



HAL
open science

Caractérisation des interfaces entre avifaune sauvage et élevages avicoles par l'étude des contacts et du partage d'agents infectieux entre compartiments

Chloé Le Gall-Ladeveze

► **To cite this version:**

Chloé Le Gall-Ladeveze. Caractérisation des interfaces entre avifaune sauvage et élevages avicoles par l'étude des contacts et du partage d'agents infectieux entre compartiments. Sciences agricoles. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2022. Français. NNT : 2022TOU30067 . tel-03728044

HAL Id: tel-03728044

<https://theses.hal.science/tel-03728044v1>

Submitted on 20 Jul 2022

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du
DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse 3 - Paul Sabatier

Présentée et soutenue par
Chloé LE GALL-LADEVÈZE

Le 18 mars 2022

Caractérisation des interfaces entre avifaune sauvage et élevages avicoles par l'étude des contacts et du partage d'agents infectieux entre compartiments

Ecole doctorale : **SEVAB - Sciences Ecologiques, Vétérinaires, Agronomiques et Bioingenieries**

Spécialité : **Infectiologie, Physiopathologie, Toxicologie, Génétique et Nutrition**

Unité de recherche :
IHAP - Laboratoire Interactions Hôtes-Agents Pathogènes

Thèse dirigée par
Jean-luc GUERIN et Stéphane BERTAGNOLI

Jury

Mme Julie RIVIÈRE, Rapporteur
Mme Catherine BELLOC, Rapporteur
Mme Céline RICHOMME, Examinatrice
M. Jean-luc GUÉRIN, Directeur de thèse
M. Stéphane BERTAGNOLI, Co-directeur de thèse
M. Christophe PASQUIER, Président



Remerciements

Un grand merci tout d'abord aux membres de mon jury de thèse, pour l'honneur qu'ils m'accordent à évaluer les travaux présentés : **Julie Rivière**, **Catherine Belloc**, **Céline Richomme**, **Jean-Luc Guérin**, **Stéphane Bertagnoli** et **Christophe Pasquier**.

Mes remerciements chaleureux ensuite à tous ceux qui ont contribué de très près ou de plus loin au travail de cette thèse, et sans qui rien n'aurait été possible :

À mes encadrants officiels et informel **Jean-Luc Guérin**, **Stéphane Bertagnoli** et **Guillaume Le Loc'h** d'abord, qui ont cru en moi pour prendre en main ce beau projet. Les mots sont pauvres mais je reste reconnaissante pour votre confiance, votre soutien et tout ce que j'ai appris grâce à cette expérience enrichissante à vos côtés.

Aux membres extérieurs de mon comité de suivi, **Marion Vittecoq** et **Julien Cappelle**, pour leur soutien bienveillant et leurs conseils avisés qui m'ont aidée à progresser dans ce projet. Un merci tout particulier à Julien pour l'organisation du projet et l'encadrement scientifique toujours judicieux.

À **Benjamin Vollot** pour son investissement passionné plus que nécessaire dans ce projet. Il fallait au moins ça pour capturer quelques bergeronnettes et autres piafs entre canicules et gelées. Que d'expérience acquise à tes côtés pour l'ornithologie et le baguage, et que de débats et récits d'aventures autour de ces « petites bières » ! Les projets continuent et c'est toujours un grand plaisir de te compter dans l'équipe.

À **l'équipe du labo de virologie d'IHAP** pour la bonne humeur et la bienveillance qui m'ont aidée à rester motivée. À vous tous qui m'avez permis de prendre en main progressivement les multiples techniques d'analyses, en labo ou en informatique. Un grand merci à **Laëtitia** pour son aide indispensable sur les milliers d'extractions et de PCR, t'es une machine ! Un grand merci à tout le monde pour les « Friday beer » et tous les autres moments de partage conviviaux qui soudent et motivent une belle équipe. Un merci particulier aussi à mes co-bureaux pour le soutien, pour supporter mon invasion d'affaires de vélo et d'antennes radio, et pour les discussions plus ou moins intellectuelles entre deux manips : **Julien**, **Marie**, **Guillaume**, **Adam**, **Fabien**.

À tous les étudiants et volontaires de passage qui ont ajouté leur pierre à l'édifice de cette thèse, pour les captures (trop de noms à citer, merci à tous), les suivis télémétriques (merci **Margaux**, merci **Julie**), les observations ornithologiques (un grand merci **Pierre** !), au laboratoire pour les analyses biologiques (merci **François**, merci **Gauthier**) ou au bureau pour les analyses informatiques (merci **Gauthier**).

À **toute la famille Pérès** pour l'accueil toujours chaleureux, la bienveillance, l'assistance dans nos galères et la tolérance avec nos antennes radio et autres installations un peu étranges. La qualité de vos produits reflète vos belles valeurs.

À **ma famille**, qui a cru en moi et m'a soutenue dans chaque épreuve jusque-là. Vous m'avez forgée avec amour et bienveillance, m'avez initiée à apprécier les merveilles de la nature et les complexités de l'agriculture, et m'avez donné le goût et la curiosité de la science. **Mon Papé**, mon encyclopédie de la nature, à quelques mois près tu aurais découvert ce travail avec plaisir j'en suis sûre, et comme souvent on aurait certainement trouvé à discuter de plein de choses passionnantes à ce sujet. On pense fort à toi.

À mon **Baptiste**, pour me supporter au quotidien (dans tous les sens du terme), et pour avoir été mon radeau de survie dans les derniers mois de thèse. Merci pour ces tartes aux poireaux réconfortantes du dimanche soir, et pour les suivantes qui seront nombreuses je l'espère !

Merci enfin à mes amis de loin ou de près et à tous ceux qui m'ont encouragée et changé les idées durant ces trois années, même sans trop comprendre ce que je faisais vraiment. Merci pour votre oxygène bénéfique.

Et je termine par un court "pas merci" à ce petit coronavirus zoonotique qui a malheureusement mis en application tous nos cours théoriques d'épidémiologie des émergences pandémiques. Il a mis un beau bazar au milieu de ma thèse dans le programme initialement prévu.



Résumé

Les épizooties d'influenza aviaire hautement pathogène survenues dans le Sud-Ouest de la France durant les hivers 2015-2016, 2016-2017 puis 2020-2021 ont eu un impact sanitaire et économique durable sur la filière avicole régionale. Les deux derniers épisodes ont aussi eu un impact à l'échelle européenne sur le compartiment sauvage et en particulier l'avifaune aquatique migratrice par laquelle les virus auraient été introduits et diffusés sur le continent. En revanche, l'avifaune terrestre commensale des élevages a semblé épargnée cliniquement et les quelques études ciblant ces populations pour comprendre leur rôle potentiel d'hôtes relais ou de maintenance n'ont pas permis de détecter de virus. Malgré cette absence de preuves, des mesures préventives de restriction des contacts avec les volailles ont été prescrites. Ces mesures sont souvent perçues par les éleveurs comme contraignantes et contraires aux pratiques agricoles durables d'élevage en plein air. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été de mieux comprendre les rôles épidémiologiques de l'avifaune commensale des élevages vis-à-vis d'agents infectieux viraux et bactériens, en s'intéressant plus particulièrement aux interactions et à la transmission de marqueurs infectieux entre compartiments sauvage et domestique. Pour ce faire, ce travail a utilisé comme modèle un élevage de canards en plein air caractéristique de ceux du Sud-Ouest de la France, afin d'étudier finement l'interface sauvage-domestique. Dans un premier temps, une étude longitudinale sur plusieurs années a permis de caractériser au fil des saisons biologiques la population d'avifaune visiteuse et commensale de l'élevage. Cette étude écologique a révélé une grande richesse en avifaune sur l'élevage, avec la présence essentiellement des passereaux dont plusieurs espèces en déclin dans les milieux ruraux, et de rares mais parfois grands groupes d'avifaune aquatique. Plus spécifiquement ensuite, l'abondance et les interactions de l'avifaune vis-à-vis des canards domestiques ont été analysées, mettant en évidence des espèces beaucoup plus intensément connectées à ceux-ci. De fréquents contacts directs et indirects avec les canards ont été objectivés pour quelques espèces, dominées par les moineaux (*Passer domesticus*, *P. montanus*) et bergeronnettes grises (*Motacilla alba*). Dans un second temps, afin d'évaluer l'efficacité de ces contacts pour les transmissions infectieuses, les prélèvements biologiques nombreux et variés collectés à intervalles répétés sur les différents compartiments de l'élevage (avifaune cible, canards, environnement) ont été analysés. Nous avons ciblé en priorité les virus influenza, ainsi que des virus et bactéries marqueurs des différentes voies de transmission. Leurs prévalences et identifications ont été comparées entre compartiments pour rechercher des similitudes suggérant des échanges infectieux. Les résultats ont montré que les abondances des espèces sauvages et leurs contacts avec l'élevage ne semblaient pas corrélés au profil infectieux, en regard des fortes charges virales ou bactériennes détectées chez les canards ou dans leur environnement partagé. Dans un dernier temps, afin de consolider les hypothèses suggérées par les résultats précédents, des travaux complémentaires ont été mis en œuvre, visant d'une part à détecter finement l'ADN d'hôtes aviaires dans l'environnement de l'élevage, et d'autre part à caractériser les déplacements inter-sites des bergeronnettes grises par suivi télémétrique. Ce travail montre que l'avifaune commensale semble jouer un rôle épidémiologique minime pour les agents étudiés, hors contexte épidémique, à l'interface avec les canards élevés en plein air. Certaines mesures de restriction des contacts pourraient alors être réévaluées afin d'en réduire les contraintes et l'impact écologique potentiel, tandis que la contamination environnementale par les élevages devrait être aussi considérée dans les transmissions infectieuses à l'interface.

Mots-clés

Avifaune ; Volaille ; Interface ; Contacts ; Agents infectieux ; Influenza.

Abstract

Characterization of interfaces between wild birds and poultry through the study of contacts and sharing of infectious agents between compartments

The recent epizooties of highly pathogenic avian influenza that occurred in southwest France during winters 2015-2016, 2016-2017 and 2020-2021 lead to a long-lasting sanitary and economic impact on the region's poultry sector. The two last events also affected wild birds on a European scale, in particular migratory water birds by which the viruses may have been introduced and spread over the continent. However, commensal land birds on poultry farms seemed to be clinically unaffected, and few studies targeting these populations that were carried out to understand their possible role as bridge or maintenance hosts did not allow viral detection. Despite this lack of evidence, preventive contact-restriction measures with poultry were urged. These measures are often perceived as constraining and inconsistent with sustainable free-range farming practices. In this context, the aim of this thesis was to better understand the epidemiological roles of commensal avifauna on farms regarding viral and bacterial infectious agents, by focusing in particular on interactions and transmission markers between compartments of the wild-domestic interface. To do so, we used the model of a free-range duck farm that is typical of those of southwest France, which allowed to study in detail the wild-domestic interface. In a first step, a longitudinal study over several years allowed the characterization of visiting and commensal wild bird population through biological seasons. This ecological study revealed a great richness in wild birds on the farm, with essentially the presence of passerines including several declining species of agricultural areas, and few but sometimes large groups of water birds. More precisely then, abundance and interactions of avifauna towards domestic ducks were analyzed, and revealed a more intense connection of some species with them. Frequent direct and indirect contacts with ducks were evidenced for a few species, dominated by sparrows (*Passer domesticus*, *P. montanus*) and white wagtails (*Motacilla alba*). In a second step, so as to assess the effectiveness of these contacts for infectious transmissions, numerous and various biological samples repeatedly collected on the different compartments of the farm (targeted wild birds, ducks, environment) were analyzed. We targeted in priority influenza viruses, and several viruses and bacteria used as markers of various transmission pathways. Their prevalence levels and identifications were then compared between compartments to look for similarities that would suggest infectious exchanges. Results showed that abundances of wild birds and their contacts with the farm did not seem related to infectious patterns, in comparison with high viral or bacterial loads detected in ducks and their shared environment. In a last step, so as to strengthen the hypothesis suggested by previous results, prospects of complementary works were developed with the aim of finely detecting avian hosts DNA in the environment of the farm, and of studying between-site movements of white wagtails by telemetry-tracking. This work shows that commensal wild birds seem to play a minor epidemiological role for the studied infectious agents, out of any epidemic context, at the interface with free-range ducks. Some contact-restriction measures could then be revised so as to reduce their constraints and their potential ecological impact, while environmental contamination by farms should also be considered in infectious transmissions at the interface.

Key words

Avifauna; Poultry; Interface; Contacts; Infectious agents; Influenza.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	ii
Table des matières	iii
Liste des figures	vii
Liste des tableaux	xix
Table des abréviations	x
Introduction	1
Première partie : Étude bibliographique.....	9
A. Étude des agents infectieux aviaires d'intérêt et épidémiologie à l'interface entre avifaune sauvage et élevages	10
I. Agents infectieux aviaires d'intérêt économique circulant à l'interface entre avifaune et élevages	10
a. Influenza aviaire	10
i. Étiologie, phylogénie et pathogénie des VIA.....	11
Étiologie et phylogénie.....	11
Pathogénicité.....	13
ii. Écologie des VIA et épidémiologie dans les compartiments sauvages et domestiques	15
Réceptivité des hôtes réservoirs.....	15
Mécanismes et voies de transmissions virales.....	16
Épidémiologie des VIA dans la population réservoir	17
Épidémiologie des VIA en élevages.....	20
Transmissions des VIA entre élevages	22
Épidémiologie des VIA dans l'avifaune terrestre	22
Épidémiologie globale et risque d'infection zoonotique des VIA.....	24
iii. Détection directe et indirecte des VIA	26
Suspicion clinique	26
Détection et identification du phénotype viral	26
Détection et identification moléculaire.....	27
Prélèvements pour la détection directe de VIA	29
Détection indirecte des infections à VIA.....	30
iv. Contrôle et prévention des VIA en Europe et en France	31
Mesures de contrôle des VIA	31
Mesures de prévention des VIA.....	33
Surveillance événementielle des VIA.....	35
Surveillance programmée des VIA.....	36
Coordination globale de la surveillance des VIA	37
b. Agents infectieux marqueurs des voies de transmissions directes et indirectes	39
i. Virus de la maladie de Newcastle et orthoavulavirus aviaires.....	41

Étiologie, phylogénie et pathogénie.....	41
Écologie et épidémiologie des avulavirus dans les compartiments sauvages et domestiques	43
Détection directe et indirecte des avulavirus	46
ii. Chlamydia aviaires.....	47
Écologie, épidémiologie, phylogénie et pathogénie	47
Détection des chlamydias	49
iii. Mycoplasmes aviaires.....	50
Étiologie, épidémiologie, phylogénie et pathogénie	50
Détection des mycoplasmes.....	53
iv. Coronavirus aviaires	54
Étiologie, épidémiologie, phylogénie et pathologie.....	54
Détection des coronavirus.....	57
II. Méthodes d'étude des interfaces entre avifaune et élevages.....	58
a. Étude des dynamiques spatiales et temporelles	58
i. Techniques d'étude des dynamiques spatiales et temporelles de populations	58
ii. Analyse et coordination globale des données écologiques de l'avifaune	60
b. Étude écologique des interactions à l'interface avifaune-élevages	61
i. Inventaires de l'avifaune à l'interface	61
ii. Objectivation des interactions de l'avifaune à l'interface	63
iii. Détection moléculaire de l'avifaune.....	63
c. Étude des agents infectieux de l'avifaune	65
i. Échantillonnage direct sur l'avifaune.....	66
ii. Échantillonnage indirect des matières issues de l'avifaune	66
iii. Méthodes d'analyses microbiologiques adaptées aux interfaces.....	66
B. Contextes économique, sanitaire et écologique spécifiques des élevages avicoles du Sud-Ouest de la France	68
I. Description de la filière avicole et palmipèdes du Sud-Ouest de la France	68
a. Un bassin économique historiquement important	68
b. Principes de la production de palmipèdes gras.....	72
II. Épidémiologie des principaux agents infectieux impactant les canards gras.....	73
a. Épidémiologie et transmissions intra-élevage.....	73
b. Épidémiologie et transmissions inter-élevages.....	75
III. Description écologique et épidémiologie de l'avifaune sauvage locale	79
a. Écologie des populations d'oiseaux sauvages du Sud-Ouest de la France.....	79
b. Épidémiologie des agents infectieux de l'avifaune du Sud-Ouest de la France	84
Objectifs de travail	87
Deuxième partie : Étude expérimentale	89
A. Étude écologique et comportementale de l'avifaune commensale autour d'un élevage avicole plein air	90

I.	Description de la population d'avifaune sauvage fréquentant un élevage avicole en plein air	90
a.	Introduction.....	90
b.	Matériel et méthodes.....	90
	Choix et description du site d'étude.....	90
	Recensement de la population d'avifaune.....	92
	Analyse des données d'observation.....	95
	Analyse des données de captures-recaptures.....	96
c.	Résultats.....	96
	Analyse des données d'observation.....	96
	Analyse des données de captures-recaptures.....	97
d.	Discussions.....	102
II.	Analyse des contacts et interactions entre la communauté d'hôtes aviaires autour de canards élevés en plein air.....	108
a.	Introduction.....	108
b.	Matériel et méthodes du travail de terrain.....	108
c.	Publications scientifiques.....	109
d.	Conclusion.....	137
B.	Étude des agents infectieux à l'interface entre avifaune sauvage et élevages avicoles.....	139
I.	Identification et description d'un nouveau mycoplasme circulant dans la communauté aviaire commensale des élevages.....	139
a.	Introduction.....	139
b.	Publications scientifiques.....	140
c.	Conclusion.....	156
II.	Étude épidémiologique longitudinale de différents agents infectieux aviaires dans les compartiments sauvage et domestique autour d'un élevage avicole plein air.....	157
a.	Introduction.....	157
b.	Matériel et méthodes.....	158
	Prélèvements biologiques sur l'avifaune commensale.....	158
	Prélèvements de l'environnement des parcours.....	160
	Prélèvements des canards mulards de l'élevage.....	161
c.	Publications scientifiques.....	161
d.	Discussions.....	208
C.	Modalités de contacts et d'échanges entre avifaune sauvage et élevages avicoles.....	213
I.	Détection moléculaire des espèces sauvages dans l'environnement extérieur d'un élevage avicole plein air.....	213
a.	Introduction.....	213
b.	Matériel et méthodes.....	215
	Optimisation du protocole d'amplification des séquences.....	215
	Optimisation du protocole de purification des ADN environnementaux.....	217
	Optimisation du protocole de prétraitement des échantillons.....	218

c.	Résultats.....	219
	Optimisation du protocole d'amplification des séquences	219
	Optimisation du protocole de purification des ADN environnementaux.....	222
	Optimisation du protocole de prétraitement des échantillons	222
d.	Discussions.....	223
II.	Étude des déplacements individuels de bergeronnettes grises (<i>Motacilla alba</i>) à partir d'un élevage avicole plein air.....	225
a.	Introduction.....	225
b.	Matériel et méthodes	226
c.	Premiers résultats.....	228
d.	Discussions.....	230
	Conclusions et perspectives.....	232
	Références bibliographiques.....	245
	Liste des valorisations.....	282
Annexes	283	
A.	Indices de reproduction pour l'avifaune	283
B.	Poster en conférence : Analyse des contacts avifaune-élevage	284
C.	Poster en conférence : Identification et description d'un nouveau mycoplasme à l'interface avifaune-élevages	285
D.	Poster en conférence : Évaluation de la circulation de VIA et autres agents infectieux à l'interface avifaune-élevages	286
E.	Article de conférence : Analyse des contacts et des agents infectieux à l'interface avifaune-élevage	288

Liste des figures

Figure 1 - Schématisation du mécanisme d'émergence zoonotique.....	4
Figure 2 – Croissance de l'intérêt scientifique pour les maladies infectieuses à l'interface entre faune sauvage et animaux de production.	5
Figure 3 - Schéma préliminaire de l'épidémiologie des virus influenza à l'interface entre avifaune et élevages de volailles en plein air.....	7
Figure 4 - Schéma d'une particule typique de virus influenza et de la composition de son génome.	11
Figure 5 - Voies de transmission et tropisme tissulaire des VIAFP et VIAHP au sein du réservoir sauvage.	17
Figure 6 – Mécanismes de dynamique saisonnière des VIAFP chez les canards.	18
Figure 7 - Phylogénie et dissémination des VIAHP H5Nx.....	19
Figure 8 - Écologie des virus influenza A.....	24
Figure 9 - Affichage en ligne de l'outil interactif de phylogénie et épidémiologie moléculaire GISAID...	38
Figure 10 - Schéma d'une particule typique des <i>Avulavirinae</i> et de la composition du génome.	43
Figure 11 - Phylogénie des <i>Avulavirinae</i>	45
Figure 12 - Phylogénie et hôtes primaires des espèces de <i>Chlamydiaceae</i>	47
Figure 13 - Phylogénie des principaux <i>Mollicutes</i>	51
Figure 14 – Phylogénie, horloge moléculaire et hôtes primaires des différents genres des <i>Orthocoronavirinae</i>	55
Figure 15 - Schéma d'une particule typique d'IBV et de la composition du génome.	56
Figure 16 - Répartition géographique des élevages de volailles et de leur part économique en France.	68
Figure 17 - Distribution géographique mondiale et nationale des canards d'élevage.	69
Figure 18 - Évolution de l'économie des foies gras de canard et oie en France de 1985 à 2019.....	71
Figure 19 - Schéma d'un cycle de production typique de canards mulards à foie gras.	72
Figure 20 - Nombre et distribution géographique des cas sauvages et domestiques d'IAHP en France de 2016 à 2021.....	76
Figure 21 - Répartition géographique des zones à risque d'IAHP.	77
Figure 22 - Hydrographie et pluviométrie du Sud-Ouest de la France.	80

Figure 23 - Sites du réseau de comptage Wetlands International dans le Sud-Ouest de la France, et leurs effectifs moyens d'oiseaux d'eau sur les mois de janvier 2016 à 2020.	80
Figure 24 - Axes et sites observatoires de migration de l'avifaune aquatique (Anatidés et Grues cendrées) en France.....	81
Figure 25 - Sites de marquage et de contrôle (capture physique ou visuelle) de canards ayant été marqués ou observés en hiver aux Pays-Bas.....	82
Figure 26 - Distribution spatiale des contrôles en France à l'automne de turdidés marqués dans divers autres pays européens.	83
Figure 27 - Distribution des données ornithologiques participatives en France.	84
Figure 28 - Description et localisation du site d'étude.	91
Figure 29 - Plan détaillé des protocoles de recensement ornithologiques sur l'élevage.	93
Figure 30 - Distribution des effectifs des espèces de l'avifaune sur l'élevage, par protocole d'observation.	99
Figure 31 - Evolution temporelle de la richesse spécifique et des indices de diversité sur l'élevage selon le protocole d'inventaire.	100
Figure 32 - Distribution des effectifs par session des espèces de l'avifaune capturées sur l'élevage.....	101
Figure 33 - Estimation des tailles de populations pour chaque paire de sessions de captures considérée.	104
Figure 34 - Illustration de la cage en V utilisée pour cibler les tourterelles turques.....	158
Figure 35 - Illustration des méthodes de prélèvement sur l'avifaune commensale de l'élevage d'étude.	159
Figure 36 - Illustration des méthodes de collecte et prétraitement des prélèvements environnementaux sur l'élevage d'étude.....	161
Figure 37 - Schéma du processus de prétraitement des prélèvements environnementaux.....	219
Figure 38 - Résultats sur gel d'agarose des PCR conventionnelles sur échantillons de muscles de quatre espèces, avec les trois couples d'amorces ciblant le gène COI des oiseaux.....	220
Figure 39 - Résultats des essais de température d'hybridation sur les qPCR ciblant de courtes séquences d'ADNmt des oiseaux.	221
Figure 40 - Résultats comparés des PCR nichées ciblant le gène COI à partir d'ADN fécal de tourterelle extrait et purifié par deux kits commerciaux.	222
Figure 41 - Résultats de qPCR évaluant l'efficacité des protocoles de préparation par filtration et saturation en sels phosphatés.....	223

Figure 42 - Description du matériel et de la méthode d'équipement et de suivi télémétrique des bergeronnettes grises.....227

Figure 43 - Détections des émetteurs VHF de bergeronnettes grises par le récepteur fixe sur l'élevage et le récepteur mobile hors de l'élevage entre le 20 février et le 20 mai 2021.229

Figure 44 - Cartographie des détections d'émetteurs VHF de bergeronnettes grises hors de l'élevage d'étude du 20 février au 20 mai 2021.....230

Figure 45 - Schéma final de l'épidémiologie des virus influenza à l'interface entre avifaune et élevages de volailles en plein air.....233

Liste des tableaux

Tableau 1 - Principales appellations IGP de volailles du Sud-Ouest..... 69

Tableau 2 - Répartition temporelle des sessions de chaque protocole ayant servi à l'étude de la population d'avifaune. 94

Tableau 3 - Description des amorces considérées pour amplifier les codes-barres par PCR conventionnelle.....216

Tableau 4 - Description des amorces considérées pour amplifier les codes-barres par PCR en temps réel.217

Tableau 5 - Protocoles de PCR et qPCR adaptés pour l'amplification spécifique des séquences codes-barres d'oiseaux.....221



Table des abréviations

Termes abrégés (par ordre alphabétique)

ADNe : ADN environnemental

AGID : immunodiffusion sur gel d'agar

CMR : Capture-Marquage-Recapture

ELISA : test d'immunoabsorption par enzyme liée

HA : protéine virale hémagglutinine

IAHP : Influenza Aviaire Hautement Pathogène

IBV : virus de Bronchite Infectieuse

IHA : test d'inhibition de l'hémagglutination

IN : test d'inhibition de la neuraminidase

LNR : Laboratoire National de Référence

LSA : Loi sur la Santé Animale de la Commission Européenne

MG : *Mycoplasma gallisepticum*

MLST : typage de séquences multi-locus

MS : *Mycoplasma synoviae*

NA : protéine virale neuraminidase

NDV : virus de la Maladie de Newcastle

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PCR-HRM : PCR suivie d'analyse haute résolution de la courbe de fusion

qPCR : PCR dite quantitative ou en temps réel

RT-PCR : réaction de rétro-transcription et polymérisation en chaîne

SIQO : Signes Officiels de la Qualité et de l'Origine

STOC : programme de Suivi Temporel des Oiseaux Communs

VIA : virus Influenza A

VIAHP / VIAFP : VIA de phénotype Hautement/Faiblement pathogène

ZRD : Zone à Risque de Diffusion (pour les VIAHP)

ZRP : Zone à Risque Particulier (pour l'introduction de VIAHP)

Organismes et institutions (par ordre alphabétique)

CIFOG : Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras

CRBPO : Centre de Recherche sur la Biologie des Populations d'Oiseaux

ENVT : École Nationale Vétérinaire de Toulouse

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle de Paris

OFB : Office Français de la Biodiversité

OIE : Organisation Mondiale de la Santé Animale

Introduction

Face aux altérations profondes du climat et de la biodiversité induites par la mondialisation et l'intensification des activités humaines depuis des décennies, nos sociétés prennent de plus en plus la mesure des répercussions de ces changements à différents niveaux. Ces répercussions ne sont pas seulement des changements environnementaux observés ou subis par des populations humaines de plus en plus nombreuses (Masson-Delmotte et al., 2021), mais aussi des effets en chaîne comme la multiplication des risques d'émergences infectieuses (Jones et al., 2008; Morand, 2020) qui peuvent parfois ralentir et modifier les dynamiques d'activités humaines à l'échelle mondiale comme l'a montré la pandémie de Covid-19 en 2020 (Morens and Fauci, 2020). Les activités humaines passées et présentes engendrent donc pour nos sociétés actuelles de multiples défis pour préserver un environnement vivable et capable de produire notre alimentation et nos matières premières. Un tel environnement durablement productif et résilient ne peut pas exister sans les écosystèmes divers et complexes qui le constituent, qui sont capables de rendre des services écosystémiques (Zhang et al., 2007). Ces services permettent en effet d'atténuer la charge économique dans de nombreux domaines d'activités humaines, en particulier dans le domaine agricole, en interaction directe et permanente avec l'écosystème qui l'héberge, tant au niveau du sol, du système hydrique, que de la biodiversité composée d'auxiliaires, ravageurs et adventices, de l'échelle microscopique à macroscopique. Les agriculteurs sont ainsi les premiers concernés par la préservation des écosystèmes, dans le sens où leur production si elle se veut durable en dépend, mais aussi car les paysages sont façonnés depuis des siècles par les systèmes agricoles (retenues d'eau pour l'irrigation, canaux de drainage, bocages, pâturages, grandes cultures, cultures en terrasse, forêts...).

