

# GENETIQUE DES POPULATIONS DU POU ROUGE DES POULES : VOIES DE CIRCULATION ET PERSISTANCE EN ELEVAGE DE PONDEUSES

Roy Lise<sup>1</sup>, Lubac Sophie<sup>2</sup>, Chauve Claude Marie<sup>3</sup> et Buronfosse Thierry<sup>3</sup>,

<sup>1</sup>ANSES - Unité RPP - 31 avenue Tony Garnier - 69364 LYON Cedex 07,

<sup>2</sup>ITAVI - 23 rue Baldassini - 69364 LYON Cedex 07

<sup>3</sup> VETAGRO SUP - 1 avenue Bourgelat - 69280 MARCY L'ETOILE

lise.roy@anses.fr

## RESUME

Le pou rouge des poules *Dermanyssus gallinae* est un acarien hématophage qui provoque des dégâts plus ou moins importants en élevage de poules. La biologie particulière de l'acarien, qui ne vit pas sur l'hôte, mais dans l'environnement, rend son contrôle délicat. Les voies de dissémination de ses populations demeurent inexplorées : Les oiseaux sauvages sont-ils en cause ? Quel est le rôle des flux commerciaux impliquant le transport d'animaux dans la circulation des populations de poux rouges ? Les infestations touchant deux bandes successives dans un bâtiment donné résultent-elles de deux introductions différentes ou proviennent-elles de la capacité du pou rouge à survivre au vide sanitaire ? Afin de répondre en partie à ces questions, des fragments d'ADN situés sur deux gènes indépendants (Tropomyosine et Cytochrome oxydase 1) ont été séquencés chez différents isolats. La structure des populations de poux rouges est explorée à travers l'estimation de la diversité nucléotidique, les statistiques F et une méthode bayésienne d'assignation et confrontée aux informations écologiques et économiques disponibles. Les principaux résultats obtenus montrent que le rôle des oiseaux sauvages dans la circulation du parasite est nul ou presque. Dans les élevages, des populations faiblement voire non différenciées distantes de plusieurs centaines de kilomètres et collectées sur les voies d'échanges connues soulignent le rôle majeur des flux commerciaux. Enfin, une analyse menée dans un élevage au sol montre que le pou rouge peut résister aux opérations de décontamination réalisées entre deux bandes.

## ABSTRACT

### Population genetics of the Poultry Red Mite: dispersal and persistence in layer farms

The Poultry Red Mite *Dermanyssus gallinae* is a hematophagous mite inducing more or less serious damages in layer farms. Uncommon nidicolous habits of this parasite make it very difficult to be controlled, since it does not stay on host. Its dispersal modes also keep unresolved: Are wild birds responsible for it? What is the role of animal trade? Do infestations of two successive flocks in a single building result from two different introduction events or are they due to the ability of mite populations to endure empty periods and cleaning actions? In order to partly answer these questions, some DNA fragments located on two independent genes (Tropomyosin and Cytochrome oxidase 1) have been sequenced in a variety of isolates. Estimation of nucleotide diversity, F-statistics and a bayesian assignment method have been used to explore the population structure of the Poultry Red Mite, then compared to available ecological and economical information. Main results show that wild birds are not involved in the spread of mites today and the lack of differentiation between populations sampled several hundreds if not thousands kilometres apart seem to stem from trade flows. Lastly, an analysis involving several different isolates from a single farm confirms that mite populations at least in some case may resist to the between-flock cleaning up.

## INTRODUCTION

Le pou rouge des poules *Dermanyssus gallinae* (De Geer, 1778) est un acarien hématophage cosmopolite qui provoque des dégâts plus ou moins importants en poudeuses : déclassement des œufs tachés par les acariens écrasés sur la coquille, transmission d'agents pathogènes, stress, baisse du rendement, voire, lors d'infestations massives, chute de la ponte, perte de poids et augmentation de la mortalité, et, à plus long terme, anémie. Sa prévalence en poudeuses en Europe se situe autour de 80% (Sparagano et al, 2009) et il est en outre en cours d'invasion dans les élevages de poudeuses au Brésil (Tucci *et al.* 2008).

