in soldiers of Napoleon’s Grand Army in Vilnius. *J.I. Infect. Dis.* 193, 112–120.
- Reed D. L., V. S. Smith S. L. Hammond A. R. Rogers et D. H. Clayton, 2004** - Genetic analysis of lice supports direct contact between modern and archaic humans: *PLoS.Biol.*, v. 2, no. 11, p. e340.
- Sangaré A. K., 2015** - modèles expérimentaux de traitement *in vitro* et épidémiologie moléculaire chez les poux humains, thèse doc. URMITE. Université d’Aix-Marseille, 45p.

- Sangaré AK., Boutellis A., Drali R., Audoly G., Weber G., Rolain JM. et Raoult D., 2015-** Doxycycline kills human lice through its activity on their bacterial symbiont. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 45 (6): 675-676.
- Sangaré AK., Boutellis A., Drali R., Socolovschi C., Barker SC., Diatta G., Rogier C., Olive MM., Doumbo OK. Et Raoult D., 2014-** Detection of *Bartonella quintana* in African Body and Head Lice. *Am J Trop Med Hyg*. 91(2):294-301.
- Sasaki T., Poudel SKS., Isawa H., Hayashi T., Seki S., Tomita T., Sawabe K., et Kobayashi M., 2006 -** First Molecular Evidence of *Bartonella quintana* in *Pediculus humanus capitis* (Phthiraptera: Pediculidae), Collected from Nepalese Children. *J Med Entomol* 43: 110-112.
- Soto J-C., Dube S., Fortier N., Hartner R., Marceau N., et Trudelle A., 2012 –** lignes directrices pour le contrôle de la pédiculose du cuir chevelu dans les écoles et les services de garde éducatifs à l'enfance. Guide d'intervention, Québec. (4) 1-76.
- Sunantaraporn S., Sanprasert V., Pengsakul T., Phumee A., Boonserm R., Tawatsin A., Thavara U. et Siriyasatien P., 2015-** Molecular survey of the head louse *Pediculus humanus capitis* in Thailand and its potential role for transmitting *Acinetobacter spp.* *Parasit Vectors*. 8:127p.
- Swenson J., Arduino M-J, Carr J, 2004 -** Centers for Disease Control and Prevention. Public health image library.
- Taleb C., 2013-** Etude de la résistance aux antibiotiques d'*Acinetobacter baumannii* au niveau des services de traumatologie et de médecine interne du CHU de Tlemcen. Mémoire de Master en Biologie: Contrôle du Développement Microbien. Université AbouBekrBelkaid Tlemcen, 43p.
- Tran N. Y., 2008 -** mise au point d'une technique de quantification des populations bactériennes et archaea de l'écosystème caecal du lapin par pcr en temps réel. Thèse master ENSAT. Ecole nationale Veterinaire, Toulouse, France (28 P.)
- Vassias I., 2012 –** principe de l'emplification en chaîne polymérase. *EMC-Biologie Médical*. Vol. 7(1) :5-1.
- Veracx A. et Raoult D., 2012 –** Biology and Genetics of human head lice in. *Trends Parasitology*. Vol., 28(12): 563-571.
- Williams LK, Reichert MA, MacKenzie WR, Hightower AW, Blake PA., 2001.** Lice, nits and school policy. *Pediatrics*.107:1011–5.
- Yoon KS., Strycharz JP., Baek JH., Sun W., Kim JH., Kang JS., Pittendrigh BR., Lee SH., Clark JM., 2011 -** Brief exposures of human body lice to sublethal amounts of ivermectin overtranscribes detoxification genes involved in tolerance. *Insect Mol Biol* 20(6):687-99.

Résumé :

Les poux de tête, *Pediculus humanus capitis* est un parasite exclusif de la chevelure, hématoophage strict de l'homme, ces parasites touchent principalement des centaines de millions d'enfants dans le monde.

Un total de 81 poux de tête a été collecté à partir de 6 écoles appartenant à quatre régions de Béjaïa (Iheddaden Oufella, Ighil Auazoug, Tizi et Sidi Ahmed).

Nos résultats montrent une prévalence d'infestation dans la plus part des écoles visitées avec un taux plus élevé chez les filles (1,81%) que chez les garçons (0,22%).

L'ADN d'*Acinetobacter* sp a été détecté dans 20% des poux analysés par la technique chaîne polymérase quantitative « RT-PCR ».

Des études plus claires seront essentielles afin de démontrer la transmission transovarienne de cette bactérie chez les poux de tête ainsi que le risque de transmission des agents pathogènes à l'homme.

Mots clés : poux de tête ; *Pediculus humanus* ; PCR en temps réel ; ADN ; *Acinetobacter* sp.

Abstract:

Head lice, *Pediculus humanus capitis* is an exclusive parasite of the hairs, strict haematophagous of man, these parasites mainly affect hundreds of millions of children in the world. A total of 81 head lice were collected from 6 schools belonging to four regions of Béjaïa (Iheddaden Oufella, Ighil Auazoug, Tizi and Sidi Ahmed).

Our results show a prevalence of infestation in most schools visited with a higher rate among girls (1.81%) followed by boys (0.22%).

Acinetobacter sp DNA was detected in 25% of the lice analyzed by the quantitative polymerase chain "RT-PCR" technique.

Clearer studies will be essential to demonstrate the transovarial transmission of this bacterium in head lice as well as the risk of transmission of pathogens to humans.

Keywords: head lice; *Pediculus humanus*; Real-time PCR; DNA; *Acinetobacter* sp.