À l'ère de la révolution productiviste de la deuxième moitié du XX^{ème} siècle, la modernisation de l'agriculture a vu de nombreux systèmes (politique agricole commune, instituts de coordination, d'enseignement et de recherche agricoles), technologies (machines agricoles motorisées, agrochimie) et biotechnologies (sélection génétique, mutagenèse, hybridations variétales) se développer et s'améliorer pour subvenir aux besoins croissants et à la sécurité alimentaire d'une population de moins en moins rurale (Bourgeois and Demotes-Mainard, 2000; Deverre and Marie, 2008). Cependant, les impacts négatifs de l'intensification agricole ont peu à peu montré les limites de durabilité de ces systèmes agro-alimentaires. Ceci est vrai tant écologiquement comme le révèle la chute de biodiversité en milieux agricoles (Carpenter et al., 1998; Fontaine et al., 2020; Jeliaskov et al., 2016), que sanitaire avec des crises d'ampleur (comme la "vache folle" dans les années 80-90) qui ont marqué la population et freiné la consommation (Agreste, la statistique agricole, 2020a), ou encore socio-économiquement avec une accélération de l'exode rural parallèlement à une dégradation du niveau de vie pour beaucoup

d'agriculteurs (Bourgeois and Demotes-Mainard, 2000; Desriers, 2007). C'est dans ce contexte que l'idée de maintenir ou revenir à des systèmes plus durables et résilients se répand de plus en plus largement dans les différentes productions agricoles (Gassie, 2017). Cette transition agro-écologique est poussée globalement en Europe par l'évolution des réglementations et des subventions publiques. Celles-ci sont issues d'un changement global de l'opinion publique des producteurs et consommateurs, qui cherchent à s'orienter vers un développement plus durable et une production plus en phase avec des valeurs écologiques et traditionnelles (Agreste, la statistique agricole, 2020a; Bessei, 2018; Gassie, 2017; IFOP, 2020). Des changements plus favorables aux agro-écosystèmes passent notamment par une gestion intégrée de productions diverses complémentaires permettant d'optimiser l'usage d'intrants et le travail mécanique, et parfois par une baisse de densité des productions (Deverre and Marie, 2008; Tamminga, 2003). Dans le secteur de l'élevage, l'Europe et notamment la France voient s'accroître les productions animales en plein air et plus particulièrement sous signes de qualité (label rouge ou biologique par exemple) (Agreste, la statistique agricole, 2020c; INAO, 2019; Sørensen et al., 2006). Celles-ci favorisent en effet le bien-être animal plébiscité par la majorité des consommateurs et producteurs (Agreste, la statistique agricole, 2020a; Bessei, 2018; IFOP, 2020; Walley et al., 2015), tout en réduisant généralement la densité spatiale (augmentation de la surface par animal) et temporelle (augmentation de la durée de production) de l'élevage dans une optique de réduire son impact environnemental local. Ces changements de systèmes agricoles sont souvent associés à une simplification et un raccourcissement des circuits de production et vente. La demande et le développement de ces circuits courts ont été particulièrement accélérés et confirmés à partir de 2020 avec la pandémie de Covid-19 qui a provoqué une prise de conscience chez de nombreux consommateurs (FranceAgriMer, 2020). Cependant, la transition agro-écologique qui s'opère en Europe ne doit pas omettre la nécessité de nourrir localement toutes les catégories de population, y compris celles ne pouvant pas se permettre le surcoût financier généralement associé aux produits de meilleure qualité environnementale. Ce contraste existe également à l'échelle internationale où la sécurité alimentaire reste toujours à améliorer et protéger dans certaines régions en développement, d'autant plus dans le contexte actuel d'accroissement de la consommation mondiale, de changement climatique, d'insécurité géopolitiques multiples, et de menaces sanitaires récurrentes (Alexandratos and Bruinsma, 2012; Gassie, 2017). Notre société européenne arrive donc à une situation de compromis entre la préservation d'une rentabilité quantitative et qualitative des productions agricoles, tout en garantissant leur durabilité et leur résilience via la préservation de la biodiversité à l'échelle locale voire mondiale.

En conséquence des tendances de consommation diverses qui coexistent en Europe, on observe aujourd'hui une cohabitation entre gros élevages "intensifs" souvent à haut niveau technique, et de plus petites exploitations souvent familiales et à moindre technicité (Agreste, la statistique agricole, 2020c, 2010). Cette coexistence s'ajoute à une densification qui peut être accrue au sein des filières d'élevage

sous signe de qualité, circonscrites par une appellation géographique. En effet dans ces périmètres d'appellation, la meilleure valorisation, les économies de filière locale (aliment, services, matériel, abattage, transformation) et les aides publiques peuvent favoriser localement un même type de production. Il faut cependant rappeler que l'intensification des élevages, d'autant plus lorsqu'ils fonctionnent en plein air, est fortement liée à une pollution environnementale diffuse par les effluents non traités (lisier, urine, eaux sales) et la poussière (Cambra-López et al., 2010; Carpenter et al., 1998; Tamminga, 2003). À cela s'ajoute une pollution microbiologique s'étendant par ruissèlement dans les sols et le système hydrique (Dufour et al., 2012; Mawdsley et al., 1995). La densification des élevages, d'autant plus en plein air et avec une maîtrise variable de la biosécurité (Delpont et al., 2018), favorise aussi l'amplification et la diffusion d'agents infectieux entre eux, et avec les autres espèces éventuellement sensibles telles que les humains ou les animaux sauvages (Gummow, 2010; Jones et al., 2013; Morand, 2020). Or cette diffusion amplifiée, favorisée par les liens de filière qui accroissent les mouvements de matériel et d'animaux (Guinat et al., 2020b), est un des éléments menant à l'émergence ou la réémergence d'agents pathogènes (Cleaveland et al., 2007; Gummow, 2010; Karesh et al., 2012) et notamment les émergences zoonotiques (c'est-à-dire capables de se transmettre entre animaux et humains) qui constituent la majorité des infections humaines émergentes (Jones et al., 2008; Taylor et al., 2001) (Figure 1). Cette frontière parfois floue entre infections animales et humaines, ainsi que des méthodes d'étude similaires, justifient le choix d'employer le terme "épidémie" dans l'ensemble du manuscrit suivant sans distinction de la population considérée. Le risque d'échanges infectieux à l'interface sauvage-domestique est aussi favorisé par le développement des surfaces d'élevages en plein air associé à la fragilisation de la biodiversité animale (Morand, 2020), qui modifient les interactions entre compartiments et ainsi l'écologie des agents infectieux (Daszak et al., 2000; Engering et al., 2013; Gortazar et al., 2014). Cette fragilisation de la biodiversité animale se produit à l'échelle globale avec des concentrations en zones tropicales (Schipper et al., 2008) mais aussi localement en France et en Europe, comme le reflète le fort déclin des oiseaux de milieux ruraux et plus particulièrement des milieux agricoles intensifiés et simplifiés (Burns et al., 2021; Fontaine et al., 2020; Jeliaskov et al., 2016).

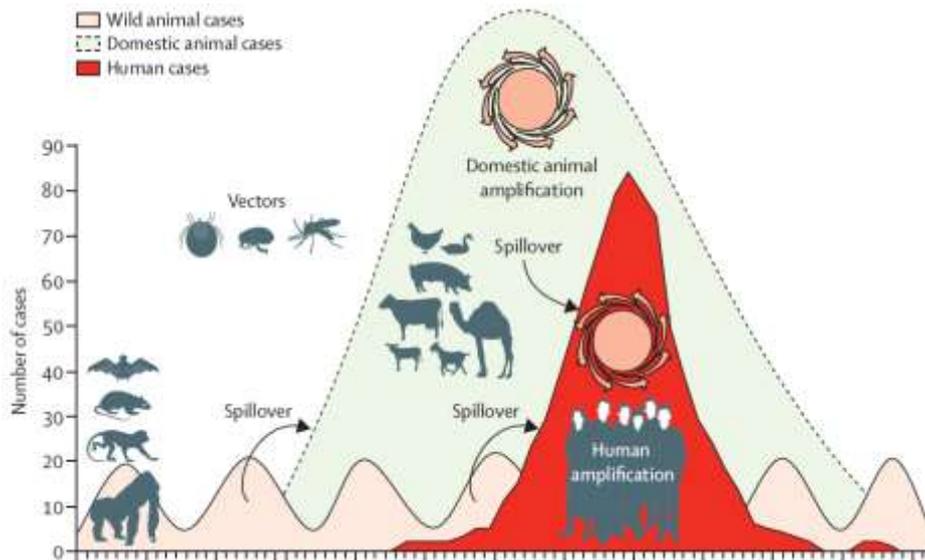


Figure 1 - Schématisation du mécanisme d'émergence zoonotique.

La transmission d'un agent infectieux et son amplification dans les populations humaines (rouge) se produit lorsqu'un agent infectieux du réservoir sauvage (rose) émerge dans une population domestique et y provoque une épidémie (vert), ce qui amplifie la capacité de transmission de l'agent pathogène aux humains. *Issue de Karesh et al., 2012.*

Parmi l'ensemble des élevages dont la croissance est générale et mondiale, les élevages de volailles et en particulier de poulets figurent en tête de liste autant par les effectifs que par la vitesse de croissance (Alexandratos and Bruinsma, 2012; Thornton, 2010) (Figure 2a). Parallèlement à cet accroissement, les maladies infectieuses qui affectent la volaille sont de plus en plus étudiées, puisqu'elles engendrent mécaniquement des impacts économiques et sur la sécurité alimentaire accrus (FAO, 2013; Wiethoelter et al., 2015) (Figure 2b). Comme la tendance favorable aux élevages en plein air s'observe dans cette filière aussi (Agreste, la statistique agricole, 2020c, 2010), les agents infectieux circulant aux interfaces avec l'avifaune représentent un enjeu scientifique majeur (Wiethoelter et al., 2015) (Figure 2c). Ce type d'élevage présente en effet un risque particulier pour l'introduction infectieuse, par exemple observé pour les virus influenza (Gonzales et al., 2013; Gortázar et al., 2007; Koch and Elbers, 2006).

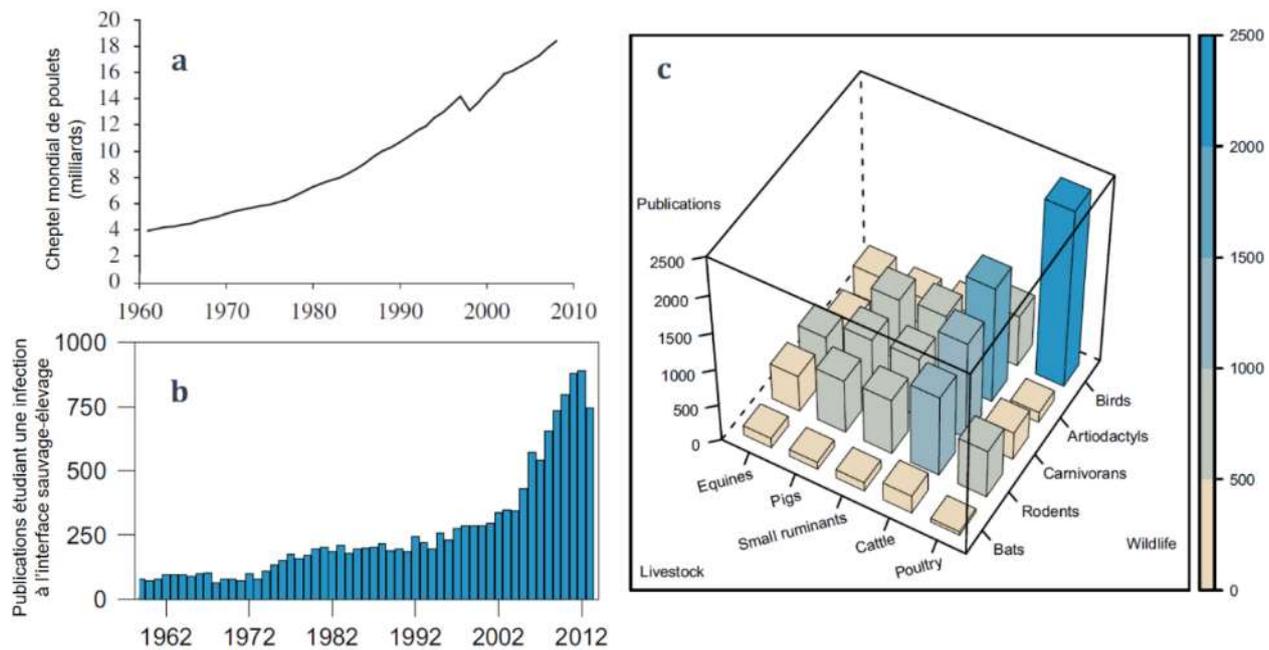


Figure 2 – Croissance de l'intérêt scientifique pour les maladies infectieuses à l'interface entre faune sauvage et animaux de production.

a – Evolution de la production mondiale de poulet (nombre de têtes en milliards) de 1960 à 2010, *issue de Thornton, 2010*.

b – Evolution du nombre de publications sur les infections à l'interface entre faune sauvage et animaux de production de 1958 à 2013, *issue de Wiethoelter et al., 2015*.

c – Nombre de publications scientifiques (jusqu'en 2013 inclus) étudiant une maladie infectieuse à chaque interface entre faune sauvage et élevages. *Issue de Wiethoelter et al., 2015*.

Comparées aux autres interfaces sauvage-domestique, les transmissions infectieuses entre volailles et avifaune peuvent être facilitées car elles concernent des espèces hôtes sympatriques (c'est-à-dire taxonomiquement proches, et vivant à proximité avec un mode de vie similaire), et souvent grégaires et avec des modes d'élevages relativement denses. En outre, le compartiment sauvage de cette interface est difficile à contrôler car riche et omniprésent dans l'environnement (Pigot et al., 2020), et un grand nombre d'espèces montrent un comportement migratoire qui permet potentiellement des brassages infectieux à l'échelle intercontinentale (Newton, 2007a). La compréhension des interactions et des dynamiques épidémiologiques entre avifaune et volailles est d'autant plus complexe de nos jours que les perturbations anthropogéniques (climat et usage de l'espace) modifient l'écologie globale des oiseaux sauvages (Barbet-Massin et al., 2012; Jeliaskov et al., 2016). Ce n'est ainsi pas seulement un appauvrissement spécifique qui se déroule (BirdLife International, 2021; Burns et al., 2021; Fontaine et al., 2020), mais également une modification globale des distributions des populations aviaires (Barbet-Massin et al., 2012; Jetz et al., 2007), et des voies et comportements migratoires (Horton et al., 2020; Newton, 2007b). Tous ces phénomènes peuvent impacter largement l'épidémiologie et les interactions entre espèces sauvages et avec les élevages avicoles.

C'est en conséquence de ces constats de changements agricoles, écologiques et climatiques en cours, que se pose le besoin de mieux appréhender les interfaces épidémiologiques entre avifaune et élevages

avicoles, contribuant à la recherche de systèmes plus résilients. Ce besoin s'est fait récemment plus pressant, en particulier dans le bassin de production de volailles du Sud-Ouest de la France, avec une succession d'épidémies d'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) en élevages qui ont impacté profondément la filière au cours des hivers 2015-2016, 2016-2017 puis 2020-2021 (EFSA et al., 2021a, 2017; Le Bouquin et al., 2016). Les virus en cause ayant été détectés dans le compartiment sauvage, de fortes suspicions se sont portées sur le rôle de l'avifaune dans l'introduction, voire dans la diffusion régionale de l'infection entre élevages majoritairement en système plein air (Anses, 2016). Or si l'on connaît le rôle de réservoir pour les virus influenza de l'avifaune aquatique (en particulier l'ordre des Anseriformes) (Caron et al., 2017; Olsen et al., 2006; The Global Consortium for H5N8 and Related Influenza Viruses, 2016), celle-ci est rarement observée sur les élevages plein air (Lubac et al., 2012; Veen et al., 2007) et la question du rôle de l'avifaune non aquatique commensale des élevages se pose alors. En effet, par définition ces espèces commensales sont au contraire observées fréquemment et parfois en grand nombre sur les élevages (Lubac et al., 2012; Veen et al., 2007), avec parfois des interactions très proches avec les volailles domestiques. Cette proximité pourrait permettre d'éventuelles transmissions infectieuses et l'avifaune commensale pourrait alors jouer un rôle dans l'épidémiologie des agents infectieux, comme hôtes de maintenance ou comme hôtes relais entre sites (Caron et al., 2017, 2014) (Figure 3)

Ainsi, le travail présenté ici vise à apporter des éléments de réponse à la question suivante : l'avifaune commensale joue-t-elle vis-à-vis des élevages avicoles un rôle dans l'épidémiologie des agents infectieux et particulièrement des virus influenza ? De manière plus détaillée, nous essaierons d'explorer par le travail présenté ici quelle population d'avifaune fréquente les élevages de volailles en plein air au fil des saisons, quelles sont les interactions écologiques pouvant favoriser les échanges infectieux à cette interface sauvage-domestique, si les interactions observées sont efficaces pour les éventuels échanges infectieux, et enfin quel pourrait être le rôle épidémiologique de l'avifaune commensale vis-à-vis des agents infectieux des volailles. Ce travail sera mené dans le contexte particulier d'un élevage de canards en plein air du Sud-Ouest de la France, comme modèle d'étude. L'étude pour répondre à ces questions passera donc par des méthodes classiques d'écologie descriptive, complétées par des approches alternatives d'observations individuelles et de biologie moléculaire. Des méthodes de surveillance épidémiologique seront ensuite appliquées à partir de diverses sources de prélèvements et divers agents infectieux sur les compartiments sauvage et domestique de l'interface. Les résultats et conclusions présentés dans ce document devraient permettre de mieux appréhender les risques épidémiologiques que représentent les contacts directs et indirects avec l'avifaune commensale à travers le modèle des canards élevés en plein air, ceci pour éclairer les décisions de gestion et prévention sanitaires à l'échelle des élevages ou des filières.

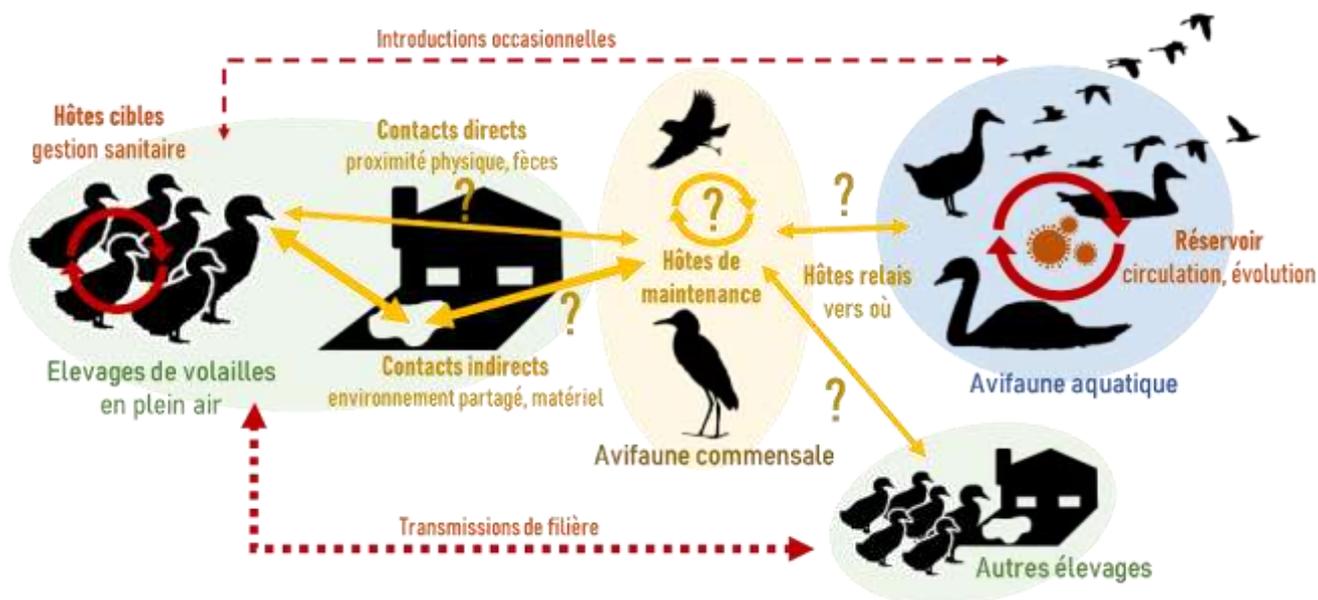


Figure 3 - Schéma préliminaire de l'épidémiologie des virus influenza à l'interface entre avifaune et élevages de volailles en plein air.

En **orange** les hypothèses et objets d'étude de ce travail, en **rouge** les voies de circulation et de transmission virale connues et non considérées dans ce travail.



~ ~ ~

Première partie : Étude bibliographique

~ ~ ~



A. Étude des agents infectieux aviaires d'intérêt et épidémiologie à l'interface entre avifaune sauvage et élevages

I. Agents infectieux aviaires d'intérêt économique circulant à l'interface entre avifaune et élevages

a. Influenza aviaire

Les virus de type influenza furent identifiés chez les oiseaux vers le milieu du 20^{ème} siècle (Schäfer, 1955). Ils circulaient pourtant très probablement depuis bien plus longtemps dans cette classe taxonomique, sans diagnostic étiologique certain et causant la « peste aviaire » bien connue des éleveurs et vétérinaires (Alexander, 2003; Schäfer, 1955; Stubbs, 1948). À la suite de la consolidation de la définition moderne des virus en tant qu'agents infectieux microbiologiques spécifiques par André Lwoff en 1957 (Lwoff, 1957), les premières souches aviaires de virus influenza A furent ainsi classifiées et décrites comme telles en 1965 (Pereira et al., 1965). Parmi ces souches virales se trouvait le premier virus influenza issu d'une espèce sauvage, une sterne d'Afrique du Sud, prélevé en 1961 et décrit quelques années plus tard (Becker, 1966). Par la suite, des recherches de plus grande ampleur dans l'avifaune sauvage permirent peu à peu d'appréhender la grande diversité des virus influenza aviaires présents sur l'ensemble des océans et continents (Alexander, 2003, 1982), jusqu'à l'Antarctique (Hurt et al., 2014).

Bien que non certaine, l'origine aviaire de la pandémie humaine d'influenza de 1918 (la « grippe espagnole ») est fortement suspectée grâce à des analyses génétiques faites récemment sur des reconstructions de la souche virale en cause (Taubenberger et al., 2019). Pour ce qui est des changements d'hôte avérés, les premiers passages « efficaces » (c'est-à-dire transmissibles de personne à personne) aux populations humaines après la définition de 1965 ont fait connaître ces virus à un public plus large que le milieu de l'élevage avicole. En effet, ces introductions dans les populations humaines sont généralement remarquées par les épidémies qu'elles provoquent chez leurs hôtes immunitairement naïfs, prenant parfois un caractère pandémique lorsque la diffusion devient internationale (Morens and Fauci, 2020; Taubenberger and Morens, 2009). Par la suite, les descendants de ces émergences peuvent alors continuer à circuler de façon endémique en se mêlant aux souches préexistantes, comme l'a montré le virus de 1918 (Taubenberger et al., 2019).