La biologie particulière de l'acarien rend son contrôle délicat. Micro-prédateur, il ne grimpe sur son hôte que le temps d'un repas rapide, et passe le reste de son temps dans l'environnement, dans des interstices étroits, très nombreux en élevages où il accomplit toutes les étapes de son développement (mue, ponte).. Les difficultés rencontrées sont aggravées par les limitations réglementaires concernant l'utilisation des acaricides. En effet, les Limites Maximales de Résidu fixées pour les œufs de consommation par les règlements (CE) n°470/2009, et antérieurement (CEE) n° 2377/90, sont peu compatibles avec la durée de la bande d'élevage de poules (une année) et le cycle rapide de l'acarien (1 semaine à 10 jours dans les conditions d'élevage) en cas d'infestation.

L'intensité et la ténacité de l'infestation dans certains élevages restent souvent inexplicables, et certains cas d'infestation récurrente dans un seul de deux bâtiments accolés laissent perplexes. Afin de trouver des explications à ces énigmes, l'une des pistes réside dans l'exploration des voies de dissémination des poux. Trois questions sont abordées dans cet article : Les oiseaux sauvages sont-ils en cause ? Quel est le rôle des flux commerciaux dans la circulation des populations de poux rouges ? Les populations de *D. gallinae* peuvent-elles survivre au nettoyage et à la désinfection réalisés au cours du vide sanitaire entre deux bandes ?

## 1. MATERIELS ET METHODES

### 1.1. Marqueurs moléculaires

Afin de répondre en partie à ces questions, des fragments d'ADN situés sur deux gènes indépendants - Cytochrome Oxydase I (COI, gène mitochondrial) et Tropomyosine (Tpm, gène nucléaire) - ont été amplifiés par PCR puis séquencés suivant Roy et al. (2010b) chez 11 à 24 individus par isolat, dans 17 isolats prélevés dans des élevages situés dans diverses régions de France, dans d'autres pays d'Europe, au Brésil et en Australie. L'élevage CONF a en outre fait l'objet de différents prélèvements (deux bâtiments, deux bandes successives) (cf. Tableau 1). Les séquences

obtenues ont été analysées avec certains outils de la génétique des populations : diversité nucléotidique (DnaSP 5.0), coefficients de différenciation  $F_{ST}$  entre couples d'isolats (Arlequin 3.1), évaluation du nombre de populations  $K$  (clusters) par une méthode bayésienne d'assignation (Structure 2.3.3). Les valeurs de  $K$  ont été estimées d'une part au vu de l'évolution de la vraisemblance, d'autre part suivant l'approche hiérarchique développée par Coulon *et al.* (2008), sur la base du calcul de  $\Delta K_{max}$ .

### 1.2. Matériel biologique

La stratégie d'échantillonnage a été élaborée de manière à obtenir une représentation de la structure génétique des populations de *D. gallinae* en fonction du milieu (2 isolats de l'avifaune sauvage, 15 isolats d'élevages de poudeuses) et de la localisation géographique. Les isolats sauvages proviennent de rolliers d'Europe (France) et d'étourneaux (Pays Bas). En complément, en France, huit nichoirs à mésanges ont été installés sur deux parcours de poudeuses plein air (nichoirs fixés à des arbustes situés à 2-5 m d'un bâtiment en février 2009, nids prélevés en juillet 2009). En effet, les mésanges fréquentent communément les parcours de volailles et sont connues pour être parasitées principalement par *D. carpathicus* et *D. longipes* (absents des élevages), mais aussi par *D. gallinae* (Roy *et al.* 2010a, b).

Les isolats d'élevage ont été collectés dans des lieux géographiques différents à l'échelle internationale (France, Pologne, Danemark, Brésil, Australie), nationale (France : 4 isolats de Bretagne, 5 isolats de Rhône-Alpes ; Brésil : 1 isolat de l'état Sao-Paulo, 1 de Rio Grande do Sul), locale, au sein d'un élevage (élevage CONF, 2 points fixes dans 2 bâtiments différents, 2 bandes successives).