Ces risques sanitaires globaux pour les élevages de volailles et pour les populations humaines font des virus influenza un objet particulier de l'attention scientifique mondiale.

i. Étiologie, phylogénie et pathogénie des VIA

Étiologie et phylogénie

Les virus influenza appartiennent à la famille des *Orthomyxoviridae*, qui comporte les quatre genres et leur unique espèce respective d'influenza : *Alpha-* (Influenza A), *Beta-* (Influenza B), *Gamma-* (Influenza C), et *Deltainfluenzavirus* (Influenza D) ; ainsi que les genres *Isavirus* (une espèce), *Quaranjavirus* (deux espèces), et *Thogovirus* (deux espèces) (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021). Le genre le plus répandu et varié et qui nous intéresse ici est celui des alphainfluenzavirus, dont l'espèce unique est *Influenza A virus* (Swayne, 2008), que nous appellerons simplement « virus influenza » ou VIA par la suite.

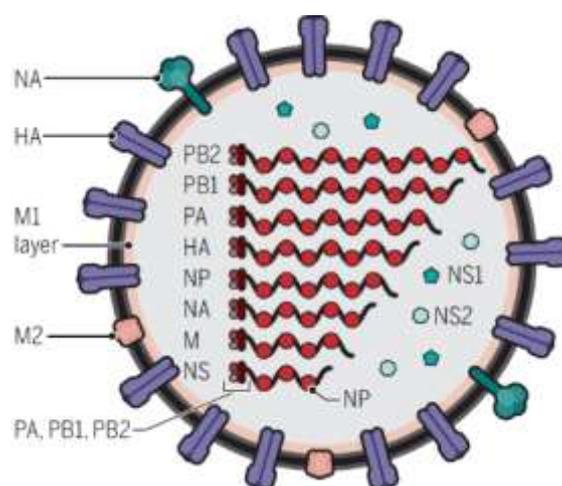


Figure 4 - Schéma d'une particule typique de virus influenza et de la composition de son génome.

L'ensemble représente huit segments génétiques d'ARN négatif simple brin, ainsi qu'au moins dix protéines. Codées chacune par leur propre segment d'ARN, les glycoprotéines de surface HA (hémagglutinine) et NA (neuraminidase) participent respectivement à l'entrée et à la sortie de la cellule hôte et constituent les principaux antigènes reconnus par le système immunitaire de l'hôte. Codées par le segment M, la protéine M1 (matrice 1) est structurale de l'enveloppe, tandis que M2 (matrice 2) est un canal de transfert ionique. La protéine NP (nucléoprotéine), codée par son segment propre, encapside l'ARN viral. Chaque segment de celui-ci est également associé au trimère protéique formé par PB1 (polymérase basique 1), PB2 (polymérase basique 2) et PA (polymérase acide), toutes trois codées par leur propre segment d'ARN. Enfin, le segment NS code pour deux protéines non structurales NS1 et NS2. La première a diverses fonctions dans l'interaction avec la cellule hôte et son matériel génétique, tandis que la deuxième facilite l'export du matériel génétique viral vers la cellule hôte. *Issue de Taubenberger et al., 2019.*

Les particules virales sont protéiformes, le plus souvent rondes et d'environ 100 nm de diamètre, mais des formes filamenteuses peuvent parfois être observées (Badham and Rossman, 2016). Ces virions sont composés d'au moins dix protéines, structurant une enveloppe et abritant un génome à ARN (Figure 4). Premières exposées lors de l'interaction initiale entre le virus et son hôte, les grandes glycoprotéines de surface HA (hémagglutinine) et NA (neuraminidase) sont essentielles et constituent les principaux antigènes reconnus par le système immunitaire de l'hôte. De plus, elles ont un rôle fonctionnel majeur puisque HA participe à l'entrée dans la cellule hôte, tandis que NA permet la libération des virions à la sortie de la cellule (Baigent and McCauley, 2003; Swayne, 2008). L'entrée du virus dans la cellule cible commence par un attachement entre HA et les acides sialiques exposés à la surface des cellules animales. Cet attachement est un premier facteur pour la spécificité d'hôte et le tropisme tissulaire, puisque la

bonne reconnaissance conformationnelle des HA et acides sialiques dépend de la séquence en acides aminés de HA et de la forme de liaison de l'acide sialique avec la chaîne glucidique qui le supporte. Ainsi, les liaisons d'acides sialiques les plus communes sont en α -2,3 et α -2,6, et leur distribution tissulaire dépend de l'espèce hôte (Baigent and McCauley, 2003; Stevens et al., 2006; Swayne, 2008). Suite à l'attachement spécifique du virus à la membrane hôte, celui-ci est internalisé et les HA peuvent alors être clivées par des protéases généralistes de l'hôte, permettant la libération de l'ARN viral dans le cytoplasme. Un deuxième facteur pour la spécificité d'hôte et le tropisme tissulaire est alors la séquence aminée du site de clivage de la HA. Celle-ci détermine la diversité de protéases capables d'interagir avec le site de clivage, et par conséquent le taux d'introductions virales dans les cellules hôtes. Ainsi, la présence d'un unique acide aminé basique (arginine) sur le site de clivage ne permettra que l'action de protéases « trypsine-like » présentes typiquement dans les systèmes respiratoires et digestifs. Tandis qu'une insertion d'une série d'acides aminés basiques (arginine et lysine) sur ce site permettront l'action d'une plus grande diversité de protéases présentes dans un plus grand spectre tissulaire (Kuiken et al., 2006; Swayne, 2008). De ce fait, la séquence codante pour HA d'une souche virale est déterminante pour son spectre d'hôte et son tropisme tissulaire via l'attachement aux acides sialiques, puis de son infectiosité cellulaire via le taux de pénétration. En outre, un attachement HA-acide sialique moindre (faible spécificité d'hôte ou de tissu de la souche virale) peut être partiellement compensé par un clivage de HA facilité pour permettre finalement la libération du génome viral et la réplication virale. En fin de cycle de réplication virale, la protéine NA joue aussi un rôle dans la capacité d'émission des virions infectieux depuis la cellule infectée. En effet, NA permet le clivage de la liaison entre les HA et acides sialiques au niveau des virions néoformés enveloppés par la membrane cellulaire, ce qui permet une libération des virions infectieux vers d'autres cellules cibles (Baigent and McCauley, 2003; Swayne, 2008).

Le génome viral, d'une longueur totale de 10 à 15 kb, est fragmenté en huit segments d'ARN simple brin et de polarité négative (Figure 4). Du fait de cette structure génétique, les VIA sont sujets à d'importantes variabilités, et ce par deux principaux mécanismes : le fort taux de mutation et le réassortiment de segments génétiques. Les mutations sont en effet fréquentes sous l'action non correctrice de l'ARN polymérase ARN-dépendante lors de la réplication virale (Venkataraman et al., 2018), de l'ordre de $1/10^4$ nucléotides, soit une par virion produit. Aléatoires, ces mutations sont le plus souvent sans effet (redondance du code génétique, acide aminé de chimie proche, locus peu influent), voire délétères à la fonctionnalité virale. Sous la pression de sélection exercée par le système immunitaire de l'hôte, et donc essentiellement sur les glycoprotéines HA et NA, les virus influenza sont sujets à une évolution appelée dérive antigénique (Swayne, 2008; Taubenberger et al., 2019). Ainsi, les virions portant des glycoprotéines reconnues par les anticorps de l'hôte seront les premiers éliminés par les mécanismes immunitaires, tandis que les variants au niveau de HA et NA produits au gré des mutations auront une

chance supérieure d'accéder aux cellules et d'être ainsi amplifiés. Ce mécanisme se joue à l'échelle d'un hôte individuel entre chaque cellule cible, mais aussi dans la population générale, les mutants amplifiés en plus grand nombre étant transmis en plus grand nombre d'un hôte à l'autre. Outre les mutations, les coinfections par différentes souches virales au sein d'une même cellule permettent un réassortiment des fragments d'ARN produits dans les virions excrétés.

Pour leur déterminisme dans l'immunogénicité, le tropisme cellulaire, et la pathogénicité, ainsi que pour leur susceptibilité à la pression de sélection, les variants des protéines HA et NA constituent la base de la définition des sous-types de virus influenza. Ils ont été d'abord définis par des méthodes immunoréactives, et aujourd'hui essentiellement par séquençage génétique (Alexander, 2003; Baigent and McCauley, 2003; Swayne, 2008). On peut à ce jour identifier 18 sous-types de HA (identifiés H1 à H18), et 11 sous-types de NA (identifiés N1 à N11), au sein desquels existent ensuite des variabilités qui permettent d'établir une phylogénie par clades et sous-clades (CDC, 2019), ainsi qu'un profil de pathogénicité. Ce dernier est défini par rapport aux signes cliniques provoqués chez le poulet, par infections intraveineuses expérimentales sur poussins (Swayne and Suarez, 2000), et il est déterminé par la séquence en acides aminés du site de clivage de HA : de composition monobasique pour un virus influenza faiblement pathogène (VIAFP), et polybasique pour un virus hautement pathogène (VIAHP) (Swayne, 2008). Les formes hautement pathogènes de HA n'ont été à ce jour identifiées qu'au sein des sous-types H5 et H7. Une souche de VIA sera finalement identifiée par un nom décrivant son espèce, son hôte de premier isolement, son origine géographique, le numéro de souche, l'année d'identification, terminé par le sous-type HxNx entre parenthèses (CDC, 2019; Swayne, 2008). Par exemple, la souche A/Goose/Guangdong/1/1996(H5N1).

Pathogénicité

Comme nous l'avons présenté ici, la pathogénicité des VIA est essentiellement déterminée par leur génétique qui module la spécificité d'hôte, le tropisme tissulaire et la capacité d'amplification cellulaire. Les VIA adaptés aux oiseaux présentent généralement une meilleure affinité pour les acides sialiques en α -2,3, tandis que les souches adaptées à l'humain et autres mammifères sont plus affines pour les formes α -2,6 (Kuiken et al., 2006). Or il se trouve une prédominance d'acides en α -2,6 dans la trachée humaine, et en α -2,3 dans les voies respiratoires profondes (alvéoles pulmonaires), tandis que chez les oiseaux se trouve une coexpression de formes α -2,3 et α -2,6 dans les tissus respiratoires supérieurs et inférieurs, et majoritairement α -2,3 dans les tissus digestifs, endothéliaux, rénaux et nerveux (Baigent and McCauley, 2003; França et al., 2013; Kuiken et al., 2006; Stevens et al., 2006; Swayne, 2008). Les VIA adaptés à chaque hôte s'attacheront donc préférentiellement dans l'appareil respiratoire supérieur plus exposé, mais par exemple un virus aviaire pourra infecter l'appareil respiratoire profond humain s'il y parvient (Kuiken et al., 2006; Long et al., 2019). Cependant, la spécificité n'est pas absolue car certains virus sont

capables de s'attacher aux deux types d'acides sialiques. De plus, il suffit de deux substitutions d'acides aminés pour inverser l'affinité de HA, ce qui peut entraîner un changement majeur de phénotype viral (Swayne, 2008).

La pathologie sera ici présentée pour les hôtes aviaires uniquement. L'essentiel des souches circulantes de VIA sont faiblement pathogènes, entraînant peu voire pas de symptômes chez leurs hôtes selon la souche virale, la charge infectieuse, et les caractéristiques de l'hôte (espèce, âge, immunité). Leur réplication spécifique dans les épithéliums respiratoires et digestifs peut éventuellement provoquer des symptômes respiratoires, un abattement entraînant une baisse de l'ingestion alimentaire, et une chute de ponte parfois irréversible pour les reproducteurs. La mortalité induite est généralement faible, mais peut être exacerbée par des coinfections virales ou bactériennes, ou bien des conditions environnementales peu favorables au rétablissement (Swayne, 2008). De manière générale, les Ansériformes (canards, oies) se montrent asymptomatiques aux VIAFP, et leur infection se fait plutôt au niveau des muqueuses digestives et de manière prolongée (Halvorson, 2008). Concernant les plus rares souches de VIAHP, leur capacité de réplication systémique provoque généralement une mort rapide parfois précédée brièvement de signes cliniques graves de type neurologiques et dépressifs généraux (Swayne and Suarez, 2000). Au niveau d'un élevage, la létalité est souvent massive et brutale, d'où le nom de peste aviaire que prenait la maladie autrefois. Si les Galliformes sont particulièrement sensibles à l'infection et fondent le critère de distinction entre VIAFP et VIAHP, cette sensibilité est généralement moindre chez les Ansériformes avec des symptômes légers, parfois même absents (Swayne and Suarez, 2000). Pourtant les récentes épidémies dues à des VIAHP H5N8 du clade 2.3.4.4b en Europe ont parfois démontré le contraire avec une forte mortalité en élevages de palmipèdes (EFSA et al., 2021a, 2017). Les signes apparents d'une infection à VIA semblent donc multiples, variables et frustes, et toute affection impliquant une mortalité anormalement élevée, une léthargie, une baisse d'appétit, une chute de ponte, ou encore des signes neurologiques (torticolis) peut être suspecte.

Pour l'impact qu'ils provoquent en élevages, tant pour la santé et le bien-être des animaux que pour les pertes économiques induites (Nicita, 2008; World Bank, 2012), ainsi que pour leur potentiel d'émergence pandémique, les infections à VIAHP font partie des maladies répertoriées dans le Code sanitaire pour les animaux terrestres de l'Organisation Mondiale de la Santé Animale (OIE) et tout sous-type H5 et H7 (même VIAFP) doit faire l'objet d'une déclaration obligatoire (OIE, 2021a). Comme les VIA sont capables de changements rapides et considérables de spectre d'hôtes et de pathogénicité, les infections à VIAFP de sous-types H5 et H7, et les infections à VIAHP étaient jusqu'à avril 2021 considérées comme dangers sanitaires de première catégorie en France (DGAL, 2013). Les infections à VIAHP sont aujourd'hui classées comme « ADE » et les infections à VIAFP (H5 et H7) comme « DE » par la Loi sur la Santé Animale (LSA) s'appliquant à l'échelle européenne (Commission Européenne, 2018). Cette classification implique une obligation de déclaration, de surveillance et de certification pour les deux groupes, auxquelles

s'ajoutent pour les VIAHP des mesures sanitaires réglementées de prévention, ainsi que de contrôle et élimination d'urgence autour d'un foyer identifié. Ces mesures de contrôle sanitaire s'ajoutent au coût économique de la maladie en élevage (Nicita, 2008; World Bank, 2012), et seront détaillées plus loin dans un paragraphe spécifique (*Contrôle et prévention des VIA en Europe et en France – p 31*).

ii. Écologie des VIA et épidémiologie dans les compartiments sauvages et domestiques

Réceptivité des hôtes réservoirs

Depuis les premiers isolements de VIA, le réservoir principal est connu comme étant l'avifaune aquatique et en particulier les canards, oies et cygnes (ordre des Anseriformes, 169 espèces) chez qui sont souvent observés des prévalences élevées et une grande diversité de sous-types viraux (Alexander, 1982; Long et al., 2019; Munster and Fouchier, 2009; Olsen et al., 2006; Swayne, 2008). L'ordre des Charadriiformes, qui comprend en particulier les limicoles (par exemple pluviers, vanneaux, gravelots, chevaliers, échasses, bécassines) et la famille des Laridés (goélands, mouettes, sternes) est souvent cité comme réservoir également, en particulier parce que ces espèces partagent largement les milieux de vie et les comportements migratoires des Anseriformes (Alexander, 1982; Long et al., 2019; Olsen et al., 2006; Swayne, 2008). Cependant le rôle des Charadriiformes est remis en question puisque les sous-types de VIA qui y circulent sont différents génétiquement des sous-types retrouvés chez les Anseriformes, et les prévalences observées y sont relativement faibles (Caron et al., 2017; Munster and Fouchier, 2009; Olsen et al., 2006). Ainsi l'attention des chercheurs serait exagérément portée sur les Charadriiformes du fait de leur écologie, et les conclusions faites dans certaines études pourraient être biaisées par de plus grands échantillonnages de ces espèces en comparaison d'autres non réservoirs. Parmi les Anseriformes, les canards de surface (sous-famille des Anatinés, par exemple Canard colvert *Anas platyrhynchos*, Sarcelle d'hiver *Anas crecca*, Canard pilet *Anas acuta*, Canard siffleur *Mareca penelope*, Canard souchet *Spatula clypeata*...) hébergent plus abondamment les VIA (Caron et al., 2017; Gaidet et al., 2007; Munster and Fouchier, 2009; Olsen et al., 2006). Leur bonne réceptivité digestive aux VIA combinée à une faible sensibilité permettent un portage et une excrétion asymptomatiques et prolongés dans les voies respiratoires et les fèces. La durée d'excrétion est généralement de l'ordre d'une semaine (Gaidet et al., 2010; Tanikawa et al., 2021) mais jusqu'à près d'un mois lors d'infections expérimentales à VIAFP sur canards domestiques (Halvorson, 2008; Swayne, 2008). L'infection produit en plus une immunité de longue durée autour de 6 à 15 mois chez les canards (Tanikawa et al., 2021; Tolf et al., 2013) et modérément spécifique du sous-type viral, qui permet des réinfections consécutives par d'autres sous-types circulants (Segovia et al., 2017), et confère une protection croisée partielle vis-à-vis des VIAHP (Costa et al., 2011; Koethe et al., 2020). La circulation importante de VIAFP pourrait aussi concourir à la moindre sensibilité aux VIAHP observée chez les canards, puisqu'elle favorise les coinfections de sous-types viraux homologues qui sont protectrices chez ces espèces (Bessière et al., 2021).

Mécanismes et voies de transmissions virales

Le maintien de la circulation des VIA dans ces populations est favorisé par leurs modes de transmission, associé à des facteurs écologiques de ces espèces. La transmission se fait essentiellement par voie fécale-orale du fait de la quantité importante de virus excrétée dans les fèces, associée à une émission fréquente et non localisée de celles-ci chez les oiseaux (Blagodatski et al., 2021; Causey and Edwards, 2008; Swayne, 2008). La transmission peut alors être directe si les individus vivent en promiscuité, mais surtout indirecte par contamination du milieu aquatique où certains VIA peuvent rester infectieux durant plusieurs mois (jusqu'à plus d'un an) dans des conditions favorables de température faible, pH neutre et salinité faible (Blagodatski et al., 2021; Breban et al., 2009; Brown et al., 2007; Dalziel et al., 2016; Ramey et al., 2022). Il semblerait cependant que les VIAHP montrent des durées de survie aquatique inférieures en comparaison des VIAFP, de l'ordre de la moitié ou du tiers selon les sous-types (Brown et al., 2007; Lebarbenchon et al., 2010). On peut aussi noter une voie de transmission directe par aérosols et gouttelettes respiratoires du fait du tropisme respiratoire des VIA, mais elle semble négligeable pour les VIAFP chez les Ansériformes au regard des quantités émises par voie fécale, et dans l'environnement ouvert où évoluent les oiseaux sauvages (Criado et al., 2021; Lebarbenchon et al., 2010). Cette voie peut cependant être plus importante pour les VIAHP à tropisme ubiquitaire (Gavier-Widén et al., 2012; Tanikawa et al., 2021), ou chez d'autres espèces hôtes. Une étude a comparé les voies d'excrétion de VIAFP variés par des canards et des goélands, montrant que ces derniers seraient plutôt excréteurs oropharyngés donc peu soumis au sein de leur espèce à une transmission fécale-orale directe ou aquatique (Criado et al., 2021), ce qui renforce l'idée d'un moindre rôle de réservoir de VIA pour les Charadriiformes (Caron et al., 2017). Les goélands semblent cependant être des hôtes réservoirs pour les sous-types H13 et H16 qui s'y sont particulièrement adaptés avec un portage digestif asymptomatique (Höfle et al., 2012). D'autres matières biologiques peuvent être infectieuses, comme la poussière (sur laquelle s'agrègent les particules virales) (Spekreijse et al., 2013), ou les plumes pour les VIAHP (Gaide et al., 2021; Karunakaran et al., 2019). Bien sûr les organes infectés peuvent aussi contaminer un prédateur ou charognard en cas d'ingestion, celle-ci étant favorisée dans le cas des VIAHP par l'affection clinique de la proie et par le caractère ubiquitaire du tropisme tissulaire (Blagodatski et al., 2021; Lebarbenchon et al., 2010; Shriner and Root, 2020). Comme les Ansériformes vivent généralement en groupe, et s'alimentent en ingérant des végétaux et petits invertébrés dans l'eau, un individu excréteur peut donc rapidement et durablement contaminer ses voisins via l'eau dans laquelle il aura déféqué. Sur les reposoirs de berges où les oiseaux d'eau se concentrent, les aérosols respiratoires, les fientes fraîches, la poussière ou encore les plumes libres peuvent aussi compléter la transmission aquatique (Figure 5).

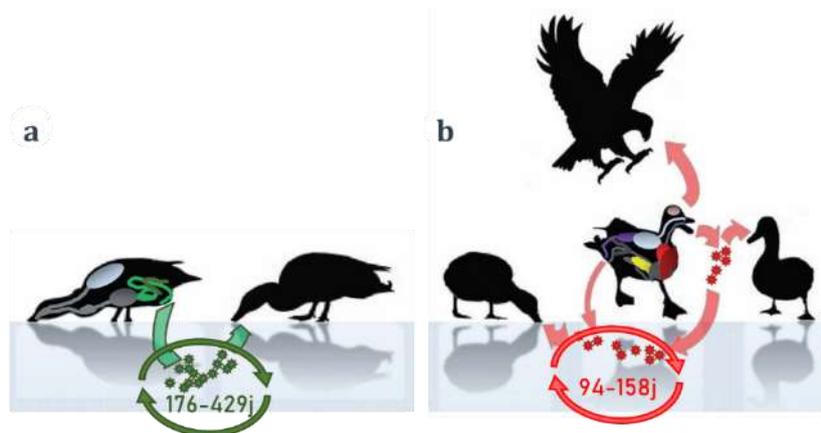


Figure 5 - Voies de transmission et tropisme tissulaire des VIAFP et VIAHP au sein du réservoir sauvage.

a – Pour les VIAFP, la voie de transmission majeure est fécale-orale directe ou aquatique, avec pour huit souches H5 et H7 étudiées une survie infectieuse de 176 à 429 jours dans une eau douce à 17°C et 7,4 de pH (Brown et al., 2007).
b – Pour les VIAHP, la transmission fécale-orale est complétée par les voies respiratoires, les plumes (non figurées), ainsi que la prédation. La survie infectieuse aquatique pour deux souches H5N1 a été de 94 et 158 jours dans une eau douce à 17°C et 7,4 de pH (Brown et al., 2007).

Issue et adaptée de Gavier-Widén et al., 2012.

Épidémiologie des VIA dans la population réservoir

Outre des transmissions de VIA facilitées par le mode de vie, l'écologie et les dynamiques de populations des Anseriformes en favorisent également la circulation au fil des saisons. En effet, la plupart des espèces montrent des comportements migratoires à courte ou longue distances, se dirigeant après la période de reproduction vers des zones d'hivernage via des couloirs migratoires plus ou moins longs et composés de différentes zones humides permettant des haltes migratoires. Les zones d'hivernage étant plus restreintes que les zones de nidification, les couloirs migratoires sont souvent convergents et les migrateurs d'espèces aquatiques variées (Anseriformes et Charadriiformes) se concentrent progressivement au niveau des sites de halte migratoire en groupes multi-espèces de grande taille, jusqu'à atteindre les zones d'hivernage. On peut ainsi par exemple compter jusqu'à 300-400 000 individus de Sarcelle d'hiver par hectare en hivernage, contre à peine 100 individus en été (Guillemain et al., 2021). Ces concentrations favorisent évidemment les transmissions intra et interspécifiques d'agents infectieux, et le brassage de populations de diverses origines géographiques et espèces favorise les coinfections par différents pools génétiques permettant aux VIA des réassortiments entre sous-types. La transmission infectieuse est d'autant plus facilitée au moment de la migration postnuptiale que les populations se trouvent enrichies d'une part importante de jeunes de l'année (jusqu'à un tiers de renouvellement chez le Canard colvert par exemple) naïfs immunologiquement et plus sensibles aux infections (Latorre-Margalef et al., 2014; Munster and Fouchier, 2009). Cela s'ajoute chez les adultes à la chute naturelle d'immunité pour les VIA suivant le précédent pic de circulation hivernale (Tolf et al., 2013). On observe donc une cyclicité annuelle des prévalences virologiques et séroprévalences pour les VIA dans les populations d'Anseriformes migrateurs réservoirs, et ce dans le monde entier (Gaidet et al., 2012; Hill et al., 2012; Latorre-Margalef et al., 2014; Linnaeus University (SE) et al., 2017; Lisovski et al.,

2018; Onuma et al., 2017) (Figure 6). Cette dynamique saisonnière est probablement aidée (mais non dépendante) par la survie interannuelle de VIA infectieux dans le milieu aquatique au niveau des zones favorables restées fraîches durant l'été (Blagodatski et al., 2021; Breban et al., 2009; Dalziel et al., 2016; Gaidet et al., 2012; Ramey et al., 2022).

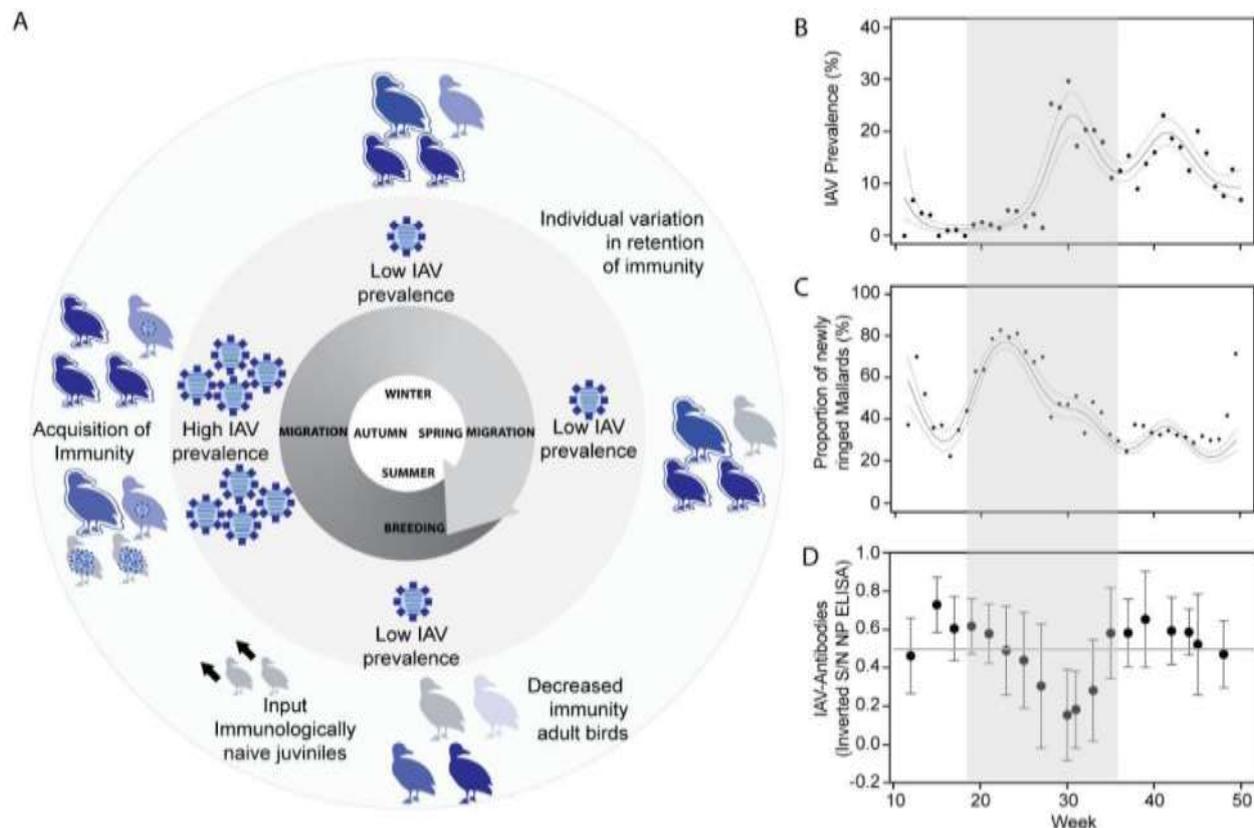


Figure 6 – Mécanismes de dynamique saisonnière des VIAFP chez les canards.

A – Schéma de la dynamique saisonnière cyclique des VIAFP chez les canards colverts, influencée par une entrée d'individus immunologiquement naïfs et par une baisse d'immunité.

B – Prévalence saisonnière des VIAFP.

C – Proportion de canards nouvellement bagués sur un site de halte migratoire en Suède, qui montre un accroissement du nombre jeunes (nouvellement bagués) durant l'été précédant le pic de prévalence.

D – Niveaux saisonniers d'anticorps anti-nucléoprotéine chez les canards en deuxième année d'âge vivant dans une volière, qui montrent la variation individuelle d'immunité, la réaction immunitaire prolongée à la suite de l'infection à l'automne précédent, et la chute des anticorps circulants durant l'été suivie par une réaugmentation après réinfection à l'automne suivant.

Issue de Linnaeus University (SE) et al., 2017, dont graphiques B et C produits par Latorre-Margalef et al., 2014, et graphique D produit par Tolf et al., 2013.

En plus de favoriser les évolutions et réassortiments de nouveaux sous-types viraux, cette circulation massive dans les populations d'Anseriformes migrateurs a été identifiée comme jouant un rôle dans la dispersion régionale et intercontinentale des différents sous-types de VIA (Jeong et al., 2019; Lee et al., 2017; Lycett et al., 2020, 2019; Mine et al., 2019; Sun et al., 2020; The Global Consortium for H5N8 and Related Influenza Viruses, 2016; van der Kolk, 2019; Verhagen et al., 2021). En effet, le portage asymptomatique et prolongé au niveau digestif permet le transport individuel de VIA sur de longues distances (Gaidet et al., 2010). Dans le cas d'un VIAHP qui pourrait éventuellement affecter les capacités de vol d'un individu peu immunisé, ou pour un migrant à courte distance, l'interruption de la migration

au niveau d'un site de halte permettra la transmission à un nouvel hôte qui pourra prendre le relais dans le transport le long du couloir migratoire, et ainsi de suite jusqu'aux sites d'hivernage où les grands rassemblements permettront l'amplification de la circulation. Durant l'hiver, des déplacements plus déstructurés au gré des ressources alimentaires pourront accentuer ce brassage et cette dispersion d'une population réservoir à l'autre et d'une région à l'autre (Guillemain et al., 2021; Linnaeus University (SE) et al., 2017). Les mouvements opportunistes de l'avifaune aquatique suivant des précipitations importantes ont ainsi été mis en évidence comme facteurs de risque d'introduction en élevages de volailles en Australie (Ferenczi et al., 2021). En plus de permettre la diffusion géographique des VIA, ces brassages cycliques de populations réservoirs sont autant d'occasions pour le réassortiment et la diffusion de nouveaux variants potentiellement hautement pathogènes pour les oiseaux, voire zoonotiques (Taubenberger and Morens, 2009; Yamaji et al., 2020). Ce fut par exemple le cas pour le VIAHP H5N8 de clade 2.3.4.4b apparu en 2016 en Asie du Nord et centrale où les couloirs migratoires asiatiques, africains et européens se rencontrent (Beerens et al., 2017; Fusaro et al., 2019; Lee et al., 2017; Lycett et al., 2020). Au gré des brassages de populations, ce clade 2.3.4.4 a émergé par mutations et recombinaisons successives de sous-types VIAFP et VIAHP (Figure 7), devenant aujourd'hui plutôt un complexe H5Nx avec une HA hautement pathogène combinée à différents sous-types de NA (N1, N2, N6, N8 notamment) (Lee et al., 2017; Shi and Gao, 2021; Sun et al., 2020; Yang et al., 2017).

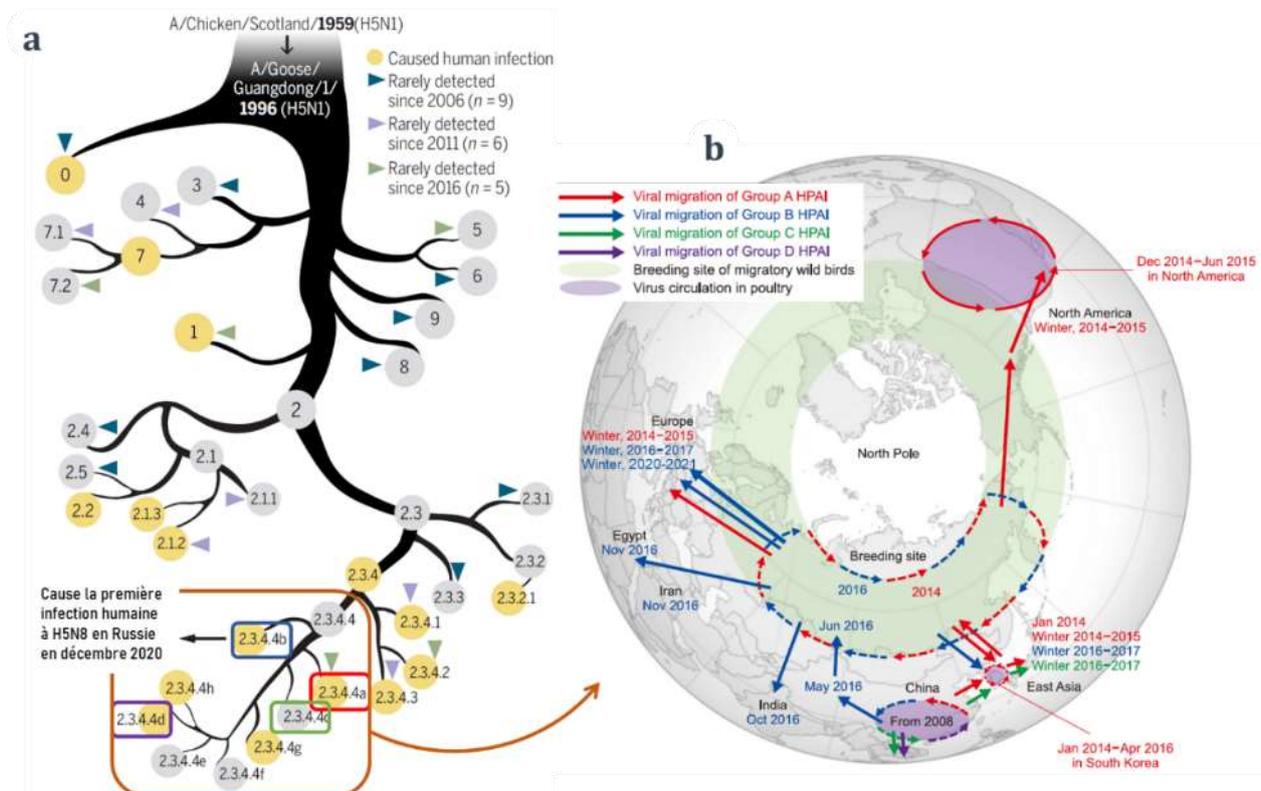


Figure 7 - Phylogénie et dissémination des VIAHP H5Nx.

a – Phylogénie simplifiée et caractère zoonotique reconnu des clades et sous-clades (identifiés par le code au centre de chaque cercle), au sein du sous-type H5. *Issue et adaptée de Shi & Gao, 2021.*

b – Projection depuis le pôle Nord montrant les dynamiques de circulation et de dissémination des différents sous-clades par les mouvements migratoires de l'avifaune aquatique. *Issue et adaptée de Lee et al., 2017.*

Épidémiologie des VIA en élevages

Cependant, les migrations de l'avifaune aquatique ne sont pas seules en cause dans la diffusion intercontinentale des VIA, et le rôle du commerce international de volailles (Hautefeuille et al., 2020; van der Kolk, 2019) et d'autres oiseaux captifs (Lee et al., 2019) doit aussi être considéré. En effet, le spectre d'hôtes des VIA est large, et particulièrement chez les oiseaux qui représentent une classe taxonomique extrêmement riche et diverse (del Hoyo et al., 1992; Oliveros et al., 2019; Pigot et al., 2020). La circulation globale des VIA dans le réservoir aquatique et leur mode de transmission environnementale (aquatique en particulier) offre des occasions fréquentes de passage à d'autres espèces aviaires non réservoirs (Ellis et al., 2021; Forrest et al., 2010; Yamamoto et al., 2013). Ce type de transmission est nommée « spillover » puisqu'elle se produit du réservoir naturel vers des hôtes dits accidentels car culs-de-sac épidémiologiques où la circulation virale ne serait pas maintenue indépendamment. Parmi ces hôtes accidentels, les volailles de l'ordre des Galliformes (poulets, dindes, pintades, cailles) puis l'avifaune non aquatique figurent en première ligne pour l'exposition aux VIA, puisque taxonomiquement et/ou écologiquement proches des Ansériformes. Ils sont dits sympatriques. Chez ces espèces, dites terrestres en opposition au compartiment aquatique, l'infection et l'excrétion virales sont brèves de l'ordre de deux à cinq jours, et la durée d'immunité courte de l'ordre de deux mois au plus (Bosco-Lauth et al., 2019; Ellis et al., 2021; Nemeth et al., 2010). Ceci entraîne naturellement des prévalence faibles dans ces populations (Caron et al., 2017; Munster et al., 2007; Shriner and Root, 2020; Slusher et al., 2014; Veen et al., 2007). Concernant les volailles galliformes, et en particulier le poulet, l'infection par un VIA (HP ou FP) entraîne en général des lésions plus sévères voire une mortalité plus importante que chez le canard, ainsi qu'une moindre activation de l'immunité (Jackwood et al., 2010), et la protection croisée entre VIAFP et VIAHP est absente (Bessière et al., 2021; Swayne, 2008).

Malgré la moindre capacité individuelle à entretenir la circulation de VIA chez les Galliformes, celle-ci est compensée par l'immense population répandue mondialement que représentent les volailles d'élevage (FAO, 2013). En effet, les conditions de vie en groupe concentré, en intérieur, et avec des sources d'abreuvement et d'alimentation communes font que les VIA se transmettent très rapidement au sein d'un lot une fois introduits. Le nombre de reproduction basique (nombre moyen d'infections secondaires par individu infecté) y atteint ainsi des valeurs entre 2 et 20 selon les conditions d'hébergement, l'espèce hôte et la souche virale (Bos et al., 2009; Gonzales et al., 2012; Ssematimba et al., 2019; Tiensin et al., 2007; Tsukamoto et al., 2007; Vergne et al., 2021). Chaque lot infecté représente alors un milieu de culture immense pour les VIA, permettant l'amplification massive et autant d'occasions de mutations de souches faiblement ou hautement pathogènes. Une grande partie des élevages mondiaux sont familiaux ou semi-commerciaux, avec de faibles niveaux de biosécurité qui favorisent les introductions virales. Outre les basses-cours familiales qui reprennent de l'ampleur dans les pays occidentaux (Ayala et al., 2020; Souvestre et al., 2021), les systèmes d'élevage dits villageois avec mixité d'espèces et d'âges en

liberté totale ou partielle sont prépondérants dans un grand nombre de régions comme en Asie du Sud et en Afrique (Conan et al., 2012; FAO, 2013). Or on sait que ces systèmes sont très favorables à la circulation d'agents infectieux variés y compris les VIA car la maîtrise sanitaire y est faible voire absente et le modèle prédispose à l'exposition infectieuse régulière (Ayala et al., 2020; Conan et al., 2012; Halvorson, 2008; Pauly et al., 2019; Soos et al., 2008; Souvestre et al., 2019). Ces systèmes d'élevage ne sont pas déconnectés du compartiment commercial, puisque les animaux sont généralement déplacés, vendus, échangés dans des marchés vivants (FAO, 2013). Là, le brassage infectieux entre élevages voire avec de la faune sauvage capturée ou chassée est fortement favorable à la diffusion et potentiellement aux réassortiments de VIA (Gilbert et al., 2017; Halvorson, 2008; Li et al., 2019; Wan et al., 2011). En Asie du Sud-Est s'ajoutent à ces basses-cours semi-commerciales des élevages de canards de chair déplacés de rizière en rizière. Ces systèmes d'élevages commerciaux semi-intensifs sont particulièrement propices au maintien des VIA (Beaudoin et al., 2014; Meyer et al., 2017). Globalement, cette diversité d'élevages de volailles extensifs et à faible niveau de biosécurité permet l'entretien d'une circulation de VIA. Ceci d'autant plus que ces productions gagnent du terrain sur des zones humides et que des Anseriformes domestiques y sont associés (Gilbert et al., 2017; Paul et al., 2014).

Avec les élevages semi-commerciaux et extensifs ainsi décrits cohabitent enfin des élevages commerciaux intensifs (FAO, 2013). Ceux-ci sont généralement associés à des hébergements en intérieur strict, ainsi qu'à de hauts niveaux de biosécurité qui les prémunissent mieux de toute introduction infectieuse par voies directes ou indirectes. Des systèmes en bandes uniques séparées par vide sanitaire garantissent le statut sanitaire de chaque lot. Mais ce risque d'introduction n'est jamais nul car tout matériel, personnel, ou encore introduction d'animaux suite à leur transport peut introduire des agents infectieux dans un bâtiment. D'autant plus si l'environnement est contaminé de manière diffuse par la pression infectieuse des volailles en semi-liberté ou de l'avifaune (Halvorson, 2008; Hautefeuille et al., 2020). De plus, tous les élevages intensifs ne sont pas sur des modèles strictement confinés et l'application de la biosécurité peut y être variable (Delpont et al., 2021; Guimarães et al., 2016; Ssematimba et al., 2013), augmentant le risque d'introduction dans le compartiment commercial via l'avifaune directement ou via l'environnement (Central Veterinary Institute, Wageningen University et al., 2017; Gonzales et al., 2013; Koch and Elbers, 2006). Les flux d'animaux vivants et de matériel spécialisé partagé au sein de filières commerciales intégrées et interconnectées deviennent souvent ensuite la voie de transmission essentielle entre élevages (Briand et al., 2021; Guinat et al., 2020b; Halvorson, 2008; Hautefeuille et al., 2020).

Globalement, le volume croissant d'hôtes et la diversité interconnectée qui composent les élevages de volailles, en particulier en Asie du Sud, représentent un immense réservoir secondaire pour l'amplification, la mutation, le réassortiment et l'émergence de nouveaux VIA à l'interface avec le réservoir sauvage (FAO, 2013; Gilbert et al., 2017; Paul et al., 2014).. Ce rôle a été démontré

systematiquement dans les derniers phénomènes d'émergences et réémergence de VIAHP H5Nx du clade 2.3.4 (Gilbert et al., 2017; Lee et al., 2017; Yang et al., 2017). Le compartiment domestique vient ainsi amplifier et faire évoluer les VIA en résonance avec le réservoir aquatique sauvage à l'échelle intercontinentale au gré des mouvements migratoires de ce dernier (Figure 7). Ces phénomènes globaux d'échanges alternatifs de VIA entre compartiments sauvages et domestiques prouvent que ceux-ci ne sont pas étanches, et que des transmissions infectieuses dites « spillback » (aussi appelé « reverse spillover ») des oiseaux domestiques vers les oiseaux sauvages se produisent fréquemment. Au niveau du Sud-Est asiatique, celles-ci sont attestées par l'étude de la phylogénie des VIA successivement partagés entre avifaune aquatique et volailles (Yang et al., 2019).

Transmissions des VIA entre élevages

Pourtant, dans de nombreux contextes où la phylogénie montre des échanges de VIA entre élevages et réservoir sauvage, la voie de transmission ne peut pas être avérée du fait d'une absence de lien direct ou indirect évident : absence d'accès extérieur pour les volailles, absence d'observation d'oiseaux aquatiques en périphérie de l'élevage, mesures de biosécurité maîtrisées (Li et al., 2018). Bien souvent et bien plus probablement, les liens de filières (animaux, matériel, personnel) peuvent être incriminés ou fortement suspectés dans les introductions en élevages (Briand et al., 2021; Central Veterinary Institute, Wageningen University et al., 2017; Guinat et al., 2020b, 2020b, 2019, 2018; Halvorson, 2008; Hautefeuille et al., 2020). Un certain risque lié à la transmission aérienne de particules infectieuses a été également incriminé et investigué pour la diffusion de VIA entre élevages (Corzo et al., 2013; Scoizec et al., 2018; Torremorell et al., 2016; Ypma et al., 2013), mais ce risque est jugé négligeable concernant l'introduction en élevage depuis la faune sauvage (Wageningen Bioveterinary Research and Elbers, 2021). Aussi, et suite aux observations fréquentes faites par les éleveurs et chercheurs sur les élevages, le rôle de l'avifaune commensale (aussi appelée synanthropique ou péri-domestique) dans l'introduction ou le maintien de la circulation de VIA a aussi été souvent proposé (Central Veterinary Institute, Wageningen University et al., 2017; Gilchrist, 2005; Veen et al., 2007).

Épidémiologie des VIA dans l'avifaune terrestre

L'avifaune terrestre (ordres des Passériformes, Columbiformes, Accipitriformes entre autres), occupe l'essentiel des niches écologiques en dehors des zones humides réservoirs, notamment en périphérie directe de celles-ci (Caron et al., 2014; Oliveros et al., 2019; Pigot et al., 2020). Certaines espèces, dont certaines commensales des élevages, sont adaptées à divers milieux et fréquentent notamment des milieux partagés avec les Ansériformes et leurs VIA (Burns et al., 2012; Caron et al., 2014). On connaît aussi les grandes distances de déplacement individuel dont sont capables certaines espèces de l'avifaune

terrestre, que ce soit lors de dynamiques journalières pour s'alimenter et se reposer, ou lors de migrations saisonnières (Newton, 2007a; Veen et al., 2007). Rappelons cependant que tout comme les Galliformes domestiques, ces espèces terrestres sont relativement peu réceptives mais sensibles aux VIA. Elles sont considérées comme des hôtes accidentels, qui seraient plutôt victimes de phénomènes de « spillover » brefs depuis les réservoirs que responsables d'une circulation virale entretenue. Cette sensibilité s'observe en particulier vis-à-vis des VIAHP (Bosco-Lauth et al., 2019; Brown et al., 2009; Fujimoto et al., 2015). Cela conforte leur rôle de cul-de-sac épidémiologique, puisqu'un oiseau infecté aura plus de chances d'être exclu de la chaîne de transmission par l'effet des symptômes cliniques qu'il subira, entraînant son éloignement du groupe ou sa mort (évolution clinique ou prédation facilitée) (Lebarbenchon et al., 2010).

Mais si le portage et l'excrétion sont brefs, et généralement en moindre quantité étant donnée la petite taille individuelle de l'avifaune terrestre dominée par les Passériformes (Pigot et al., 2020), la fenêtre de quelques jours pourrait tout de même permettre des transmissions infectieuses ponctuelles lors d'occasions particulièrement favorables aux contacts directs et indirects. En particulier, la visite des parcours extérieurs d'un lot de volailles en plein air infecté pourrait permettre la transmission de VIA par voie environnementale au niveau des eaux stagnantes en flaques (Germeraad et al., 2020). Évidemment tout élément d'attraction particulier pour l'avifaune sur un élevage expose plus fortement celle-ci à une éventuelle transmission provenant des volailles par les particules aéroportées, par les plumes ou par d'autres matières infectieuses telles que des cadavres (Gilchrist, 2005). Ces mêmes éléments attractifs sur un site voisin favoriseraient alors la visite de l'oiseau commensal ayant visité le précédent élevage infecté. Cette interconnexion pourrait ainsi faire de l'avifaune commensale un relais biologique ou mécanique pour les VIA, et éventuellement entretenir localement une circulation virale entre réservoirs ou avec les élevages en complément des transmissions directes ou environnementales par les Ansériformes. Ceci constitue le concept de « bridge host » ou hôte relais qui est apparu ces dernières années (Caron et al., 2015, 2014; Shriner and Root, 2020; Veen et al., 2007). Pourtant, le rôle seul des hôtes relais pour l'épidémiologie des VIA est encore peu élucidé, et ce même en contexte de circulation avérée dans un compartiment aviaire voisin (Anses, 2016; Grear et al., 2017; Shriner et al., 2016; Verhagen et al., 2015). Les études de surveillance infectieuse portant localement sur ce type d'hôtes sont bien peu nombreuses en comparaison de l'étude de l'avifaune aquatique. En outre, la plupart sont peu sensibles puisque basées sur de faibles effectifs d'oiseaux pour chaque espèce prélevée, ne ciblant parfois pas les espèces les plus à risque de contacts avec le compartiment infecté. Ou bien ces études sont mises en œuvre avec un délai trop long par rapport à la très courte fenêtre de détection optimale (estimée pour rappel chez les Passériformes à environ deux mois pour la sérologie et cinq jours pour l'excrétion) (Caron et al., 2017; EFSA et al., 2017). Il semble donc essentiel d'éclaircir ce point étant données les nombreuses et fréquentes observations d'espèces commensales sur les élevages de volailles dans divers contextes

À ces menaces des VIA sur les populations sauvages et domestiques aviaires, s'ajoute un risque de « spillover » vers des hôtes mammifères divers. En effet, l'affinité imparfaite et variable des souches de VIA pour les récepteurs cellulaires leur permet parfois de franchir les barrières d'espèces plus largement, à la faveur éventuelle d'une mutation adaptative préalable (Kuiken et al., 2006). C'est donc un grand nombre de mammifères qui peuvent être infectés par des VIA, avec certains sous-types plus adaptés voire devenant par la suite totalement adaptés à ces nouveaux hôtes (Long et al., 2019). Les VIA circulent donc largement et de manière très évolutive au sein d'un écosystème complexe d'hôtes, entre réservoirs et hôtes accidentels (Figure 8). On remonte ainsi par phylogénie (Chauhan and Gordon, 2021) ou par typage sérologique (Schüleïn et al., 2020) à de nombreux « spillovers » de VIA aviaires vers des porcs ou sangliers. Or le Cochon est une espèce particulière en ce qu'elle présente les acides sialiques propres aux oiseaux en $\alpha 2,3$ en plus des acides sialiques de mammifères en $\alpha 2,6$. Cela en fait un hôte parfait pour les mutations et réassortiments d'adaptation à l'infection humaine, comme l'a montré l'exemple de l'émergence de grippe porcine à H1N1 en 2009 au Mexique recombinant de VIA adaptés aux porcs et aux oiseaux (Taubenberger et al., 2019). Porcs et volailles représentent aujourd'hui la vaste majorité des animaux d'élevage, dont une grande partie en production de type villageoise ou basse-cour (FAO, 2013). Tous ces animaux domestiques en forte proximité quotidienne avec les humains et chez qui les VIA circulent abondamment de manière sous-détectée représentent donc un risque zoonotique majeur. En atteste la forte pression d'infection aux VIA révélée par la détection d'anticorps très fréquente chez les populations humaines exposées en Asie du Sud : des sous-types H5, H6, H7 et H9 (Ahad et al., 2014; Huang et al., 2015; Xin et al., 2015). Le risque zoonotique par contact répété et rapproché avec les oiseaux sauvages a été étudié mais ne s'est en revanche pas avéré positif (Shafir et al., 2012). À ce jour, s'ils prennent une allure épidémique dans la concentration spatio-temporelle des cas, ces « spillovers » zoonotiques restent circonscrits à des modes de vie très exposés (ECDC, 2021; Fournié et al., 2017; Pyankova et al., 2021) et autour des zones où les VIA circulent abondamment dans les réservoirs aviaires. Ainsi, aucune transmission inter-humaine de virus aviaires n'est avérée depuis probablement l'émergence de grippe de 1918 (Taubenberger et al., 2019). On dénombre tout de même un total de 455 morts pour 862 cas diagnostiqués dus à une infection par le VIAHP H5N1 de 2003 à 2020, l'essentiel en Asie du Sud-Est et en Egypte (WHO, 2020). Les cas humains symptomatiques et la mortalité dus aux H5Nx ou autres H7 (Fouchier et al., 2004) et H9 (Carnaccini and Perez, 2020) sont ainsi nombreux et régulièrement rapportés dans l'actualité. Ils soulèvent les craintes quant à la prochaine pandémie à l'occasion de quelques mutations adaptatives de ces virus, ou d'autres VIA (Blagodatski et al., 2021; Liu et al., 2021; Shi and Gao, 2021; Taubenberger and Morens, 2009; Yamaji et al., 2020; Yang et al., 2017). Il convient donc de maintenir en alerte les systèmes de surveillance épidémiologiques mondiaux vis-à-vis des VIA, et de continuer à améliorer les connaissances sur l'ensemble de l'écosystème complexe formé par les différents sous-types viraux, les espèces hôtes et leur environnement naturel et économique.

iii. Détection directe et indirecte des VIA

La surveillance et le contrôle des VIA passe avant toute chose par une détection fiable et efficace. Ces aspects seront abordés ici uniquement pour les hôtes aviaires.