## 2. RESULTATS ET DISCUSSION

D'une manière générale, les coefficients de différenciation  $F_{ST}$  sont beaucoup plus bas sur la base Tpm que COI (moyenne 0.31 vs 0.69 – tableau 1), ce qui est attendu du fait de la vitesse de fixation des allèles rares théoriquement 3 fois inférieure dans le génome nucléaire que mitochondrial (taille efficace plus réduite dans ce dernier, Palumbi *et al.* 2001). La structure des populations dessinée par les séquences mitochondriales COI correspond en quelque sorte à une image plus récente que celle fournie par les séquences nucléaires Tpm. En particulier, dans les deux références sauvages IL et ROL, les haplotypes COI rencontrés au sein d'un isolat donné sont fortement apparentés entre eux (Figure 1), alors que les allèles Tpm sont éparpillés à travers le réseau. Dans les conditions naturelles, une population se développant dans une colonie d'oiseaux donnée est ainsi suffisamment isolée pour avoir atteint un degré de différenciation marqué sur la base COI par rapport à l'ensemble des autres populations, alors que la

différenciation n'a pas encore eu le temps de se manifester de manière aussi marquée sur le fragment de Tpm.

A l'échelle européenne, les valeurs de  $F_{ST}$  Tpm entre isolats sauvages (France, Pays-Bas) et isolats d'élevages sont nettement plus élevées qu'entre isolats d'élevages européens (Pologne, France, Danemark) et les  $F_{ST}$  COI sont parmi les plus fortes (Tableau 1). Les populations sauvages apparaissent en outre moins différenciées sur la base nucléaire entre elles que vis-à-vis des populations d'élevage ( $F_{ST}$  Tpm ROL-IL 0,188,  $P < 0.0001$ ). Cela suggère que les populations d'élevage évoluent confinées dans ces conditions, sans contamination depuis la faune sauvage depuis longtemps. D'ailleurs, aucun haplotype COI et très peu d'haplotypes Tpm sont partagés entre élevages et faune sauvage (Fig. 1). Les flux de gènes entre populations sauvages et populations d'élevage semblent ainsi très réduits aujourd'hui.

A l'échelle intercontinentale, les flux de gènes entre populations d'élevage semblent réduits dans la plupart des cas. Toutefois, la différenciation paraît un peu plus faible entre l'Ain et le Brésil, et entre l'Ain et l'Australie (COI, Tableau 1) qu'entre les autres élevages européens et ces deux pays. En outre, un haplotype COI est commun entre élevages de l'Ain et l'isolat australien AUS. Etant donné que l'intégration de la filière avicole développée au cours du 20<sup>ème</sup> siècle a mené à l'utilisation mondiale de souches de poules élevées en Europe, les flux de gènes entre Europe et autres continents suggèrent la capacité de l'acarien à transiter par les transports humains, et ce malgré des mesures d'hygiène drastiques. La très faible diversité des haplotypes Tpm rencontrés dans les isolats brésiliens et australiens (Tableau 2) pourrait d'ailleurs témoigner de goulots d'étranglement génétiques consécutifs à l'importation d'un nombre d'individus très diminué par les nettoyages, désinfections et quarantaines.

A l'échelle nationale, des flux de gènes importants que l'on ne retrouve pas entre pays sont fortement suggérés par les analyses mitochondriales. En effet, les séquences de COI montrent que les isolats prélevés dans les deux élevages brésiliens BREa et BREb, pourtant distants de 1157 km l'un de l'autre, appartiennent aux mêmes populations. Une absence de différenciation est aussi notée entre certains isolats de Bretagne et de Rhône-Alpes. Des flux de gènes importants sont donc plus fréquents au sein de l'entité administrative « pays » qu'au-delà de ses frontières, ce qui oriente plutôt vers des voies de dissémination humaines et non naturelles. Par ailleurs, l'ensemble des isolats français révèle une grande hétérogénéité dans la différenciation entre élevages, avec des valeurs de  $F_{ST}$  Tpm de 0 à 0,43 et COI de 0 à 0,98. Or cette hétérogénéité semble indépendante de la distance géographique, puisque, à l'inverse de l'absence de différenciation Bretagne / Rhône-Alpes ci-dessus, certains bâtiments d'élevages de Rhône-

Alpes séparés par une trentaine de kilomètres (Tableau 1, échelle nationale), voire quelques dizaine de mètres (Tableau 1, échelle locale), hébergent des populations beaucoup plus différenciées entre elles sur la base COI. Sachant que le partage de nid est une condition nécessaire au transfert d'un hôte à l'autre dans le genre *Dermanyssus* (Roy 2009, Roy et al. 2009) et que *D. gallinae* n'est manifestement pas équipé pour survivre plus de quelques heures sur le corps de l'hôte (Arkle *et al.* 2010), ce microprédateur est supposé ici incapable d'accompagner des oiseaux en migration sur des longues distances. Une telle discordance entre différenciation génétique et distance géographique en France vient confirmer que la faune sauvage n'est pas en cause.