Suspicion clinique

En cas d'affection symptomatique, une première phase avant la détection est le diagnostic via la suspicion clinique. Comme nous l'avons évoqué précédemment, le tropisme tissulaire et la pathogénicité de chaque souche de VIA sont variables selon des facteurs d'espèce et individuels de leur hôte, ainsi que par la voie et la charge virale d'inoculation. En conséquence, les signes d'appel peuvent être variés. Tandis que les Ansériformes ne sembleront pas affectés, chez les Galliformes sensibles les VIAFP de tropisme muqueux causeront typiquement des affections respiratoires, digestives, urinaires et reproductives légères à modérées. Ces affections seront parfois amplifiées par d'éventuelles surinfections, et associées à une baisse de l'ingestion alimentaire et à une chute de ponte (Swayne, 2008). Au contraire, les VIAHP de tropisme systémique provoquent des défaillances multiorganiques et sont définis par les signes sévères qu'ils provoquent chez les Galliformes et autres espèces terrestres. L'infection à VIAHP peut s'exprimer souvent par une mortalité aigüe et massive sans signes précurseurs, ou bien précédée par différents signes respiratoires, neurologiques, digestifs, vasculaires : écoulements oculaires et oropharyngés, toux, dyspnée, gonflement des sinus et de la tête, incoordination des mouvements, apathie générale avec baisse de l'ingestion, diarrhée, ou encore cyanose des zones non plumées (Swayne, 2008; Swayne and Suarez, 2000). Les Ansériformes sont variablement atteints cliniquement par les VIAHP. Ils sont souvent asymptomatiques ou très légèrement symptomatiques mais parfois montrent certains des signes sévères évoqués ci-dessus, selon leur statut immunitaire et la pathogénicité de la souche. Le jeune âge et les facteurs environnementaux (confinement, stress, coinfections) peuvent accentuer la pathogénicité chez les Ansériformes domestiques (Scientific Task Force on Avian Influenza and Wild Birds et al., 2016). Chez les individus sauvages une mortalité peut être détectée à la faveur du jeune âge ou des fluctuations d'immunité associées aux cycles migratoires (Tolf et al., 2013; Yin et al., 2021). On peut noter aussi une grande variation du tropisme tissulaire et donc des signes associés d'une espèce ansériforme à l'autre, les canards étant souvent plus résistants que les oies (Perkins and Swayne, 2002), comme le montre aussi la mortalité observée en périodes épidémiques (EFSA et al., 2021a).

Détection et identification du phénotype viral

Suite à l'observation de signes ou à la découverte de cadavres, le diagnostic peut ensuite s'appuyer sur l'autopsie et l'histologie par identification des lésions et du tropisme tissulaire (Swayne, 2008). Mais ces éléments diagnostiques restent non pathognomoniques des VIA, et des tests de confirmation par isolement ou détection du virus sont donc nécessaires en second lieu. Classiquement à partir de tissus infectés, des marquages antigéniques in situ peuvent être réalisés, révélant la distribution tissulaire des

VIA présents. Pour divers types de prélèvements, le diagnostic se faisait historiquement par isolement et amplification sur œufs embryonnés de poule, avant d'être caractérisés par des tests simples d'hémagglutination (tests HA) (Becker, 1966; Pereira et al., 1965). En effet, les VIA sont capables d'agglutiner les hématies grâce à la fixation des protéines HA virales aux acides sialiques cellulaires, formant ainsi un réseau diffus en suspension tandis qu'un caillot d'hématies se formerait sans VIA. Mais cette caractéristique est partagée par d'autres virus dits hémagglutinants, y compris causant des signes similaires chez les oiseaux comme les orthoavulavirus (dont virus de la maladie de Newcastle). Cette méthode de diagnostic a donc été complétée par d'autres plus spécifiques telle l'immunodiffusion sur gel d'agar (AGID) ou l'identification directe de sous-types de HA et NA. L'isolement et amplification sur œuf suivi de test HA est cependant encore utilisée en recherche sur échantillons mono-infectés. La propriété d'hémagglutination des VIA est aussi exploitée pour l'identification des sous-types en présence, lors de tests d'inhibition de l'hémagglutination (IHA) ou de la neuraminidase (IN). Ceux-ci consistent à mélanger une solution du virus isolé à identifier avec le sang d'animaux immunisés contre tel ou tel sous-type, les anticorps spécifiques fixant les HA ou NA virales et inhibant ainsi leur fixation aux hématies (Becker, 1966; OIE, 2021b). Mais si ces tests restent valables fondamentalement, ils n'en sont pas moins longs et fastidieux du fait de la nécessité de préalablement isoler et cultiver le virus (soit au moins deux à trois jours), à laquelle s'ajoutent les difficultés techniques et logistiques liées à la manipulation de matériel biologique infectieux qui doit être réalisée a minima dans un laboratoire confiné de niveau 2, et de niveau 3 si la présence d'une souche hautement pathogène est suspectée (DGAL et al., 1994). Ils offrent de plus peu de détails sur l'identité de souches permettant d'établir une phylogénie ou de définir un caractère hautement ou faiblement pathogène (OIE, 2021b). Ce caractère était auparavant défini par les paramètres épidémiologiques mesurés lors d'infections expérimentales sur jeunes poulets (OIE, 2021b; Swayne and Suarez, 2000), ce qui est tout autant fastidieux en plus de poser d'évidents problèmes logistiques et éthiques en tant que méthode de diagnostic de routine. Des méthodes alternatives étaient donc nécessaires, et la caractérisation du type de pathogénicité s'est donc tournée vers l'identification du motif mono ou polybasique du site de clivage de la protéine HA. Notamment, ce motif a été caractérisé par des techniques de séquençage génétique, qui ont été rapidement étendues à l'identification du sous-type de HA et NA, et à la détection de VIA en général (Fouchier et al., 2000; OIE, 2021b).

Détection et identification moléculaire

Grâce à la démocratisation et la simplification progressive des processus et du matériel nécessaires, les techniques de biologie moléculaire se sont en effet naturellement étendues à l'ensemble des étapes de détection des VIA. Ces techniques procèdent par recherche directe et spécifique de l'ARN viral, par réaction de rétro-transcription et polymérisation en chaîne (RT-PCR). Elles offrent de nombreux avantages, dont une grande sensibilité ne nécessitant pas une étape initiale d'isolement et culture virale

(Munster et al., 2009). La rapidité du processus entre l'arrivée du prélèvement au laboratoire et le résultat de diagnostic ne cesse de croître par optimisation et automatisation des différentes étapes, en particulier grâce à l'usage des RT-PCR en temps réel ou quantitatives (RT-qPCR). Cette technologie permet en effet une lecture du résultat pendant l'amplification et non après une étape supplémentaire de révélation par électrophorèse sur gel, et la charge virale d'un échantillon analysé peut être quantifiée en valeur relative et absolue. Enfin, la biologie moléculaire permet de s'affranchir des barrières d'espèces dans le cas de virus à large spectre d'hôtes, ce en quoi les méthodes basées sur la culture virale ou les immunoréactions étaient limitées : souches cellulaires spécifiques pour la culture, anticorps marqueurs spécifiques (Fouchier et al., 2000). Les cibles standard des RT-PCR utilisées actuellement pour la détection et l'identification sont : (i) une portion du gène de matrice (gène M) relativement conservée pour la détection spécifique de l'ARN de tous les VIA (Fouchier et al., 2000) ; (ii) une portion de séquence de HA spécifique de chaque sous-type d'intérêt, dont le résultat sera de type confirmation/exclusion lorsqu'on veut rapidement un diagnostic par exemple de H5 ou H7 qui sont potentiellement des souches hautement pathogènes ; (iii) les gènes HA et NA entiers, soumis à une pression de sélection antigénique donc variables, dont les produits d'amplification seront ensuite séquencés pour identification du sous-type et du caractère de pathogénicité (séquence du site de clivage de HA), ainsi que l'ensemble des autres gènes pouvant être séquencés pour affiner la phylogénie (Hoffmann et al., 2001) ; (iv) enfin toute séquence de VIA d'intérêt spécifique dans un contexte particulier (par exemple recherche d'une nouvelle souche virale) peut être théoriquement recherchée par adaptation d'amorces et mise au point de RT-PCR spécifique, grâce à l'usage des bases de données génétiques publiques (par exemple GenBank [<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>] ou GISAID [<http://www.gisaid.org/>]) et d'outils de bioinformatique grand public (par exemple primer-BLAST connecté à GenBank (Ye et al., 2012)). La plupart des laboratoires d'analyses vétérinaires travaillant pour la filière volaille disposent ainsi aujourd'hui d'un appareil de RT-qPCR et de kits commerciaux de réactifs pour l'analyse rapide, ce qui permet d'effectuer une première recherche de gène M (tous VIA) et souvent aussi de H5 et H7 (sous-types dont des souches peuvent être hautement pathogènes) si l'analyse gène M est positive. Les phases plus techniques et délicates de séquençage (donc pathogénicité) et sous-typage sont ensuite généralement effectuées par des laboratoires de recherche ou de référence pour le diagnostic, le laboratoire national de référence (LNR) pour l'influenza en France étant situé à l'Anses de Ploufragan dans les Côtes d'Armor. En revanche, la détection d'ARN viral ne garantissant pas la détection de VIA infectieux, ou face à la nécessité de disposer de souches de VIA bien identifiées et en grande quantité initiale, l'isolement et la culture resteront d'usage ponctuel et ciblé en laboratoire de recherche ou LNR.

Prélèvements pour la détection directe de VIA

Ces analyses de détection directe du virus ou de son matériel génétique pourront s'effectuer sur divers types de prélèvements, dépendant du contexte et des besoins de diagnostic. Suivant le cours du processus diagnostique sur un foyer symptomatique, les animaux soumis à autopsie pourront fournir des échantillons de tout organe cible de VIA, permettant de décrire le tableau pathologique et le tropisme tissulaire (Swayne, 2008). Lors de suspicion d'IAHP, les pulpes de plumes pourront compléter l'éventail des organes prélevés (Gaide et al., 2021). En complément et sur animal mort ou vivant, des écouvillons trachéaux ou oropharyngés, ainsi que cloacaux, permettront de mieux caractériser la voie d'excrétion virale (OIE, 2021b). Il est recommandé de prélever les deux types d'écouvillons car les résultats peuvent être distincts et complémentaires (Gaidet et al., 2012; Latorre-Margalef et al., 2014; OIE, 2021b). Dans le cadre d'études de surveillance épidémiologique où l'accès à des cadavres ou à des animaux vivants n'est pas possible ou trop invasif, il sera possible d'obtenir des prélèvements dits environnementaux variés. Ce sera par exemple le cas si on veut étudier l'avifaune libre dont la capture demande des compétences particulières et une logistique complexe, notamment sur des espèces souvent fragiles dont le dérangement pourrait provoquer des perturbations de population (Blagodatski et al., 2021; FAO, 2007; Hoyer et al., 2010). La collecte de fèces fraîches est la méthode alternative la plus fréquemment utilisée (Coombe et al., 2021), car elle donne des résultats de RT-PCR et d'isolement viral équivalents à ceux issus d'un écouvillon cloacal (Latorre-Margalef et al., 2016), en particulier chez les Ansériformes à réplication digestive. Cette collecte est aussi relativement simple, nécessitant peu de matériel (gants, écouvillons et tubes de conservation) et permettant d'obtenir rapidement un grand nombre d'échantillons. Les Ansériformes et d'autres espèces grégaires (Charadriiformes, Ardéidés, Sturnidés, Corvidés) se reposent généralement en groupes au sol ou sur des perchoirs, dont l'accès est libre ou soumis à simple autorisation des propriétaires du site. De plus, ce type de prélèvement a l'avantage de pouvoir être traité de la même façon que les écouvillons oropharyngés et cloacaux pour l'analyse au laboratoire. En revanche, le lien entre le prélèvement et l'individu ne pouvant pas être fait, peu de conclusions écologiques robustes pourront être tirées (Coombe et al., 2021) et seule l'espèce sera souvent présumée par la fréquentation observée du site ou bien identifiée par séquençage de l'ADN hôte par méthode de « barcoding » (Lee et al., 2010; Torrontegi et al., 2019) (voir le paragraphe *Détection moléculaire de l'avifaune* – p 63). Sur les mêmes reposoirs où l'avifaune se concentre, on pourra prélever les plumes éliminées lors de la toilette pour recherche de VIAHP en particulier (Gaide et al., 2021; Karunakaran et al., 2019). D'autres prélèvements plus à proprement parler environnementaux, comme l'eau (Numberger et al., 2019) ou même les sédiments (Densmore et al., 2017; Numberger et al., 2019) peuvent permettre de détecter des VIA dans les zones où l'avifaune est particulièrement concentrée et où la matière n'est pas trop brassée (eaux stagnantes). L'analyse qui en découle est évidemment purement indicatrice d'un statut collectif de la population fréquentant le site. Dans le contexte d'un élevage, on peut aussi réaliser des prélèvements environnementaux de type chiffonnettes de surfaces (Spekreijse et al., 2013;

Torremorell et al., 2016), concentration de particules aéroportées (Scoizec et al., 2018; Torremorell et al., 2016) ou eaux de surface (Germeraad et al., 2020). Ces prélèvements environnementaux fourniront des informations complémentaires aux prélèvements sur animaux, permettant d'évaluer un cumul spatio-temporel de charge virale et les voies de contamination environnementale vers et depuis les animaux d'élevage. Toutes ces méthodes de prélèvements environnementaux étant sujettes à contamination par des inhibiteurs de PCR (enzymes, acides humiques, sels minéraux et ions) et menant à une dilution importante des ARN cibles de VIA, elles requièrent des traitements particuliers spécifiques à chacune afin d'optimiser les résultats d'analyse (Coombe et al., 2021; Densmore et al., 2017; Hinlo et al., 2017; Numberger et al., 2019). À cause des effets de dilution et de potentielles contaminations bactériennes, l'isolement viral sur ce type de prélèvements sera peu sensible, ce qui en limite l'usage selon les objectifs recherchés. Ainsi, l'usage parallèle de divers types de prélèvements complémentaires peut être recommandé s'ils permettent de répondre aux questions de l'étude, les prélèvements environnementaux venant par exemple lisser la fluctuation de l'efficacité de captures pour atteindre les objectifs de taille d'échantillon minimale (Blagodatski et al., 2021; FAO, 2007; Hoyer et al., 2010; Latorre-Margalef et al., 2014; Pannwitz et al., 2009). Pour tous ces prélèvements destinés à la recherche directe de VIA ou de son ARN, leur conservation sur le terrain puis au laboratoire demande des précautions particulières. En effet, dans un objectif de maximiser la sensibilité de la détection et en particulier de l'isolement de VIA, une préservation optimale du matériel viral est nécessaire (Munster et al., 2009).

Détection indirecte des infections à VIA

Sur animal sain ou asymptomatique, en particulier dans le cadre d'études de surveillance épidémiologique, la recherche directe du virus ou de son matériel génétique peut être complétée par les méthodes indirectes détectant la présence d'anticorps spécifiques : les méthodes sérologiques. Quelle que soit l'espèce, un oiseau ayant été effectivement infecté par un VIA produit des anticorps contre les protéines virales 10 à 15 jours en général après l'infection initiale (Ellis et al., 2021; Nemeth et al., 2010; Segovia et al., 2017; Swayne, 2008). La recherche d'anticorps est donc valable pour la recherche d'infections subcliniques ou passées à VIAFP, ou à VIAHP chez un hôte résistant, mais une affection mortelle à VIAHP n'aura généralement pas eu le temps de mener à une production d'anticorps. Les méthodes reconnues pour l'analyse sérologique sont l'IHA et l'IN évoquées plus haut, mais cette fois en utilisant le sang de statut inconnu mélangé à des souches virales de sous-types connus isolées en laboratoire. Les méthodes d'immunoabsorption par enzyme liée (ELISA, pour « enzyme-linked immunosorbent assay ») permettent également la détection d'anticorps circulants dans le sérum, avec en outre des kits commerciaux validés qui sont rapides et simples d'utilisation (OIE, 2021b). Les ELISA peuvent cibler des anticorps dirigés contre divers antigènes viraux : les protéines NP ou M pour tous types de VIA, les protéines HA ou NA de sous-types spécifiques pour identifier le VIA. Les méthodes

basées sur la compétition entre anticorps (ELISA de compétition) permettront de s'affranchir de la spécificité d'hôte et d'avoir ainsi un test dit multi-espèces. De plus le résultat sera semi-quantitatif, comparable pour un même protocole sur même espèce cible. Si l'espèce hôte est en théorie peu importante pour la validité du test ELISA de compétition, les kits commerciaux restent généralement validés pour une variété très limitée d'espèces (volaille galliforme et ansériforme majoritairement). Ainsi leur déploiement sur échantillons d'avifaune demande quelques procédures de vérification préalables au regard d'autres techniques d'analyses afin d'assurer la pertinence des résultats et d'adapter le seuil de positivité (Arenas et al., 1990; Brown et al., 2010; Pérez-Ramírez et al., 2010). Comme l'analyse se base sur le sérum d'un individu à tester, la sérologie requière d'avoir accès à un prélèvement sanguin, soit sur cadavre frais à l'abattoir ou à l'autopsie, soit sur animal vivant sous contention. Si celle-ci ne pose généralement pas de problème chez les animaux d'élevage, la contention d'animaux sauvages est technique et fastidieuse, nécessitant donc du personnel expérimenté compétent (Blagodatski et al., 2021; FAO, 2007), à laquelle s'ajoute la technique invasive de prélèvement sanguin généralement réalisée sous autorisation particulière et avec des compétences encore différentes (vétérinaire ou formation spécifique) (FAO, 2007).

iv. Contrôle et prévention des VIA en Europe et en France

Mesures de contrôle des VIA

Une fois le diagnostic d'infection par un VIA établi grâce aux outils et méthodes décrits, des mesures de contrôle devront être appliquées dans la mesure du possible afin d'éviter l'expansion du foyer infectieux. Selon la pathogénicité de la souche de VIA en cause, l'espèce infectée et l'extension estimée du foyer, différents niveaux de mesures seront appliqués. Les VIA sont des virus enveloppés, ce qui les rend destructibles par tous types de détergents et désinfectants courants. Ils sont de plus inactivés par différents facteurs physico-chimiques tels que la chaleur, la sécheresse, les rayons ultra-violet, les pH extrêmes (Shahid et al., 2009), bien que les durées de résistance varient parfois d'une souche à l'autre (Terregino et al., 2009). Le nettoyage et la désinfection stricts du matériel et des locaux en contact ou à proximité des animaux infectés sont donc les premiers moyens d'élimination directe, et sont un des piliers de la biosécurité courante en élevage (Delpont et al., 2018; Swayne, 2008). C'est pourquoi les systèmes d'élevage en bande qui permettent un nettoyage-désinfection et un vide sanitaire entre chaque lot sont recommandés pour les volailles commerciales. Outre le matériel servant à l'hébergement et à l'alimentation des animaux, il est aussi nécessaire de traiter le matériel biologique éventuellement contaminé en cours de production et en fin de lot : litière, lisier, ainsi que les surfaces au sol des parcours plein air. Ces matières sont en effet très riches en déjections potentiellement infectieuses, et les VIA sont connus pour y résister plusieurs semaines (Schmitz et al., 2020). Un traitement à la chaux (pH de 10 à 12) permet alors d'inactiver les VIA dans ces matières (Schmitz et al., 2020), qui pourront être jugées non

infectieuses et utilisées comme engrais après un délai d'une semaine, ou bien sans traitement après 60 jours. Mais ces mesures ne sont pas infaillibles. Des VIA fortement infectieux et un risque de laisser de la matière infectieuse sont toujours présents. L'objectif lorsqu'un foyer d'IA est détecté est donc d'isoler et d'éliminer la source principale de contamination environnementale et directe : les animaux infectés et les matières biologiques qui en sont issues. Lorsqu'il s'agit d'un VIAHP classifié ADE par la LSA, ce contrôle devra être radical et urgent (Commission Européenne, 2018). Si rien n'est raisonnablement réalisable en faune sauvage libre pour éteindre un foyer en urgence (Gortazar et al., 2015), les animaux d'élevage et captifs diagnostiqués infectés suite à l'apparition de signes ou suite à une enquête épidémiologique devront être immédiatement claustrés et éliminés (DGAL, 2008; Halvorson, 2008). Les mesures d'urgence consécutives à l'identification d'un foyer d'IAHP peuvent être résumées ainsi (DGAL, 2008) :

- Clausturation des animaux, limitation des mouvements animaux (individus, œufs, viande, plumes, lisier), humains et matériels pour figer la situation et empêcher tout risque de diffusion supplémentaire.
- Déclaration du résultat de diagnostic aux autorités sanitaires pour application des mesures réglementaires en vigueur. La préfecture émet alors un arrêté préfectoral portant déclaration d'infection (APPDI). La notification est réalisée auprès de l'OIE.
- L'APPDI étend l'immobilisation et des mesures de diagnostic-élimination-enquête à l'ensemble des exploitations à risque (lien de filière) ou situées dans la zone réglementée périphérique au foyer.
- Pour l'ensemble des exploitations infectées ou à risque : arrêt de production, élimination sur place ou en abattoir sous conditions sanitaires strictes de tous les animaux sensibles aux VIA détenus sur le site ainsi que de leurs productions (viande, œufs, plumes, lisier), suivis de mesures de nettoyage-désinfection adaptées et renforcées.
- En parallèle des mesures d'élimination, traçage complet des liens épidémiologiques animaux et humains dans les 14 jours précédant la suspicion d'infection, pour cibler au mieux la diffusion potentielle du VIA ce qui permettra une extinction confiante et parcimonieuse du foyer.

Suite à la notification à l'OIE, le pays perd également son statut indemne de VIA, engendrant pour la filière des pertes de marchés pour l'exportation, cela jusqu'à retrouver un statut sanitaire indemne après une surveillance de trois mois ne détectant pas de foyers dans le compartiment commercial (OIE, 2021a). On voit donc que les pertes économiques et l'impact sociétal (abattages massifs préventifs) liés aux épidémies de VIAHP chez les volailles sont de grande ampleur, d'autant plus quand les exploitations affectées sont de grande taille et nombreuses comme lors des derniers épisodes de VIAHP H5N8 en Europe depuis 2016 (EFSA et al., 2021a, 2017). La prévention des VIA et en particulier des épidémies de VIAHP en élevage est donc nécessaire.

Mesures de prévention des VIA

Tout facteur pouvant influencer la dynamique de circulation des VIA doit être pris en compte dans un objectif de gestion intégrée des VIA. Le premier risque à maîtriser est celui de la transmission inter-élevages, les liens de filières (animaux, matériel, personnel) jouant un rôle majeur dans la circulation des VIA (Briand et al., 2021; Guinat et al., 2020a, 2020b; Ssematimba et al., 2013). Les mesures basiques et quotidiennes de biosécurité appliquées aux locaux et au matériel (hébergement et transport) s'appliquent donc prioritairement. Ces mesures sont d'autant plus efficaces et faciles à mettre en place que la configuration des locaux est adaptée, compartimentant les secteurs infectieux et sains, permettant la marche en avant et disposant notamment de sas sanitaires fonctionnels aux accès vers les lots en production (Delpont et al., 2021, 2018; Ssematimba et al., 2013). Ces principes fondamentaux sont généralement moins rigoureusement appliqués sur de petits élevages commerciaux et familiaux, et sur des élevages en plein air (Delpont et al., 2021), et ne sont la plupart du temps pas applicables techniquement sur les basses-cours (Conan et al., 2012; Souvestre et al., 2021). À cela s'ajoute un suivi sanitaire régulier, comprenant la traçabilité des déplacements d'animaux et de leurs produits, celle des traitements préventifs et curatifs, et celle des interventions humaines, qui permettront de rapidement détecter un VIA ou d'identifier les risques de transmission lors des enquêtes épidémiologiques. Ces mesures sanitaires et de biosécurité du quotidien voient différents points rendus obligatoires dans le cadre de la prévention de la circulation de VIA, et notamment vis-à-vis du risque d'introduction par l'avifaune (DGAL, 2021a, 2016a). En effet, l'existence d'un réservoir sauvage écarte toute possibilité d'éradication de l'IAHP et nécessite donc de contrôler les transmissions entre compartiments de l'interface sauvage-domestique (Gortazar et al., 2015; Gortázar et al., 2007). Outre les mesures de base, il est ainsi obligatoire pour les élevages commerciaux de disposer d'un plan de protection contre l'avifaune, limitant l'attractivité du site et l'accès à toute ressource alimentaire ou potentiellement infectieuse. Il est également recommandé d'éliminer tout cadavre d'oiseau sauvage trouvé sur un élevage, car les plumes éventuellement infectées qui s'en dégageraient présentent un risque infectieux même pour des animaux claustrés via les systèmes de ventilation perméables (Wageningen Bioveterinary Research and Elbers, 2021). Les élevages en plein air en particulier sont tenus de protéger l'accès à l'aliment et la boisson des volailles, qui seront distribués en intérieur ou couverts pour en limiter l'accès. En période et zone à risque, les volailles commerciales devront en plus être claustrées en bâtiment et les basses-cours ou gibiers au minimum couverts de filets, limitant au maximum les contacts directs et indirects avec la faune sauvage. La claustration des élevages représente en effet la protection maximale vis-à-vis d'éventuels contacts directs mais aussi indirects (aérosols et poussières) avec l'avifaune réservoir (Wageningen Bioveterinary Research and Elbers, 2021). Ces contextes de niveau de risque élevé s'accompagnent d'une élévation du niveau d'alerte et de réactivité des réseaux de surveillance sanitaire, qui permettront de suspecter, diagnostiquer et contrôler au plus vite tout foyer potentiel.

Au-delà des mesures préventives contre l'introduction et la transmission virale entre élevages, la solution vaccinale préventive existe pour réduire l'impact clinique et les capacités de transmission des VIAHP (Swayne, 2008). Cette solution est notamment utilisée de manière encadrée sur les volailles dans les pays à forte circulation endémique tels qu'en Asie du Sud-Est ou en Afrique du Nord, ou bien en Europe essentiellement en parcs zoologiques (OIE, 2021b). Les technologies vaccinales sont variées et présentent chacune des avantages et des limites. La principale technologie utilisée aujourd'hui est celle des vaccins à virus inactivés, mais d'autres comme les vaccins recombinants vectorisés ou les protéines recombinantes ont fait leurs preuves dans certaines conditions, tandis que les vaccins à ARN sont en développement avec déjà quelques résultats prometteurs (CGAAER, 2021). Outre des surcoûts engendrés par la vaccination, des barrières administratives et commerciales doivent être abaissées afin d'autoriser l'application des vaccins en Europe et en France. En effet, il y a interdiction vaccinale en France à ce jour sauf conditions bien particulières d'urgence (DGAL, 2008) qui de fait en limitent essentiellement l'usage aux parcs zoologiques. Par ailleurs, les exportations commerciales pour les principaux marchés actuels se verraient limitées si les volailles européennes étaient vaccinées (CGAAER, 2021). Egalement, seule la technologie des vaccins inactivés est aujourd'hui autorisée en Europe, nécessitant donc l'établissement de dossiers de demande d'autorisation de mise sur le marché pour la commercialisation de toute autre technologie. Enfin, des limites techniques existent pour la mise en place de la vaccination préventive, en particulier du fait de la diversité et de l'évolution constante des souches virales circulantes et de la variété d'espèces hôtes à protéger. La protection vaccinale est en effet souvent relativement spécifique d'une souche d'un sous-type particulier, ce qui oblige à réadapter régulièrement la production vaccinale aux souches circulantes (d'où le besoin aussi de continuer à surveiller celles-ci). Egalement, la plupart des technologies vaccinales sont essentiellement étudiées et développées pour les Galliformes qui représentent la majorité du marché mondial, et s'avèrent peu efficaces sur les palmipèdes qui seraient pourtant une cible prioritaire dans les filières françaises touchées par les précédentes épidémies de VIAHP. Enfin, dans l'objectif de pouvoir vérifier le niveau de protection vaccinale et de s'assurer que des souches naturelles ne circulent pas, il serait nécessaire de disposer de technologies de type DIVA (« differentiating infected from vaccinated animals ») dont la réponse immunitaire est distincte de celle produite par une infection naturelle par un VIA. Toutes ces contraintes donnent peu de visibilité sur l'avenir de la vaccination en Europe dans un objectif de protection contre des vagues successives de VIAHP, ce qui rend également les firmes pharmaceutiques frileuses sur le développement de technologies dans ce sens (CGAAER, 2021). Le besoin est pourtant réellement croissant avec la répétition des introductions de H5Nx en Europe, en particulier depuis l'épidémie la plus dévastatrice de 2020-2021 qui a remis la question de la vaccination préventive au sein des débats pour l'avenir des filières européennes de volailles et en particulier de volailles en plein air. Un objectif de recherche et développement d'une solution vaccinale est ainsi inscrit sur la feuille de route cosignée durant l'été 2021 par les professionnels et les services de l'Etat pour la prévention de futures crises d'influenza aviaire (DGAL, 2021b). L'objectif

retenu en France pour optimiser les bénéfices ainsi que les coûts directs et indirects de la vaccination serait alors de mettre en place une vaccination « préventive d'urgence », ciblant en priorité les palmipèdes en plein air du noyau de production du Sud-Ouest en période à risque (CGAAER, 2021). Des études sont en cours pour développer des vaccins contre les VIA H5N8 2.3.4.4b, notamment en Asie où les filières volailles sont également touchées par les vagues épidémiques de VIAHP (Cui et al., 2021). Cette vaccination viendrait bien sûr en complément des mesures préventives déjà en vigueur afin de réduire au maximum l'impact clinique et la circulation dans les élevages.

Surveillance événementielle des VIA

Dans les dispositifs sanitaires encadrant les filières d'élevage, la suspicion précoce de cas associée à un diagnostic rapide assurés par le réseau local (vétérinaire sanitaire et laboratoire départemental) constituent la base des systèmes de surveillance événementielle efficaces qui permettront de contrôler au plus vite tout foyer potentiel. Dans la faune sauvage, on retrouve en France ce type de système de surveillance événementielle représenté par le réseau SAGIR, coordonné en partenariat entre les fédérations de chasseurs et l'Office Français de la Biodiversité (OFB). La détection de cas suspects est participative, assurée par les acteurs locaux de terrain (particuliers, centres de soin, chasseurs, techniciens de l'OFB), relayant l'information aux coordinateurs départementaux qui déclencheront rapidement si besoin le processus de collecte et centraliseront le suivi du cas pour le coordinateur national. Un cas suspect de VIAHP est ainsi défini dans ce dispositif par une mortalité regroupée (rayon de 500m, délai d'une semaine) d'au moins trois oiseaux de la même espèce ou non, ou bien par la mortalité d'au moins un cygne (bonnes sentinelles en tant qu'espèces sensibles et exposées). La vigilance est renforcée en période à risque, dans les territoires à risque (foyers) et dans les zones à risque particulier (ZRP, soit les zones d'importance pour l'avifaune aquatique) où la suspicion est déclenchée par la mortalité d'un Anatidé (en particulier migrateur), d'un Charadriiforme ou d'un rapace (Réseau SAGIR, 2021). Sur ces cas, la recherche systématique de VIA à l'autopsie sera réalisée au laboratoire vétérinaire départemental selon les protocoles prédéfinis et adaptés, permettant d'obtenir rapidement un résultat fiable dont l'information sera relayée immédiatement au niveau national. Ce dispositif de surveillance événementielle est très réactif et efficace en période normale, et il est renforcé (plus de tournées sur le terrain, rappels à l'ensemble du réseau) en périodes où les risques de circulation dans l'avifaune sont jugés élevés au regard du contexte de la France ou des pays voisins. Il a permis d'assurer une bonne confiance dans l'évaluation des niveaux de circulation dans l'avifaune lors des épisodes de VIAHP en Europe et en France ces dernières années (Anses, 2021).

Surveillance programmée des VIA

À ces dispositifs permanents de surveillance événementielle en élevage et dans la faune sauvage, s'ajoutent des dispositifs de surveillance programmée, essentiels pour une détection précoce de circulation subclinique dont les VIA sont capables dans leurs populations réservoirs. En élevages de palmipèdes particulièrement sujets à la circulation de VIA, un programme national de surveillance a ainsi été mis en place en 2018 en collaboration avec l'Anses, le Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras (CIFOG) et l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT) (DGAL, 2021a, 2018). L'objectif de ce projet est d'analyser l'épidémiologie des VIAFP, potentiels recombinaisons ou protecteurs pour les VIAHP et caractérisant les mêmes voies de circulation globales. Dans ce but, des autocontrôles (c'est-à-dire aux frais et à l'organisation des éleveurs) par écouvillons trachéal et cloacal sont obligatoirement réalisés sur 20 animaux de chaque lot en fin de croissance (dits « prêts à engraisser ») avant tout mouvement en dehors du site. Le seuil de 20 individus a été fixé pour garantir 95% de probabilité de détection d'une prévalence de 15%, ce qui est généralement atteint dans un lot du fait de la contagiosité élevée des VIA. Ces contrôles sont dits libératoires, c'est-à-dire que l'autorisation de mouvement est conditionnée par un résultat négatif pour les VIAHP. Les RT-PCR ciblant le gène M puis H5 et H7 si positives sont réalisées au laboratoire d'analyse vétérinaire local, et un échantillon positif au gène M et au sous-type H5 ou H7 est rapidement acheminé vers le LNR de Ploufragan pour identification plus précise du sous-type complet (HA et NA) ainsi que pour le séquençage en particulier du site de clivage de HA. Les alertes aux acteurs du réseau sanitaire national issues de ce dispositif permettent ainsi d'activer une surveillance événementielle renforcée auprès de l'ensemble des élevages en cas de forte circulation de VIAFP.

Du côté de la faune sauvage, la surveillance programmée est peu réalisée à large échelle sur les populations libres en dehors d'études scientifiques particulières, souvent restreintes dans la durée ou dans le nombre d'échantillons du fait des contraintes réglementaires, techniques et financières liées aux captures évoquées dans les paragraphes précédents (FAO, 2007). Les résultats de ces études n'impactant pas directement l'économie publique, leur financement n'est souvent pas soutenu à la hauteur de l'ambition des chercheurs de mieux prévoir et appréhender la complexité globale de l'épidémiologie et de la phylogénie des VIA. Des dispositifs ciblés et mis en place à moindre coût financier et humain ont donc été mis en place pour contrer ces obstacles, qui ont permis et permettent d'avoir une meilleure idée de la circulation des VIA dans l'avifaune. Ainsi, un dispositif de canards sentinelles a été appliqué dans différents contextes pour évaluer les dynamiques de circulation naturelle de VIA dans l'avifaune. Ces canards sentinelles sont rassemblés durant plusieurs mois dans un enclos en bord de plan d'eau fréquenté par les Ansériformes sauvages, et seront théoriquement infectés par les souches circulantes naturellement. L'effet sentinelle jouera d'autant plus que les Ansériformes sont grégaires et que le groupe enclos attirera à lui les groupes sauvages, favorisant ainsi les transmissions. Il est alors aisé et peu

fastidieux de venir prélever à intervalles réguliers les canards enclos pour obtenir des données virologiques et sérologiques fiables. La méthode a ainsi été appliquée dans le Minnesota à proximité d'élevages de dindes et a permis de mettre en évidence l'origine des émergences locales de VIAFP (Halvorson et al., 1983). Elle a aussi été appliquée en Europe en parallèle sur trois sites de zones humides en Allemagne, Autriche et Suisse, ce qui a permis d'identifier de nombreux sous-types et séquences de VIA circulant alors dans le réservoir sauvage migrateur (Globig et al., 2009), et de comprendre les interactions immunologiques entre souches VIAFP et VIAHP chez les canards (Koethe et al., 2020). Les bénéfices de ces études de long terme sont donc immenses pour la compréhension globale des VIA.

Coordination globale de la surveillance des VIA

L'ensemble des données locales de détection de VIA récoltées par ces différents dispositifs de surveillance événementielle ou programmée, et en particulier pour les VIAHP, sont déclarées aux autorités sanitaires ou organismes coordinateurs de l'information sanitaire. Les systèmes d'alertes centralisées à l'échelle nationale, puis à l'échelle internationale via la notification des cas à l'OIE, permettent une coordination régionale rapide des filières et des réseaux pour renforcer la biosécurité et la surveillance selon le niveau de risque environnant. Les rapports et cartographies des cas sont ainsi disponibles en ligne quasiment en temps réel : sur l'outil mondial WAHIS de l'OIE (<https://wahis.oie.int/>) ou EMPRES-i de la FAO (<https://empres-i.apps.fao.org/>), sur les outils européens de veille sanitaire tels que les bulletins et la cartographie interactive de la Veille Sanitaire Internationale de la Plateforme Epidémiosurveillance Animale (<https://shiny-public.anses.fr/shiny-vsi/>) ou l'outil de l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe) qui est le laboratoire de référence européen pour l'influenza aviaire (<https://www.izsvenezie.com/reference-laboratories/avian-influenza-newcastle-disease/europe-update/>). Outre les déclarations de cas dans les compartiments sauvages et domestiques, la phylogénie et l'évolution des VIA séquencés peut aussi être suivie en temps réel grâce à différentes plateformes de dépôt et consultation de séquences en ligne, en particulier GISAID pour les virus influenza et coronavirus (<https://www.gisaid.org/>) (Figure 9).

Real-time tracking of influenza A/H5Nx virus evolution

Développé avec nextstrain.com et Nextstrain par Louisa Mounie.

Visualisation de 2092 des 2372 séquences de virus H5Nx entre Apr. 1996 et Jul. 2021.

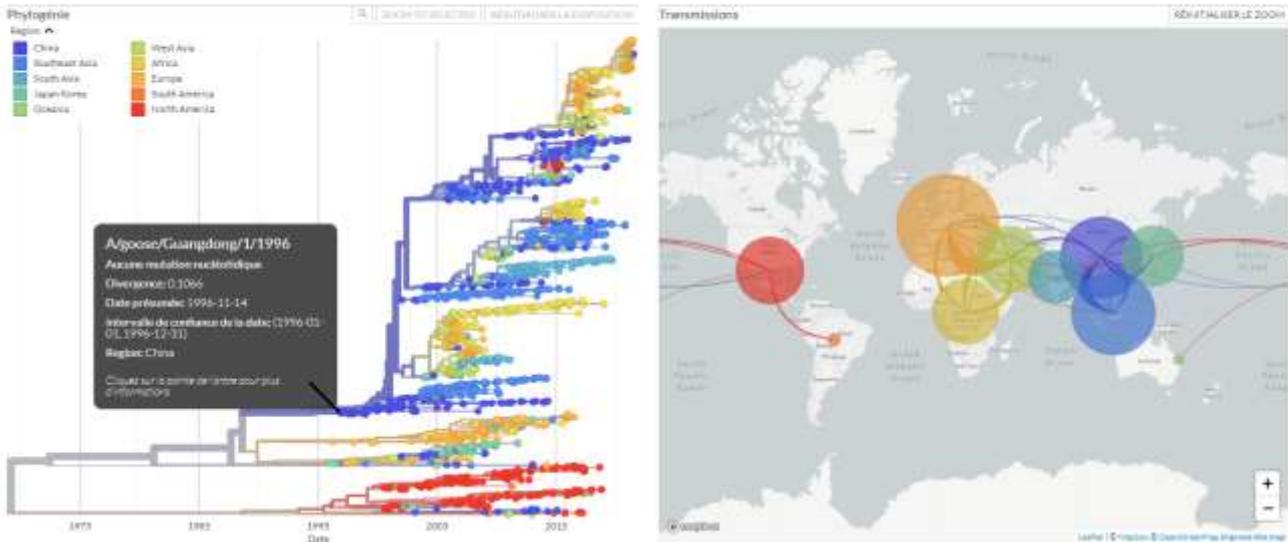


Figure 9 - Affichage en ligne de l'outil interactif de phylogénie et épidémiologie moléculaire GISAID.

Sont représentées pour les sous-types H5Nx : à gauche la phylogénie avec l'ancêtre historique A/goose/Guangdong/1/1996 pointé, et à droite la répartition géographique des séquences. Chaque couleur figure le continent (ou pays pour la Chine) d'origine de la séquence. Les lignes colorées représentent les liens de filiation entre souches virales (colorées par origine du flux), montrant bien la circulation intercontinentale. Accessible sur <https://www.gisaid.org/epiflu-applications/influenza-genomic-epidemiology/>.

Le risque de circulation dans le compartiment des élevages commerciaux est ainsi théoriquement maîtrisé par les différentes mesures de prévention permanentes et adaptées au niveau de risque, par les dispositifs de surveillance au niveau des réservoirs sauvages et des élevages, et par le contrôle rapide des foyers. Mais la circulation dans le compartiment sauvage reste un facteur de risque majeur et non maîtrisable dans la circulation des VIA. Il est impossible d'éteindre un foyer dans l'avifaune sauvage étant donné le caractère diffus géographiquement et le vaste spectre d'espèces hôtes potentiellement infectées. Mais grâce aux systèmes de surveillance évoqués plus haut il est possible d'en anticiper la transmission aux élevages voisins en adaptant les niveaux d'alerte sanitaire. Certains chercheurs envisagent même une prévention de la dissémination des VIA par l'avifaune aquatique migratrice grâce à la protection des zones humides. Cette protection permet en effet aux espèces sauvages de s'y concentrer et de s'y satisfaire, sans besoin de visiter les élevages environnants (Wu et al., 2019). Tant que les transmissions de VIA aux interfaces sauvage-domestique existent, il est cependant nécessaire de poursuivre les études pour mieux comprendre ces mécanismes de dispersion.

b. Agents infectieux marqueurs des voies de transmissions directes et indirectes

Lorsqu'on veut étudier l'avifaune non réservoir de VIA pour caractériser son rôle épidémiologique, et en particulier pour les espèces commensales qui fréquentent les élevages, des limites dans les capacités de détection infectieuse peuvent se poser. Comme évoqué précédemment, les espèces commensales que nous considérerons représentent l'avifaune terrestre dont la niche écologique comprend partiellement ou totalement les milieux anthropisés et en particulier les élevages avicoles dans notre cas. Des études dans différentes régions du monde ont montré que ces espèces sont représentées essentiellement par les ordres des Passériformes, ainsi que des Columbiformes, et plus variablement par des Ardéidés en particulier le Héron garde-bœufs (*Bubulcus ibis*) ou des rapaces des ordres des Accipitriformes et des Falconiformes, avec des variations locales dans la distribution des abondances spécifiques (Bicout et al., 2011; Elbers and Gonzales, 2019; Guimarães et al., 2016; Hirschinger et al., 2020; Lubac et al., 2012; Scherer et al., 2011; Scott et al., 2018; Shriner et al., 2016; Valdez-Gómez et al., 2017; Veen et al., 2007). Chez ces espèces hôtes accidentelles de VIA, la durée d'excrétion virale est généralement courte de l'ordre de deux à cinq jours, au grand maximum une semaine si l'on veut tenir compte d'une marge pour le grand nombre d'espèces non étudiées sur ce point (Bosco-Lauth et al., 2019; Brown et al., 2009; Ellis et al., 2021; Nemeth et al., 2010), contre des durées jusqu'à un mois chez les canards (Halvorson, 2008). Outre l'éventuelle moindre efficacité de répllication, leur petite taille moyenne résultera en de moindres quantités absolues de VIA qui seront répliquées et excrétées. La fenêtre temporelle de détectabilité virologique des VIA dans ces espèces est donc étroite, et nécessite des méthodes hautement sensibles afin de s'assurer de ne pas avoir de faux négatifs. De même, si l'on complète cette surveillance par une recherche sérologique d'anticorps anti-VIA, la fenêtre temporelle de détectabilité est relativement courte en comparaison des Ansériformes, de l'ordre de deux mois tout au plus (Ellis et al., 2021; Nemeth et al., 2010), voire trois avec la marge de diversité évoquée, contre six à quinze mois chez les canards (Tolf et al., 2013). À cela s'ajoute l'incertitude évoquée sur la sensibilité des résultats provenant de méthodes diagnostiques non validées pour la grande variété d'espèces étudiées (Arenas et al., 1990; Brown et al., 2010; Pérez-Ramírez et al., 2010). En parallèle des limites de sensibilité de détection individuelle des tests diagnostiques, se posent les difficultés de détection à l'échelle des populations étudiées. En effet, dans les populations commensales et hors période épidémique apparente, les niveaux attendus de prévalences virologique et sérologique en VIA sont faibles (Caron et al., 2017; Munster et al., 2007; Shriner and Root, 2020; Slusher et al., 2014; Veen et al., 2007). Cela nécessite donc d'avoir des tailles d'échantillons importantes pour espérer avec confiance une détection et des estimations de prévalence (Gilot-Fromont and Rossi, 2000). Or, les difficultés techniques sont nombreuses pour obtenir sur une durée d'étude donnée de grandes tailles d'échantillons dans une population sauvage (Gilot-Fromont and Rossi, 2000). Ceci est d'autant plus vrai sur des espèces commensales fragiles et petites, ce qui limite les possibilités de méthodes de capture, et dont le comportement moins grégaire que des Anatidés (donc à

répartition diffuse) offre peu de sites à cibler pour des opérations efficaces de captures ou de prélèvements environnementaux (FAO, 2007).

Pour contourner ces difficultés inhérentes à l'étude épidémiologique des VIA chez des hôtes dont l'infection est difficile à détecter en dehors de toute épidémie, il faut considérer l'étude d'autres agents infectieux comme marqueurs de transmission. En effet, si les preuves d'échanges de VIA entre l'avifaune commensale et les volailles sont minces (Anses, 2016; Grear et al., 2017; Shriner et al., 2016; Verhagen et al., 2015), des transmissions d'autres agents infectieux ont été objectivées à l'interface entre ces deux compartiments. Un exemple bien connu est celui d'une bactérie des volailles de l'espèce *Mycoplasma gallisepticum* ayant provoqué une épidémie chez les passereaux aux Etats-Unis (Ley et al., 2016). L'existence d'échanges infectieux est relativement peu surprenante au regard de l'intensité des contacts directs ou indirects qui peuvent être observés avec les volailles domestiques (Guimarães et al., 2016; Scherer et al., 2011; Scott et al., 2018; Valdez-Gómez et al., 2017; Veen et al., 2007). Ainsi, l'étude de marqueurs de transmission plus robustes que les VIA est nécessaire pour objectiver les possibilités de flux infectieux à l'interface entre avifaune commensale et volailles. Le choix de marqueurs repose sur différents critères :

- leur capacité à infecter un spectre d'hôtes large parmi les oiseaux, au moins les espèces sauvages et domestiques d'intérêt ;
- leur prévalence suffisante dans au moins l'un des compartiments étudiés pour être détectable avec confiance dans un échantillon de taille raisonnable ;
- leur caractère rapidement et facilement détectable, et typable grâce à des outils diagnostiques utilisables à haut débit d'analyse (typiquement des outils moléculaires) ;
- leur mode de transmission semblable aux VIA (fécale-orale en priorité, environnementale, respiratoire), au moins pour une voie qui sera complétée par celles d'autres marqueurs étudiés en parallèle ;
- leur capacité de persistance dans leurs hôtes, ainsi qu'idéalement dans l'environnement afin d'offrir de meilleures chances de détection dans l'ensemble des compartiments de la chaîne de transmission.

La caractérisation de transmissions interspécifiques a notamment été développée pour l'étude de « spillover » du compartiment domestique vers sauvage. C'est le cas par exemple de l'identification de gènes de résistance aux antibiotiques de staphylocoques (Ruiz-Ripa et al., 2020) ou d'*Escherichia coli* (Mercat et al., 2016), ou bien de souches vaccinales (Ayala et al., 2016; Rohaim et al., 2017), présents dans l'avifaune en contact avec les élevages. Les typages génétiques d'*Escherichia coli* (Mercat et al., 2016; VanderWaal et al., 2014) ont aussi permis d'établir des chaînes de transmissions infectieuses entre espèces d'un même écosystème.

Le choix de marqueurs pour le travail de cette thèse s'est fondé sur les critères présentés ici en ciblant le contexte d'étude des élevages de canards du Sud-Ouest de la France. Ceux-ci ont été complétés par le critère de disponibilité d'outils moléculaires existants permettant une recherche à large spectre des agents infectieux, étant donné le large spectre d'hôtes à étudier. C'est donc une sous-famille et une famille virales et deux genres bactériens qui ont été sélectionnés comme marqueurs de transmission à l'interface avec les élevages de canards : respectivement les Avulaviriné, les Coronaviridés, les Chlamydia et les Mycoplasmes.

i. [Virus de la maladie de Newcastle et orthoavulavirus aviaires](#)

Étiologie, phylogénie et pathogénie

Avec un tableau clinique et lésionnel généralement indistinct de celui de l'influenza aviaire, la maladie de Newcastle fut pendant longtemps confondue avec celle-ci sous le nom de peste aviaire (Lancaster, 1976). Déjà identifiée comme de cause distincte des influenza aviaires en 1927 chez des volailles de Newcastle-on-Tyne en Angleterre, ce n'est qu'aux débuts de la virologie moderne utilisant les techniques d'immunologie que ces deux virus purent être distingués et étudiés séparément (Alexander et al., 2012). De même que pour les VIAHP, le caractère hautement pathogène et contagieux de la maladie de Newcastle, associé à un faible potentiel zoonotique (conjonctivites modérées chez l'Homme), a conduit l'OIE à répertorier celle-ci dans son Code sanitaire pour les animaux terrestres, en rendant la déclaration obligatoire (OIE, 2021c). La maladie causée par des souches hautement pathogènes était également classée jusqu'avril 2021 comme danger sanitaire de première catégorie en France (DGAL, 2013), aujourd'hui classée ADE à l'échelle européenne par la LSA (Commission Européenne, 2018). Elle est donc contrôlée en élevages par les mêmes stratégies d'urgence d'isolement-élimination-désinfection que décrites pour les VIAHP (OIE, 2021c).