En outre, le fait que des populations prélevées dans des élevages de Bretagne et de Rhône-Alpes soient quasi-indifférenciées est accompagné d'une extrême diversité des haplotypes COI au sein d'un même élevage (Tableau 2). En effet, dès le premier niveau hiérarchique du clustering réalisé avec Structure ( $K$  déterminé par  $\Delta K_{max}$ ) sur la base des séquences mitochondriales COI, plusieurs isolats français montrent un mélange entre deux clusters bien délimités, sans partage entre individus. En effet, la plupart des individus présentant des haplotypes du groupe 2 (Figure 1) sont localisés en Bretagne et la plupart des individus contenant les haplotypes du groupe 1 ont été collectés dans les autres parties du monde. La séparation des deux clusters est totale dès le premier niveau d'analyse hiérarchique entre individus (probabilité d'assignation  $> 0.8$  pour tous), même lorsque l'on retranche les paires de sites nucléotidiques présentant un déséquilibre de liaison  $r_{LD} > 0.5$ . En revanche, au sein des isolats 8020 (Bretagne), 8019, 8021, 8028, 8029, 9007 et 9016 (Rhône-Alpes), des individus appartenant aux deux clusters sont en présence. Cette particularité que l'on ne retrouve dans aucun des isolats provenant d'autres pays est cohérente avec l'histoire récente des structures d'abattage en France. En effet, jusqu'à la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, les poules de réforme de Rhône-Alpes étaient acheminées vers plusieurs petits abattoirs régionaux, qui ont dû arrêter cette activité il y a une dizaine d'années. Par conséquent, les éleveurs envoient depuis leurs poules de réforme dans des abattoirs hors de leur région, principalement vers la Bretagne et l'Espagne. La structure des populations de pou rouge en France telle qu'elle est dessinée par nos résultats moléculaires semble bien témoigner d'échanges très récents entre ces deux régions. Les deux clusters de premier niveau – donc très éloignés génétiquement – (Figure 1) mélangés entre eux au sein d'un même isolat selon l'analyse COI traduisent une mise en contact récente de populations longtemps isolées. Cet isolement récemment rompu est très probablement le résultat du confinement régional par l'abattage local et sa rupture suggère fortement que les acariens peuvent transiter par le biais des cages et

véhicules utilisés pour le transfert des poules depuis le bâtiment jusqu'à l'abattoir.

A l'échelle de l'élevage CONFR (poules au sol), les isolats prélevés dans un même bâtiment au cours de deux bandes successives (bât. 1, 2008, 2009) montrent des coefficients de différenciation proches de 0, alors que les isolats de deux bâtiments séparés de 78 m (150 m à pieds) présentent des valeurs élevées (Tableau 1). La population du bâtiment 1 n'a donc pas été renouvelée après le vide sanitaire (60 jours, nettoyage et désinfection protocolaires) et semble bien avoir purement et simplement survécu à cette opération. Par ailleurs, alors que les isolats des bâtiments 1 et 5 se montrent fortement différenciés entre eux, les isolats prélevés en deux points différents distants de 20m environ dans chaque bâtiment présentent les caractéristiques d'une seule et même population. Les acariens semblent donc être aptes à se déplacer librement à l'intérieur d'un bâtiment, mais incapables de se déplacer entre bâtiments. Ainsi, parmi les vecteurs possibles, les poules pourraient participer au déplacement de l'acarien, alors que le personnel ne joue qu'un rôle très réduit voire nul. Cela est concordant avec la nécessité de partage de nid pour le passage d'un hôte à l'autre dans le genre *Dermanyssus* et avec le recensement rare d'individus sur oiseaux volants, systématiquement identifiés comme femelles adultes (Roy *et al.* 2009). Comme la plupart des micropredateurs, les poux rouges ne sont pas capables de vivre sur l'hôte. Toutefois, il est probable que les femelles adultes utilisent ponctuellement leur hôte pour essaimer, comme cela a été observé chez les punaises de lit (Reinhardt et Siva-Jothy 2007). En revanche, ces acariens ne paraissent pas profiter des allées et venues du personnel travaillant dans les élevages pour passer d'un bâtiment à l'autre.

Enfin, l'installation de nichoirs à mélanges à quelques mètres des bâtiments d'élevages n'a permis d'isoler que des populations de *D. carpathicus*, espèce absente des élevages. Dans l'un des 8 nichoirs, toutefois, un unique individu de *D. gallinae* a été isolé, parmi env. 100 individus appartenant à *D. carpathicus*, alors que les populations de *Dermanyssus* dans un nid donné sont presque systématiquement monospécifiques (Roy

*et al.* 2009). Chez cet individu, les séquences de COI et Tpm se sont avérées être les haplotypes les plus fréquemment rencontrés en élevage. Des individus appartenant à *D. gallinae* prélevés dans des nids de mélange en France au cours d'une autre étude ont permis d'isoler des séquences de Tpm et de COI aussi éloignées de celles des élevages que celles rencontrées ici dans les isolats IL et ROL (Roy *et al.* 2010b). La proximité extrême et non naturelle des nichoirs explique le passage de cet individu depuis le bâtiment jusqu'au nid, sans doute par le biais d'une poule (nichoir fixé sur un arbuste du parcours à env. 2-3 m du bâtiment).

## CONCLUSION

La dissémination du pou rouge des poules dans les élevages de poules n'est pas imputable à la faune sauvage. Les échanges commerciaux semblent en revanche jouer un rôle non négligeable dans la circulation de l'acarien. L'acarien peut se déplacer ponctuellement avec la poule, mais il a besoin de s'immiscer dans des interstices séparés du corps de l'hôte (moins chauds, moins humides) pour survivre et se développer. Le transfert peut être réalisé probablement par le biais des poules de réforme, et des cages des abattoirs, objets sur lesquels séjourne la poule, et qui fournissent les interstices nécessaires. La convergence entre informations génétiques et observations biologiques suggère que l'introduction d'acariens dans un élevage peut avoir lieu au moment de la réforme : des acariens cachés aux points de jonction des barreaux de cages d'abattoirs placés dans un camion à l'entrée d'un bâtiment au moment de la réforme quittent simplement le véhicule. La tolérance au vide sanitaire et aux nettoyages/désinfections associés leur permet de séjourner là entre le départ d'une bande et l'arrivée d'une autre. Si les poux rouges ne semblent pas capables de parcourir plusieurs dizaines de mètres entre deux bâtiments, leur vivacité et leur mobilité intrinsèques peuvent leur permettre probablement de parcourir les quelques mètres qui séparent le camion de l'entrée du bâtiment, sans compter que, dans de nombreux cas, les blocs de cages sont introduits directement à l'intérieur du bâtiment.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Arkle S., George D.R., Guy J.H. and Sparagano O.A.E., 2010. Res. Vet. Sci., (88), 279-280  
Coulon A., Fitzpatrick J.W., Bowman R., *et al.* 2008. Mol. Ecol., (17), 1685-1701  
Palumbi, S.R., Cipriano F., Hare M.P., 2001. Evolution (55), 859-868  
Reinhardt K., Siva-Jothy M.T., 2007. Ann. Rev. Entomol., (52), 351-74.  
Roy L., 2009. Agro Paris Tech, Paris [Thèse de doctorat] 307 p.  
Roy L., Dowling, A.P.G., Chauve, *et al.*, 2009. Exp. Appl. Acarol., (48), 115-142  
Roy L., Chauve C.M., Buronfosse T., 2010a. Acarologia, (50), 207-219  
Roy L., Dowling A.P.G., Chauve C.M., *et al.*, 2010b. Int. J. Mol. Sci., (11), 1704-1734  
Sparagano O., Pavličević A., Murano T., *et al.* 2009. Exp. Appl. Acarol., 48: 3-10  
Tucci E.C., Prado A.P., Araujo R.P., 2008. Vet. Parasitol., (155), 127-32