Les agents étiologiques de la maladie de Newcastle sont les souches hautement pathogènes de l'espèce *Avian orthoavulavirus 1* (AOAV-1), une des neuf espèces (les autres sont AOAV-9, -12, -13, -16, -17, -18, -19 et -21) appartenant au genre des *Orthoavulavirus* de la sous-famille des *Avulavirinae* dans la famille des *Paramyxoviridae*. Cette espèce a été plusieurs fois renommée et déplacée dans la phylogénie, et cette classification basée aujourd'hui sur la génétique et non plus l'immunologie date seulement de 2018 (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021). Ainsi les AOAV-1 sont encore communément désignés comme *Avian paramyxovirus serotype 1* (APMV-1) ou simplement virus de la maladie de Newcastle (NDV) (OIE, 2021c). L'espèce comprend deux classes, classe I et classe II, comprenant chacune respectivement un génotype (« 1 ») et 21 génotypes (I à XXI) (Dimitrov et al., 2019). Tout comme les VIA, ce sont des virus enveloppés à ARN simple brin de polarité négative, leur conférant des propriétés de résistance environnementale et de dérive antigénique par mutation similaires (Suarez et al., 2020). Les

virions sont circulaires d'environ 150 nm de diamètre, structurés par sept protéines. Le génome est composé d'un segment unique linéaire d'environ 15 kb codant pour l'ensemble des protéines (Figure 10). La protéine hémagglutinine-neuraminidase (HN) et la protéine de fusion (F) sont les principaux antigènes des AOAV-1, qui sont ciblés par la réponse immunitaire de l'hôte et utilisés pour les tests immunologiques (sérotypes et sérologie) et la vaccination. Du fait de la présence des protéines HN, les AOAV-1 sont hémagglutinants comme les VIA, permettant l'usage de tests diagnostiques exploitant cette propriété (HA et IHA). La pénétration du virus dans les cellules hôtes est réalisée grâce aux protéines HN puis F, cette dernière comportant un site de clivage qui sera rompu par les protéases de l'hôte. Comme les VIA, les critères de pathogénicité des souches d'AOAV-1 sont définis en grande partie par ce site de clivage, cible de protéases tissulaires variables selon son motif ce qui en détermine le tropisme préférentiel. Selon la définition officielle de l'OIE, les souches hautement pathogènes, causant la maladie de Newcastle au sens propre, sont caractérisées par une mortalité élevée dans des conditions d'infections intracérébrales expérimentales sur poussins (OIE, 2021c). Elles sont aujourd'hui caractérisées génétiquement par la présence d'un motif polybasique sur le site de clivage de la protéine F associée à une phénylalanine en position 117. Si aujourd'hui la taxonomie se base uniquement sur la séquence génomique des AOAV-1 et en particulier le gène F (Abd El-Hamid et al., 2020; Dimitrov et al., 2019), on trouve encore fréquemment des distinctions de souches par sérotype (protéine HN) et par pathotype. Comme pour les VIA, ce dernier est caractérisé sur le poulet et défini par le grade de virulence et le tropisme tissulaire. Les souches hautement pathogènes sont dites vélogénique viscérotropique (tropisme majoritairement digestif) ou vélogénique neurotropique (tropisme majoritairement respiratoire et nerveux). Les souches modérément pathogènes sont dites mésogéniques (tropisme respiratoire, parfois nerveux), et les souches faiblement pathogènes (voire subcliniques) sont dites lentogènes avec un tropisme respiratoire (OIE, 2021d; Suarez et al., 2020).

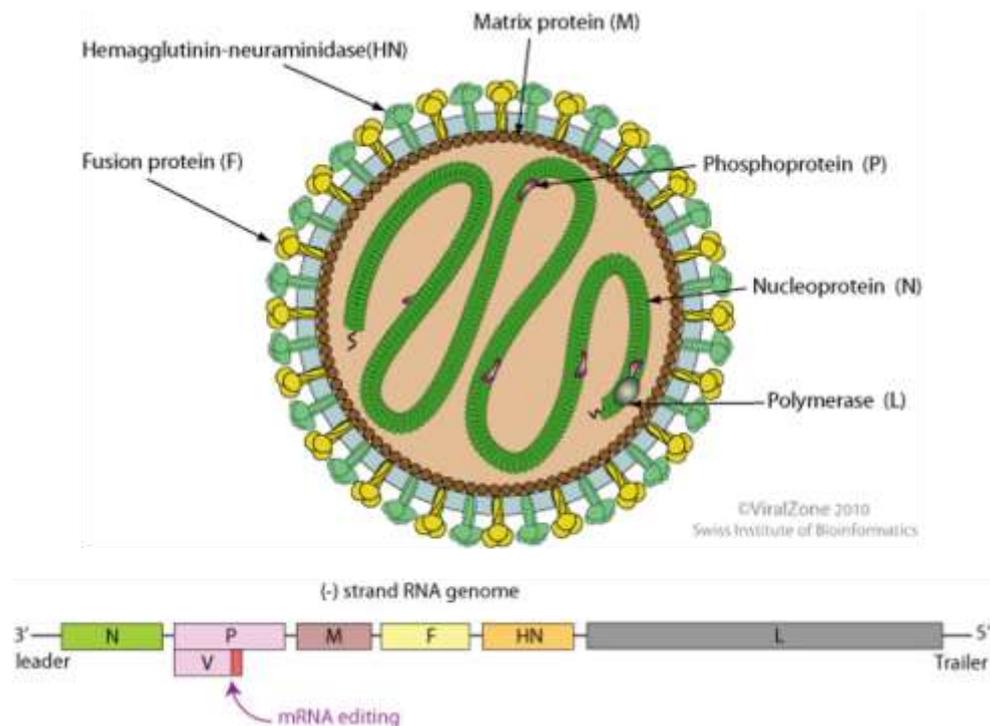


Figure 10 - Schéma d'une particule typique des Avulavirinae et de la composition du génome.

L'ensemble est composé d'un segment unique d'ARN simple brin négatif, ainsi que sept protéines. Les glycoprotéines de surface HN (hémagglutinine-neuraminidase) et F (fusion) participent à la pénétration dans la cellule hôte. La protéine M (matrice) est structurale de l'enveloppe. L'ARN viral est encapsidé par la protéine N (nucléoprotéine), et associé à la protéine P (phosphoprotéine) et à la protéine L (polymérase). *Issue de ViralZone (<https://viralzone.expasy.org/84>), 2021.*

Écologie et épidémiologie des avulavirus dans les compartiments sauvages et domestiques

L'écologie des AOAV-1 est très semblable à celle des VIA, avec des modes de transmission identiques (fécal-oral, respiratoire, environnemental) et un réservoir naturel essentiellement dans l'avifaune aquatique. Des échanges infectieux sont aussi fréquemment identifiés depuis et vers les élevages (Alexander, 2009; Ayala et al., 2016; Cardenas Garcia et al., 2013; Dimitrov et al., 2016; Kim et al., 2012; Welch et al., 2019; Xiang et al., 2017), y causant des dégâts sanitaires et économiques modérés à très graves en particulier chez les Galliformes (Lancaster, 1976; Suarez et al., 2020). Contrairement aux VIA, aucune circulation d'AOAV-1 n'est décrite chez des hôtes non aviaires, les autres classes d'animaux étant considérées comme culs-de-sac épidémiologiques. Si une très grande variété d'espèces d'oiseaux a été décrite comme hôtes potentiels d'AOAV-1, les principaux réservoirs semblent être les oiseaux aquatiques (Anseriformes, Charadriiformes, Suliformes en particulier) ainsi que les Columbiformes qui hébergent en particulier le génotype VI (anciennement « pigeon paramyxovirus 1 », PPMV-1). Ces réservoirs voient donc circuler des génotypes viraux variés et adaptés à leurs hôtes, mais certaines souches y provoquent occasionnellement des épidémies (Dimitrov et al., 2016; Kaleta and Baldauf, 1988; Kim et al., 2008; Pedersen et al., 2016; Rahman et al., 2018; Suarez et al., 2020; Welch et al., 2019; Zanetti et al., 2005). Avec un possible portage asymptomatique prolongé de souches pathogènes ou non, une excrétion virale

par voie fécale, et une persistance environnementale en milieu humide, les mouvements migratoires du réservoir naturel peuvent favoriser une circulation intercontinentale d'AOAV-1 comme le révèlent les études phylogénétiques (Alexander, 2009; Dimitrov et al., 2016; Kaleta and Baldauf, 1988; Rahman et al., 2018; Suarez et al., 2020). Comme pour les VIA, l'adaptation particulière d'un grand nombre de souches d'AOAV-1 aux Ansériformes permet la formation d'un riche réservoir secondaire chez les palmipèdes domestiques (Abd El-Hamid et al., 2020; Lee et al., 2009), entretenu par « spillovers » et « spillbacks » au contact de l'avifaune et de son environnement (Kim et al., 2012; Xiang et al., 2017). La vaccination des volailles par des souches vaccinales vivantes atténuées est pratiquée dans un certain nombre de pays (OIE, 2021d; Suarez et al., 2020). Cette pratique associée à des mesures de biosécurité incomplètes semblerait aussi favoriser la circulation importante de ces souches ainsi que de souches hétérologues naturelles dans les élevages et à l'interface avec l'avifaune (Abd El-Hamid et al., 2020; Ayala et al., 2016; Rohaim et al., 2017; Welch et al., 2019). L'avifaune commensale des élevages pourrait également jouer un rôle dans l'épidémiologie des AOAV-1, en particulier les Columbiformes comme hôtes réservoirs et les autres groupes plus probablement comme relais. En effet, des preuves virologiques ou sérologiques d'infection sont régulièrement détectées chez ces espèces à proximité d'élevages (Ayala et al., 2016; Hirschinger et al., 2020; Kaleta and Baldauf, 1988; Rohaim et al., 2017; Welch et al., 2019). Ainsi, et hormis le rôle réservoir des Columbiformes, ces nombreuses similitudes écologiques et épidémiologiques entre AOAV-1 et VIA font de ces premiers des marqueurs pertinents pour étudier la transmission des seconds. Cette supposition semble étayée par leur apparente cocirculation dans le réservoir aquatique sauvage (Wille et al., 2015). Il est en revanche attendu que les prévalences en élevages en France soient faibles à nulles étant donné que le pays est officiellement indemne de NDV et la vaccination y est interdite en dehors des élevages de pigeons (dans le but d'y contrôler le génotype VI). Quelques épidémies ponctuelles sont malgré tout parfois décrites dans ces derniers, souvent liées à un défaut de vaccination, montrant la possibilité de « spillovers » depuis l'avifaune (Huneau-Salaün et al., 2020; Sadonès et al., 2013). Les seuls élevages touchés par des souches de génotype VI en Europe entre 2000 et 2009 étaient ainsi non vaccinés, et présentaient un faible niveau de biosécurité les exposant au réservoir columbiforme sauvage (pigeons, volailles ou gibier en plein air, basses-cours) (Alexander, 2011). De plus, ces souches sont certainement fréquemment introduites dans les élevages de façon indétectée, du fait de leur moindre pathogénicité pour les Galliformes (Alexander, 2011). Quant aux souches plus spécifiques des volailles galliformes et ansériformes (notamment génotype VII hautement pathogène), leur diffusion en élevages semble limitée par une vaccination plus largement répandue notamment à l'Est de l'Europe d'où viennent les flux migratoires (Alexander, 2011). Ceci expliquerait en particulier l'épidémiologie différente en comparaison des VIA dans les élevages et l'avifaune européens.

Afin d'augmenter les chances d'identifier un marqueur de transmission dans l'avifaune et sans tenir compte de la pathogénicité éventuelle, l'étude des AOAV-1 peut être étendue à l'ensemble des avulavirus

(la sous-famille des *Avulavirinae*), c'est-à-dire les autres sérotypes d'AOAV dans le genre *Orthoavulavirus*, ainsi que les genres *Metaavulavirus* et *Paraavulavirus* qui étaient autrefois tous classifiés en différents sérotypes des APMV (Figure 11). En effet, ces genres sont très rarement pathogènes en élevages mais leur écologie naturelle est similaire à celle des AOAV-1, avec une circulation exclusivement aviaire et parmi des spectres d'hôtes larges (Suarez et al., 2020). Bien qu'encore méconnus du fait de leur moindre intérêt sanitaire, et parce que les tests diagnostiques utilisés sont généralement orientés exclusivement sur certains AOAV-1, ces spectres d'hôtes semblent variables selon les génotypes. Ainsi certains sont plutôt orientés vers les Columbiformes, Psittaciformes ou Passériformes, d'autres plutôt vers les Ansériformes ou Charadriiformes, et d'autres encore identifiés sur des manchots (Suarez et al., 2020).

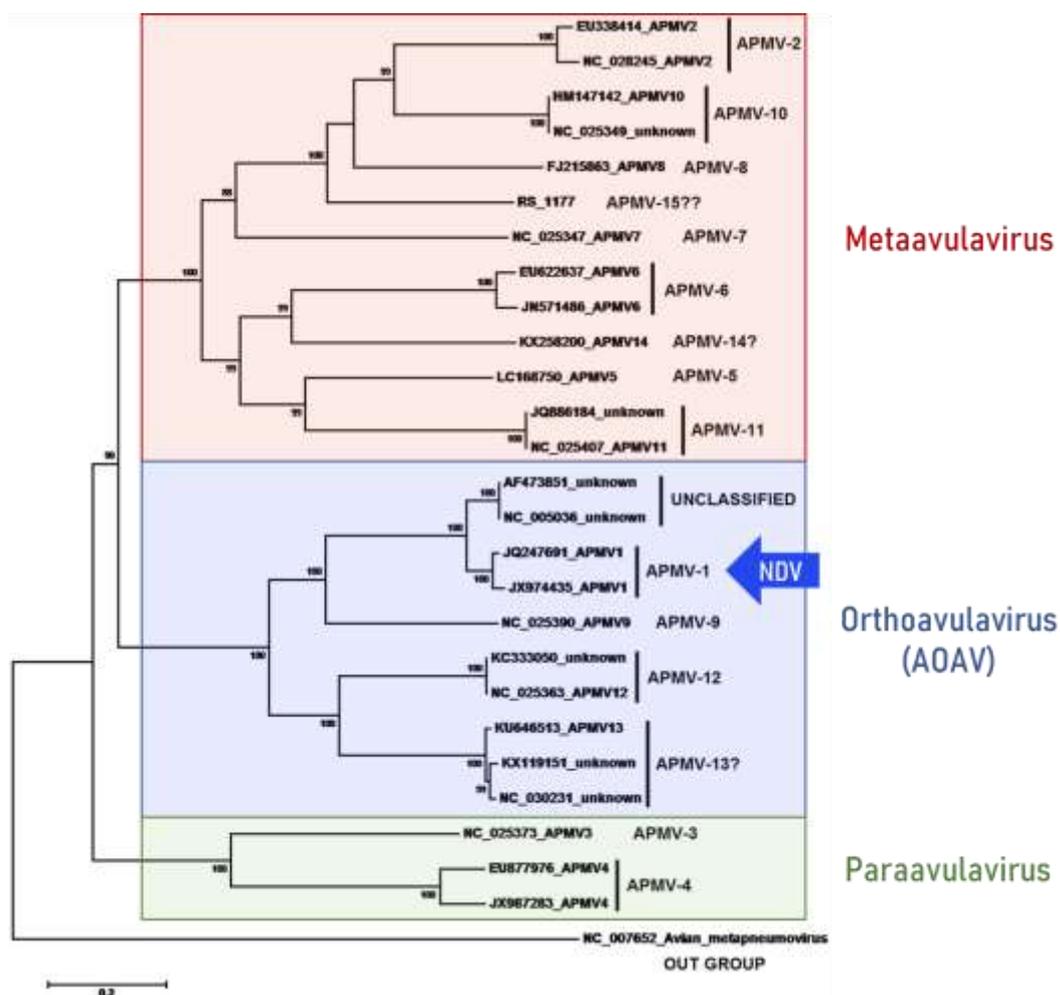


Figure 11 - Phylogénie des Avulavirinae.

Phylogénie basée sur les séquences génomiques complètes, représentant les trois genres principaux (blocs de couleur), chacun regroupant les principales espèces d'avulavirus désignées par le numéro de séquence sur GenBank et les dénominations des anciens sérotypes d'APMV. L'espèce majeure NDV (AOAV-1) est indiquée par une flèche bleue. Issue et adaptée de Thomazelli et al., 2017.

Détection directe et indirecte des avulavirus

Les méthodes de détection et d'identification des AOAV-1 ont été largement développées pour le diagnostic de routine en élevage, et reposent sur des techniques de prélèvement et d'analyse similaires à celles décrites pour les VIA étant données les similarités physiopathologiques de ces virus (OIE, 2021d). Essentiellement aujourd'hui, les techniques de détection par RT-qPCR ont pris le dessus pour leur sécurité, leur sensibilité et leur rapidité notamment avec des kits commerciaux simples. Celles-ci sont souvent associées à du séquençage génétique pour caractériser la pathogénicité et déterminer la taxonomie des souches. La culture virale sur œufs embryonnés afin d'isoler et de déterminer le caractère infectieux ou non d'une souche est également pratiquée couramment en laboratoire de recherche (OIE, 2021d). Toute manipulation de matériel infectieux doit être réalisée a minima dans un laboratoire confiné de niveau 2, et de niveau 3 si la présence d'une souche hautement pathogène est suspectée (DGAL et al., 1994). Ces méthodes virologiques sont complétées par des tests sérologiques classiques (IHA), ou par kits ELISA commerciaux rapides et efficaces (OIE, 2021d). Cependant, l'essentiel des tests sérologiques et virologiques courants ciblent prioritairement les AOAV-1 de classe II dans une optique de diagnostic clinique et réglementaire, ce qui ne permet donc pas de détecter la majorité des AOAV-1 de classe I (Kim et al., 2007), ni tous les autres avulavirus qui pourraient être présents dans l'avifaune (Figure 11). Des recherches sur les réservoirs sauvages d'AOAV-1 ont permis de développer et exploiter un protocole de RT-qPCR de plus large spectre ciblant la classe I en parallèle de la classe II (Kim et al., 2008; Pedersen et al., 2016). Des méthodes de séquençage haut débit sur de larges spectres d'AOAV-1 ont aussi permis la détection simultanée des classes I et II (Welch et al., 2019). Mais ces méthodes ne couvrent pas non plus les autres espèces d'avulavirus. Ceux-ci sont généralement identifiés de manière involontaire suite à des tests HA sur œufs inoculés positifs. Leur identification est ensuite validée par test spécifique IHA (virus amplifié sur œuf inoculé mélangé à un sang spécifiquement immunisé), ou par RT-PCR et séquençage (Jin et al., 2021; Suarez et al., 2020; Thomazelli et al., 2017). La détection et l'identification peuvent aussi se faire par des méthodes récentes de séquençage à haut débit non ciblé (dites de métagénomique) couvrant l'ensemble du pathobiome (l'écosystème des agents infectieux) ou du virome (l'écosystème des virus) d'hôtes aviaires (Ramírez-Martínez et al., 2018; Wille et al., 2019). Dans une optique d'étude de marqueurs de transmission, il serait donc intéressant de disposer pour l'ensemble de la sous-famille des *Avulavirinae* d'un protocole ciblé de RT-qPCR rapide et direct, dont l'identification des souches détectées se ferait idéalement par séquençage du produit d'amplification directement, sinon par séquençage ciblé d'autres parties du génome (gène F ou L) utilisées pour la phylogénie (Dimitrov et al., 2019; Kim et al., 2012, 2008).

ii. Chlamydia aviaires

Écologie, épidémiologie, phylogénie et pathogénie

Les bactéries du genre *Chlamydia* (chlamydia) de la famille des *Chlamydiaceae* sont des parasites intracellulaires obligatoires de caractère Gram négatif. Les espèces sont variées avec pour chacune un tropisme tissulaire particulier et une relative spécificité d'hôte (Figure 12), mais leur propriété commune essentielle est un cycle de développement en deux phases complété en plusieurs jours (Longbottom and Coulter, 2003). La bactérie peut se présenter sous la forme d'un corps réticulé, métaboliquement actif lors de la phase de réplication intracellulaire, ou d'un corps élémentaire, métaboliquement inerte lors de la phase d'infection extracellulaire. Ce dernier est l'équivalent d'une forme sporulée, capable de résister à certains traitements désinfectants, et ce durant plusieurs semaines voire mois dans l'environnement même sec grâce à une paroi rigide et peu perméable aux agresseurs physico-chimiques (Hulin, 2016). À cette résistance environnementale s'ajoute une capacité de persistance dans les cellules infectées sous conditions de stress cellulaires variés (carences en nutriments, toxines, coinfections virales, chocs thermiques), ou d'actions antibactériennes (interférons gamma, antibactériens, infection par chlamydiaphages), qui permettent de maintenir une infection de longue durée au sein de leurs hôtes ainsi qu'une excrétion intermittente (Schoborg, 2011). Le tropisme tissulaire concerne généralement les muqueuses respiratoires, oculaires, génitales ou digestives, mais des diffusions systémiques par voie veineuse atteignant par exemple le cœur, les articulations ou le foie sont décrites en particulier sur des hôtes accidentels (Vanrompay, 2020). Ainsi la transmission se fait essentiellement par voie directe (matières biologiques excrétées) ou indirecte (environnement) par des voies qui sont similaires à celles des VIA : respiratoire ou digestive.

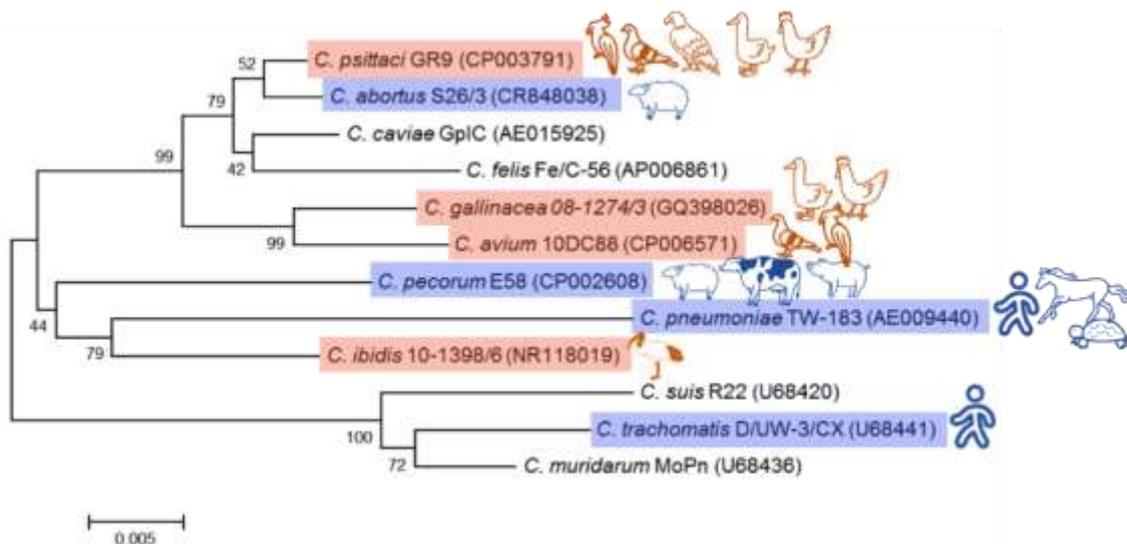


Figure 12 - Phylogénie et hôtes primaires des espèces de *Chlamydiaceae*.

Phylogénie basée sur la séquence d'ARNr 16S, issue de Hulin, 2016. Le spectre général d'hôtes primaires est représenté pour les espèces de chlamydia ayant été détectés chez des oiseaux, avec en couleur et symboles le type d'hôtes primaires : rouge pour des oiseaux, bleu pour des hôtes non aviaires. Données de Cheong et al., 2019.

Les principales espèces décrites chez des hôtes de maintenance aviaires sont *C. psittaci* (Psittaciformes, Columbiformes, volailles, et grande variété d'espèces sauvages), *C. gallinacea* (volailles), *C. avium* (Psittaciformes, Columbiformes), et récemment *C. ibidis* (ibis) (Cheong et al., 2019; Li et al., 2020) (Figure 12). *C. psittaci* est certainement l'espèce au plus large spectre d'hôtes chez les oiseaux domestiques et surtout sauvages, causant parfois des épidémies en élevage en particulier chez les oiseaux de jeune âge (Vanrompay, 2020). Différents génotypes ont été caractérisés sur la base la séquence du gène *ompA*, avec des préférences d'hôtes relatives : génotype A pour les Psittaciformes, B pour les Columbiformes, C pour les Ansériformes, D pour les dindes, E pour les pigeons et autres espèces d'oiseaux, F pour les Psittaciformes et dindes, et E/B pour les canards (Vanrompay, 2020). La chlamydie à *C. psittaci* se présente sous des formes cliniques variées selon la sensibilité de l'hôte et la souche impliquée : aigue, subaiguë, chronique ou asymptomatique. Dans les formes symptomatiques, on retrouve variablement des signes respiratoires (dyspnée, rhinite), oculaires (conjonctivite, écoulements), digestifs (anorexie, diarrhée), reproducteurs (chute de ponte) et enfin généraux avec une léthargie, des plumes ébouriffées, ou des troubles nerveux, menant à la mort dans les cas les plus graves (Longbottom and Coulter, 2003; Vanrompay, 2020). *C. psittaci* est répandue mondialement, y compris dans les élevages européens (Vanrompay, 2020), et notamment dans les élevages de canards où la circulation y est généralisée et très majoritairement asymptomatique (Hulin, 2016; Sraka, 2004; Vorimore et al., 2015). Il faut noter que cette infection à *C. psittaci* est réglementée par l'OIE seulement pour le commerce de Psittaciformes (OIE, 2021e), et qu'aucun vaccin efficace n'est utilisé couramment (OIE, 2018a). L'infection était aussi classée en France jusqu'en avril 2021 comme danger sanitaire de deuxième catégorie (DGAL, 2013), aujourd'hui catégorisée DE par la LSA à l'échelle européenne (Commission Européenne, 2018). Elle est donc soumise à déclaration obligatoire, surveillance et certification, faisant l'objet d'un plan de lutte collective. L'infection est aussi identifiée comme maladie professionnelle pour les personnels d'élevages ou d'abattoirs aviaires en particulier (Laroucau et al., 2009; Longbottom and Coulter, 2003; Vorimore et al., 2015). En effet, il est nécessaire de limiter et surveiller leur circulation car en théorie n'importe laquelle des souches de *C. psittaci* peut infecter les personnes en contact rapproché des oiseaux (éleveurs, travailleurs en filière volaille, propriétaires d'oiseaux d'ornement ou de basse-cour) par inhalation directe ou indirecte. Si l'infection humaine est généralement asymptomatique, elle peut parfois causer des fièvres, maux de tête, douleurs musculaires et articulaires ou signes respiratoires très invalidants (Cheong et al., 2019; Longbottom and Coulter, 2003). Les transmissions interhumaines ne sont pas décrites. Outre les oiseaux d'élevage chez lesquels le confinement et la vie en groupe favorisent les transmissions, *C. psittaci* est capable d'infecter une grande variété d'oiseaux sauvages. La bactérie se trouvent hébergée en particulier chez les espèces aquatiques (Anseriformes, Charadriiformes, Suliformes) mais aussi des espèces commensales comme les Columbiformes ou bien certains Passériformes à des prévalences parfois importantes (Kaleta and Taday, 2003; Krawiec et al., 2015; Pennycott, 2016; Sharples and Baines, 2009; Szymańska-Czerwińska et al., 2017). Ainsi, par son spectre

d'hôte, sa présence fréquente, ses géotypes bien identifiés, sa persistance environnementale et tissulaire et ses voies de transmission, *C. psittaci* semble être un bon candidat pour l'étude de marqueurs de transmission de VIA. Dans une moindre mesure, toutes les espèces de chlamydia seront intéressantes à étudier à l'interface sauvage-domestique, puisque ces autres espèces sont largement sous-étudiées en dehors de leurs hôtes primaires du fait du grand nombre d'infections inapparentes (Cheong et al., 2019; Kaleta and Taday, 2003; Pennycott, 2016; Thomas, 2007; Vanrompay, 2020). L'intérêt croissant pour les maladies de la faune sauvage, ainsi que le développement des techniques de biologie moléculaire ont permis récemment de multiplier les identifications de souches ou de tropismes atypiques parmi les *Chlamydiaceae*. C'est ainsi que *C. ibidis* a été identifiée chez des ibis de différentes espèces (Li et al., 2020; Vorimore et al., 2013), mais aussi que des espèces présumées spécifiques de mammifères (Homme ou animaux domestiques) ont été détectées chez des oiseaux captifs ou commensaux : *C. pneumoniae* (Frutos et al., 2015), *C. trachomatis* (Krawiec et al., 2015; Sachse et al., 2012), *C. pecorum* (Sachse et al., 2012), *C. abortus* (Sachse et al., 2012; Szymańska-Czerwińska et al., 2017). Cette dernière espèce semble comporter une grande diversité de souches aviaires jusqu'alors confondues avec *C. psittaci* dont elle est très proche génétiquement. Cette proximité a conduit à différentes tentatives de mises au point de méthodes de discrimination moléculaires (Opota et al., 2015; Pantchev et al., 2009), et a plus récemment été mise en évidence par les études de séquençage génétique (Longbottom et al., 2021).