*Avec la participation du PEP Aviculture – Région Rhône Alpes*

**Tableau 1.** Coefficients de différenciation  $F_{ST}$  entre isolats pris deux à deux (Arlequin 3.1)

	Couples d'isolats	$F_{ST}$ Tpm	$F_{ST}$ COI	Distance géographique
Faune sauvage vs élevages	ROL / élevages européens	0,485 (+/- 0,072)	0,841 (+/- 0,116)	150-2079 km
	IL / élevages européens	0,305 (+/-0,085)	0,797 (+/-0,142)	622-1226 km
Faune sauvage	ROL / IL	0,188	0,901	1321 km
Elevages, échelle internationale, monde	Elevages brésiliens / élevages européens	0,438 (+/-0,194)	0,782 (+/-0,201)	>9000 km
	Elevage australien / élevages européens	0,649 (+/-0,146)	0,792 (+/-0,179)	>16000 km
Elevages, échelle internationale, Europe	Elevages européens entre eux	0,181 (+/-0,182)	0,859 (+/-0,141)	
Elevages, échelle nationale	Elevages brésiliens entre eux	0,118	0,001	1157 km
	Elevages français entre eux	0,110 (+/-0,120)	0,499 (+/-0,321)	31-990 km
	8020 (Maine et Loire) / 8019 (Ardèche)	0,321	0,000	690 km
	REN (Côtes d'Armor) / 8019 (Ardèche)	0,017	0,007	926 km
	9007 (Ain) / 8028 (Ain)	0,015	0,261	36 km
	9016 (Ain) / 8028 (Ain)	0,040	0,624	36 km
	9007 (Ain) / 8029 (Ain)	0,032	0,204	31 km
Elevages, échelle locale	9007 (bât. 5) / 9016 (bât. 1) (élevage CONFR, Ain, 2009)	-0,002	0,497	78 m (150 m à pieds)
	9007_2 (point n° 2) / 9007_6 (point n°6) (bât. 5, élevage CONFR, Ain, 2009)	-0,001	0,050	env, 20 m
	9016_2 (point n° 2) / 9016_6 (point n°6) (bât. 1, élevage CONFR, Ain, 2009)	-0,015	-0,060	env, 20 m
	8006 (bande 2008) / 9016 (bande 2009) (bât. 1, élevage CONFR, Ain)	-0,016	-0,030	0 m

**Tableau 2.** Diversité nucléotidique  $\pi$  des isolats analysés (DnaSP 5.0).

Milieu	Pays, dépt	$\pi$ Tpm	$\pi$ COI
IL sauvage	Pays-Bas	0,017	0,002
ROL sauvage	France, 13	0,017	0,001
8019 pondeuses	France, 07	0,002	0,005
8020 pondeuses	France, 49	0,011	0,008
8022 pondeuses	France, 49	0,011	0,000
REN pondeuses	France, 22	0,002	0,001
8028 pondeuses	France, 01	0,011	0,022
8029 pondeuses	France, 01	0,011	0,023

Milieu	Pays, dépt	$\pi$ Tpm	$\pi$ COI
9016 (2+6) pondeuses	France, 01	0,011	0,006
8021 (2+6) pondeuses	France, 01	0,010	0,007
9007 (2+6) pondeuses	France, 01	0,009	0,023
BOUY pondeuses	France, 26	0,011	0,003
PO2 pondeuses	Pologne	0,010	0,002
SK pondeuses	Danemark	0,009	0,001
AUS pondeuses	Australie	0,002	0,001
BREa pondeuses	Brésil	0,009	0,000
BREb pondeuses	Brésil	0,002	0,000

**Figure 1.** Réseaux MJN des haplotypes rencontrés dans les 17 isolats analysés (Network 4.510). La taille des disques est proportionnelle à la fréquence des haplotypes et la longueur des liens au nombre de positions mutées.

Les petits disques vides représentent les haplotypes hypothétiques intermédiaires ou non échantillonnés. Les zones grisées représentent les haplotypes rencontrés en élevage de pondeuses et les zones noires les haplotypes rencontrés dans la faune sauvage. Le trait plein (groupe 1) et le trait pointillé (groupe 2) regroupent respectivement les haplotypes de chacun des deux clusters COI de 1<sup>er</sup> niveau (Structure 2.3.3).