Détection des chlamydias

Les méthodes de détection se basent encore parfois sur des techniques classiques : coloration de tissus ou d'écouvillons infectés, ou bien cultures bactériennes qui doivent être réalisées sur cellules ou sur œufs embryonnés pour ce genre intracellulaire strict (OIE, 2018a). Etant donné le caractère zoonotique potentiel de l'ensemble des chlamydia, toute manipulation de matériel infectieux doit être réalisée a minima dans un laboratoire confiné de niveau 2, et de niveau 3 si la présence d'une souche de *C. psittaci* aviaire est suspectée (DGAL et al., 1994). Il existe également des tests sérologiques ELISA ou par fixation du complément, mais ils sont peu utilisés en diagnostic de routine étant données les prévalences importantes, associées à un fréquent portage asymptomatique prolongé et à une réponse immunitaire durable de plusieurs mois (OIE, 2018a; Vanrompay, 2020). L'identification des chlamydia détectées était réalisée par des méthodes antigéniques historiquement (sérovirs), mais qui sont aujourd'hui largement surpassées en efficacité par la biologie moléculaire (OIE, 2018a; Vanrompay, 2020). Celles-ci reposent sur différentes approches plus ou moins discriminantes permettant de détecter puis distinguer les espèces voire les géotypes de chlamydia. La distinction d'espèces peut être réalisée à partir des séquences d'ARNr 16S et 23S, du fragment intergénique 16S-23S, du gène *rnpB*, du gène *ompA*, ou de l'ensemble de ces séquences par typage multi-locus (MLST) (Amery-Gale et al., 2020; OIE, 2018a; Vanrompay, 2020). L'utilisation de puce à ADN est aussi jugée efficace (Ehrlich et al., 2006; OIE, 2018a).

Différentes variations de techniques basées sur la PCR ont aussi été proposées pour différencier ou cibler des espèces ou des génotypes particuliers (OIE, 2018a) : PCR avec polymorphisme de longueur du fragment de restriction (RFLP) (Everett and Andersen, 1999), PCR suivie d'analyse haute résolution de la courbe de fusion (HRM) (Vorimore et al., 2021), ainsi que des PCR ou qPCR spécifiques qui permettent d'allier directement détection et identification (Vanrompay, 2020). Généralement, les analyses de diagnostic courantes se basent donc aujourd'hui sur la biologie moléculaire rapide et sensible, à partir d'écouvillons oropharyngés de préférence (OIE, 2018a). À ceux-ci peuvent être associés des écouvillons cloacaux étant donné le tropisme digestif reconnu des chlamydia (Hulin et al., 2016), ainsi que tout exsudat ou tissu lésionnel en cas de signes visibles. Comme les chlamydias sont capables de persister dans l'environnement, des prélèvements de matières telles que la poussière, les fèces, les plumes ou l'eau peuvent apporter des informations sur la contamination environnementale et la transmission indirecte. La PCR ou qPCR peut alors être réalisée sur l'ADN extrait en ciblant une séquence conservée du gène 23S de l'ensemble des chlamydia (Ehrlich et al., 2006). On pourra ensuite confirmer l'identification de l'espèce en cause par une PCR spécifique, un séquençage *ompA*, ou plus résolument avec un typage par MLST, par HRM, ou par puce à ADN (OIE, 2018a).

iii. Mycoplasmes aviaires

Étiologie, épidémiologie, phylogénie et pathogénie

Les bactéries du genre *Mycoplasma* (mycoplasmes) de la classe des *Mollicutes* sont un groupe très varié (plus de 120 espèces) (Figure 13) qui peut être trouvé sur des hôtes très divers tels que les oiseaux, mammifères, insectes ou végétaux. Ces bactéries sont génétiquement et métaboliquement minimalistes, étant reconnues comme les plus petits organismes auto-réplicatifs (Citti and Blanchard, 2013). Une caractéristique de certains mycoplasmes est leur capacité à échanger des gènes horizontalement entre souches et espèces par transferts chromosomiques (Citti et al., 2020, 2018; Dordet-Frisoni et al., 2019). Leur évolution se fait donc de manière non linéaire, et notamment certaines souches peuvent constituer un réservoir génétique pour l'adaptation d'autres souches à de nouveaux hôtes ou pour leur faire gagner en pathogénicité. Leur structure est seulement protégée par une membrane plasmique, ce qui leur confère une sensibilité aux antibiotiques et des besoins nutritifs complexes (Ferguson-Noel et al., 2020). La majorité des mycoplasmes sont relativement spécifiques d'hôtes, bien que certaines espèces soient identifiées sur divers hôtes grâce à leur variété de souches. Aucune transmission zoonotique de mycoplasmes aviaires n'est ainsi rapportée. Ils colonisent les surfaces des muqueuses, et certaines espèces notamment les plus pathogènes sont capables de pénétrer les cellules hôtes (Ferguson-Noel et al., 2020). Les espèces pathogènes principales d'intérêt sanitaire pour les volailles galliformes sont *Mycoplasma gallisepticum* (MG) et *M. synoviae* (MS), qui ont fait l'objet de l'essentiel des recherches historiques, mais des maladies dues à *M. meleagris* ou *M. iowae* sont aussi rapportées en élevages. Chez

les Ansériformes, ce sont plutôt les espèces *Mycoplasma anatis*, *M. anseris* et *M. cloacale* qui peuvent être pathogènes (Ferguson-Noel et al., 2020; Gróznier et al., 2018). Etant donnée la grande variété de mycoplasmes et leur distribution mondiale, de nombreuses autres espèces ont été caractérisées suite à des observations symptomatiques dans diverses espèces d'Ansériformes ou de Galliformes d'élevage (Ferguson-Noel et al., 2020). Leur présence est aussi détectée dans l'avifaune sur des hôtes très variés, avec une immense diversité de souches plus ou moins spécifiques de groupes d'espèces et souvent non pathogènes. Ces mycoplasmes d'hôtes sauvages restent encore très majoritairement non caractérisés taxonomiquement (Sawicka-Durkalec et al., 2021; Sumithra et al., 2013).

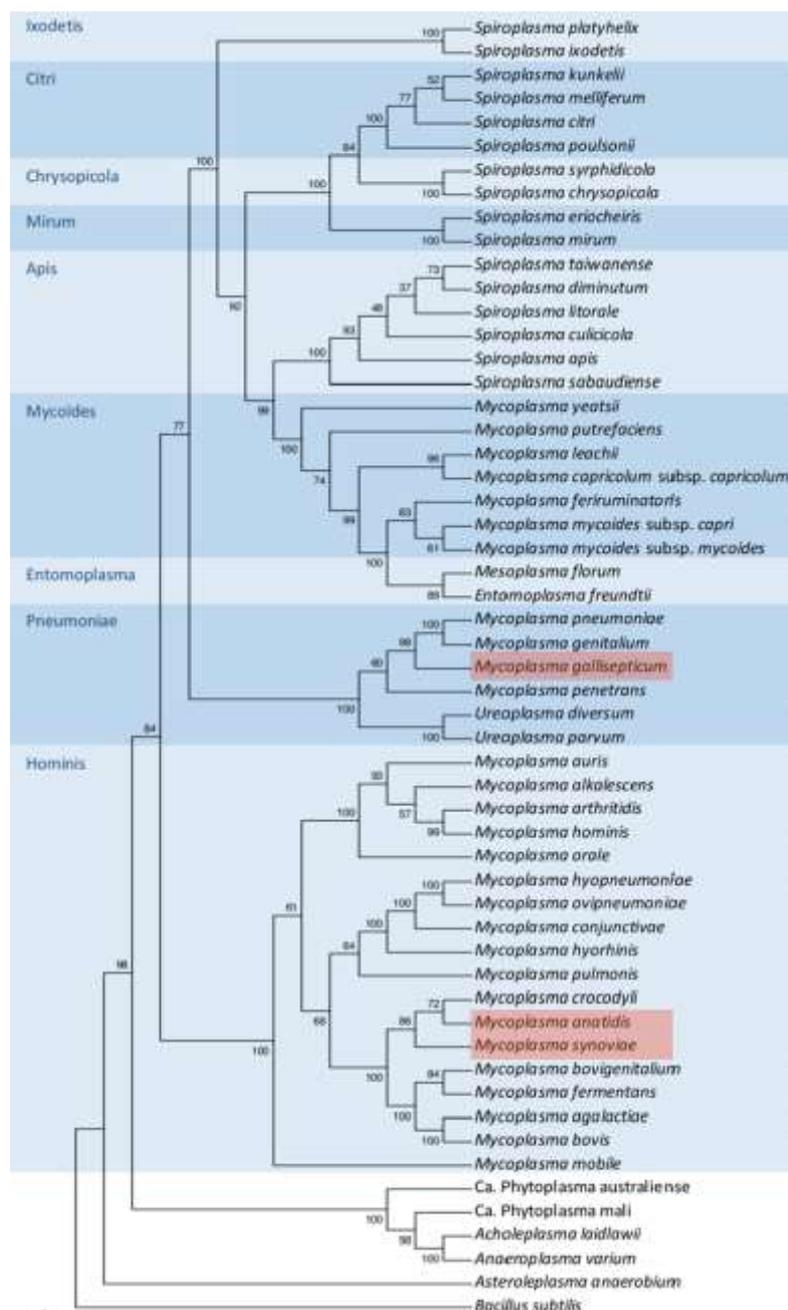


Figure 13 - Phylogénie des principaux Mollicutes.

L'arborescence est basée sur la séquence d'ARNr 16S. Les dénominations des groupes phylogénétiques sont indiquées à gauche, La sélection des quelques espèces capables d'infecter les oiseaux est surlignée en rouge. Issue de Citti et al., 2018.

Les infections à MG sont souvent inapparentes chez les Galliformes, mais peuvent se révéler symptomatiques en présence d'une souche plus fortement pathogène pour l'espèce atteinte (particulièrement chez les dindes ou gibiers plus sensibles), ou bien en cas de stress ou de coinfections. Le tropisme de la bactérie est respiratoire, avec des signes typiques de maladie respiratoire chronique pouvant s'aggraver en coryza, conjonctivite, sinusite, impliquant en cascade des chutes de production (viande ou œufs). Concernant MS, le tropisme est plus varié et la maladie peut comporter des signes respiratoires mais aussi des synovites et des altérations des œufs. Pour ses potentielles conséquences sanitaires et économiques, et comme elle est plus généralement répandue, MG est listée à l'OIE (OIE, 2021f) pour qualifier le statut indemne à l'échelle de l'exploitation. Ce statut est particulièrement géré dans les exploitations de reproducteurs, potentiellement par des vaccins vivants ou inactivés (Ferguson-Noel et al., 2020; OIE, 2021g). Il n'y a pas de contraintes particulières de confinement et biosécurité pour les manipulations de mycoplasmes en laboratoire. La classification sanitaire à l'échelle européenne concerne toute mycoplasmoses, catégorisées DE donc soumises à obligation de déclaration, de surveillance et de certification (Commission Européenne, 2018).

La transmission de MG et MS peut se faire de manière verticale, ce qui justifie les mesures de contrôle dans les élevages reproducteurs. L'essentiel des transmissions est cependant horizontal, direct et indirect, permettant de proche en proche une infection rapide de tout un groupe. Les voies d'entrée sont essentiellement l'inhalation ou le contact conjonctif avec des bactéries en suspension, ce qui est évidemment favorisé par la densité du groupe. Malgré une excrétion fécale potentiellement importante, la transmission fécale-orale de MG semble bien moins favorable aux contaminations (Dhondt et al., 2007; Macowan et al., 1983). Les transmissions indirectes sont limitées par la survie de seulement quelques jours des mycoplasmes dans l'environnement (Ferguson-Noel et al., 2020), mais elles restent certainement non négligeables dans des situations de fortes fréquence et durée de contact ou dans des conditions environnementales favorables. Les individus infectés de manière chronique excréant en permanence des bactéries constituent donc l'essentiel des sources de contamination. Des transmissions de mycoplasmes à l'interface entre avifaune sauvage et élevages ont été rapportées. La plus étudiée car remarquable est l'émergence depuis des élevages de dindes aux Etats-Unis depuis les années 1990 d'une souche de MG causant une épidémie en extension géographique au sein des passereaux commensaux des élevages et des mangeoires. L'espèce particulièrement affectée et qui a donné son nom à la souche est le Roselin familial (« House finch », *Haemorrhous mexicanus*), chez qui ce MG semble montrer des signes d'adaptation, mais de nombreuses autres espèces ont été découvertes infectées symptomatiques ou non. Des « spillbacks » vers les élevages ont aussi été décrits (Ley et al., 2016). Des études plus récentes de phylogénie détaillée au sein des MG ont aussi permis de démontrer des probables échanges passés de souches entre compartiments sauvage et domestique (Bekó et al., 2019). MG est ainsi le mycoplasme au plus large spectre d'hôtes sauvages connu, et qui a été détecté par PCR ou culture chez des Galliformes,

Passériformes, Columbiformes, Accipitriformes ou encore Ansériformes (Sawicka et al., 2020). Parmi les autres espèces de mycoplasmes, leur moindre connaissance rend compliquée la mise en évidence de transmissions à ces interfaces, et elles pourraient être impliquées dans des mycoplasmoses faiblement pathogènes non élucidées (Ferguson-Noel et al., 2020; Sawicka et al., 2021). On sait cependant que certaines espèces sont détectées dans les deux compartiments indépendamment et sans plus de précision sur les liens phylogéniques, comme par exemple MS, *M. gallinaceum*, *M. gallinarum*, *M. pullorum*, *M. iners*, ou *M. anatis* connus pour infecter les volailles et identifiés dans l'avifaune (Poveda et al., 1990; Sumithra et al., 2013), ou bien *M. anserisalpingtonis* et d'autres espèces non identifiées, détectées chez des oies domestiques et sauvages (Sawicka et al., 2021).

Détection des mycoplasmes

La culture des mycoplasmes est difficile et fastidieuse, en particulier à partir de prélèvements biologiques parfois contaminés par d'autres bactéries. Cependant, la culture et l'isolement restent incontournables lorsqu'il s'agit de caractériser les capacités infectieuse et métabolique d'une bactérie présente dans un échantillon. Pour la recherche ou le diagnostic clinique rapide et sensible, les méthodes de biologie moléculaire ont donc pris le dessus sur les techniques de bactériologie classique (Ferguson-Noel et al., 2020; OIE, 2021g). Ainsi, l'ensemble des mollicutes peut être révélé par qPCR ciblant une séquence conservée de l'ARNr 16S (van Kuppeveld et al., 1994), ou bien des qPCR ou PCR ciblent certaines espèces particulières et notamment les plus étudiées (García et al., 2005; Kahya et al., 2010; Lauerman, 1998; Raviv and Kleven, 2009). Ces PCR spécifiques peuvent être utilisées aussi pour séquencer et typer les souches détectées (Hong et al., 2004). Le typage et la phylogénie peuvent aussi être établis sur d'autres séquences plus homologues entre espèces de mycoplasmes, ou par d'autres méthodes. Ainsi, l'identification et la phylogénie sont fréquemment basées sur des séquences complètes ARNr 16S et intergénique 16S-23S (Ferguson-Noel et al., 2020). Pour la distinction de souches au sein des espèces, les méthodes de séquençage de génome complet ou de loci particuliers (par exemple séquence intergénique 16S-23S, gène *rpoB* ou autres gènes codants des protéines), ou encore le typage MLST (Bekó et al., 2019) peuvent être utilisés (Ferguson-Noel et al., 2020; OIE, 2021g). Les prélèvements de choix pour la détection de MG ou MS sont les écouvillons oropharyngés ou trachéaux (OIE, 2021g), mais les mycoplasmes sont aussi fréquemment détectés à partir d'écouvillons cloacaux qu'il est donc intéressant d'utiliser aussi pour améliorer les chances de détection. De plus, dans une optique d'explorer l'ensemble des potentiels mycoplasmes portés par l'avifaune et les oiseaux d'élevage, les deux types de tropismes sont intéressants à étudier pour les modes de transmission qu'ils représentent. Finalement, MG ou d'autres mycoplasmes pourraient représenter des marqueurs de transmission intéressants pour les VIA, de par leur potentiel large spectre d'hôte, leur transmission révélant des contacts intenses, et leurs possibilités de génotypages de souches menant à des phylogénies détaillées.

Étiologie, épidémiologie, phylogénie et pathologie

Historiquement, une infection à coronavirus causant des signes respiratoires et rénaux associés à une dépression générale était connue chez les volailles galliformes (poulet en particulier), nommée bronchite infectieuse et causée par le virus du même nom (IBV). Celui-ci est classé dans l'espèce *Avian coronavirus* (AvCoV) dans le sous-genre des *Igacovirus* du genre des *Gammacoronavirus* et de la sous-famille des *Orthocoronavirinae* (les coronavirus) (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021). Des affections entériques à coronavirus causant des pertes chez les jeunes et les reproducteurs des élevages de dindes ont aussi été étudiées, et l'agent en cause alors identifié comme le coronavirus de dinde (TCoV), proche parent de l'IBV dans l'espèce AvCoV (Cavanagh, 2005; Guy, 2020). Depuis l'émergence zoonotique du SARS-coronavirus (genre des *Betacoronavirus*) en 2002, l'intérêt de la communauté scientifique pour les réservoirs animaux de coronavirus s'est largement développé, y compris chez les oiseaux. Les recherches menées sur de vastes diversités d'hôtes ont permis de caractériser de nombreuses nouvelles espèces de coronavirus sur de nouveaux hôtes. On sait aujourd'hui que les oiseaux domestiques et sauvages sont hôtes réservoirs (asymptomatiques et à des prévalences élevées) d'une grande diversité de coronavirus parmi les genres *Gammacoronavirus* et *Deltacoronavirus* (Cavanagh, 2005; Miłek and Blicharz-Domańska, 2018; Wille and Holmes, 2020a; Woo et al., 2012) (Figure 14). Aucun des coronavirus aviaires n'est rapporté comme zoonotique, mais la manipulation de ces virus en laboratoire requiert une biosécurité de niveau 2 (DGAL et al., 1994), et l'infection à IBV est listée dans le Code Terrestre de l'OIE pour le statut des établissements et les échanges commerciaux d'animaux vivants (OIE, 2021h). La bronchite infectieuse n'est pas catégorisée en France ni en Europe, et ne fait donc pas l'objet d'une lutte collective particulière (Commission Européenne, 2018). Dans les filières et régions affectées par l'IBV, des protocoles vaccinaux commerciaux existent avec des souches vivantes atténuées ou des virus inactivés, dont le sérotype doit être homologue aux souches potentiellement circulantes (OIE, 2018b).

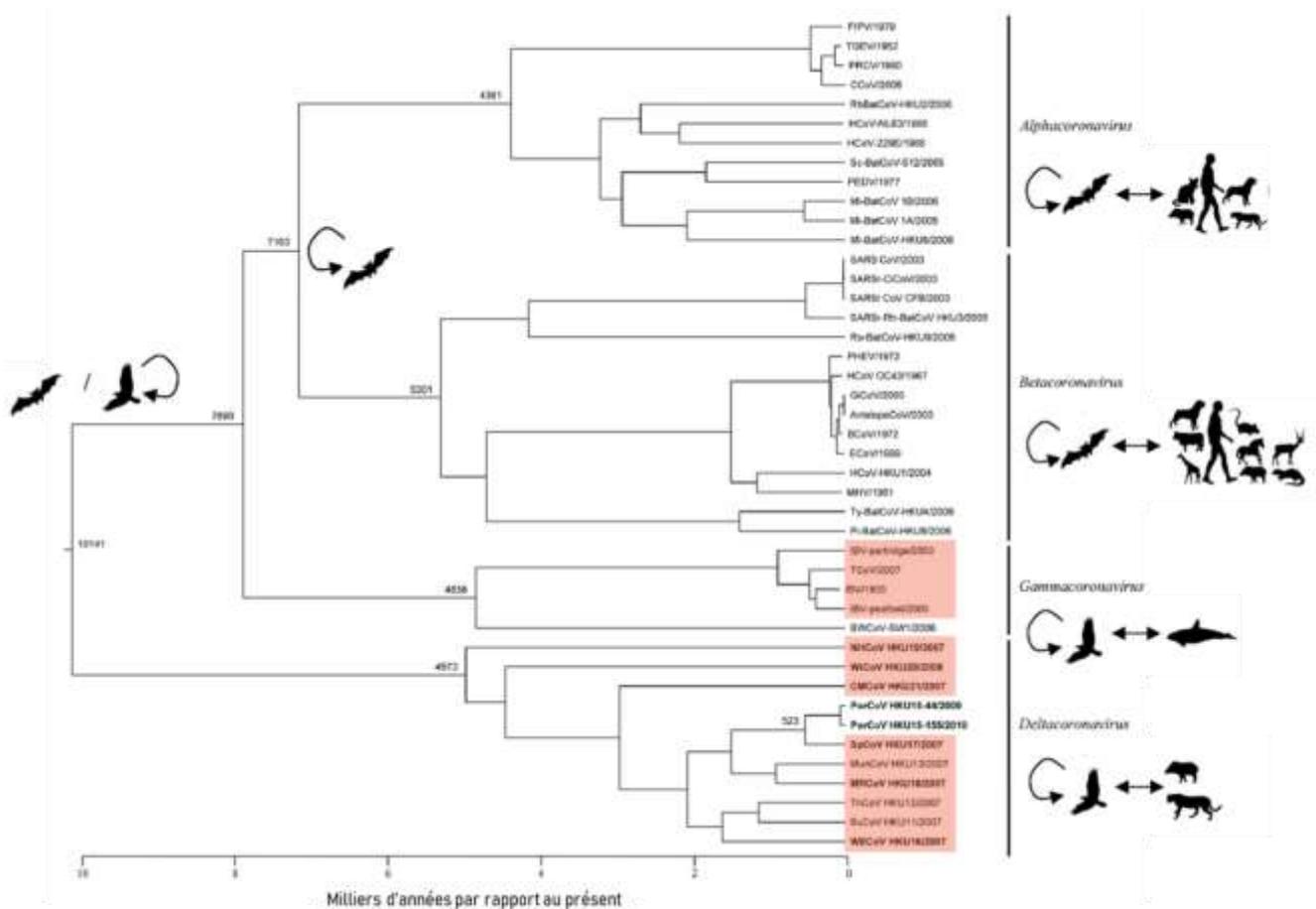


Figure 14 - Phylogénie, horloge moléculaire et hôtes primaires des différents genres des *Orthocoronavirinae*.

Phylogénie basée sur la séquence du gène RdRp (incluse dans l'ORF1b) homologue entre les coronavirus. Les hôtes de maintenance primaires sont figurés par une flèche circulaire, et les transmissions secondaires ou accidentelles par des flèches droites. Les espèces ou souches circulant chez les oiseaux sont surlignées en rouge. *Issue et adaptée de Woo et al., 2012.*

Les coronavirus aviaires forment des particules virales sphériques enveloppées d'environ 120nm de diamètre, structurées par quatre protéines. Le génome est un segment unique linéaire d'ARN simple brin polarisé positivement et d'environ 25 kb (pour les *Deltacoronavirus*) à 30 kb (pour les *Gammacoronavirus*), dont la structure et la traduction sont complexes (Figure 15) (Jackwood and de Wit, 2020; Zhou et al., 2021). Comme pour les VIA et les avulavirus, la composition en ARN du génome entraîne une relative facilité de mutations lors de la réplication virale, ce qui permet une évolution rapide des coronavirus, qui est de plus accrue par des événements de recombinaison entre souches coinfectantes (Zhou et al., 2021). La protéine de spicule (S) est l'antigène principal des coronavirus, cible des anticorps ainsi que des tests de diagnostic immunologiques, et centre de la dérive antigénique (Zhou et al., 2021). Les coronavirus sont hémagglutinants en présence de neuraminidase additionnelle, ce qui peut être exploité pour le diagnostic (Jackwood and de Wit, 2020). La structure enveloppée des coronavirus entraîne une relative sensibilité aux facteurs environnementaux et aux agents chimiques désinfectants, mais tout comme pour les VIA des conditions humides et de basses températures pourraient permettre une persistance environnementale de quelques semaines au moins (Jackwood and de Wit, 2020).

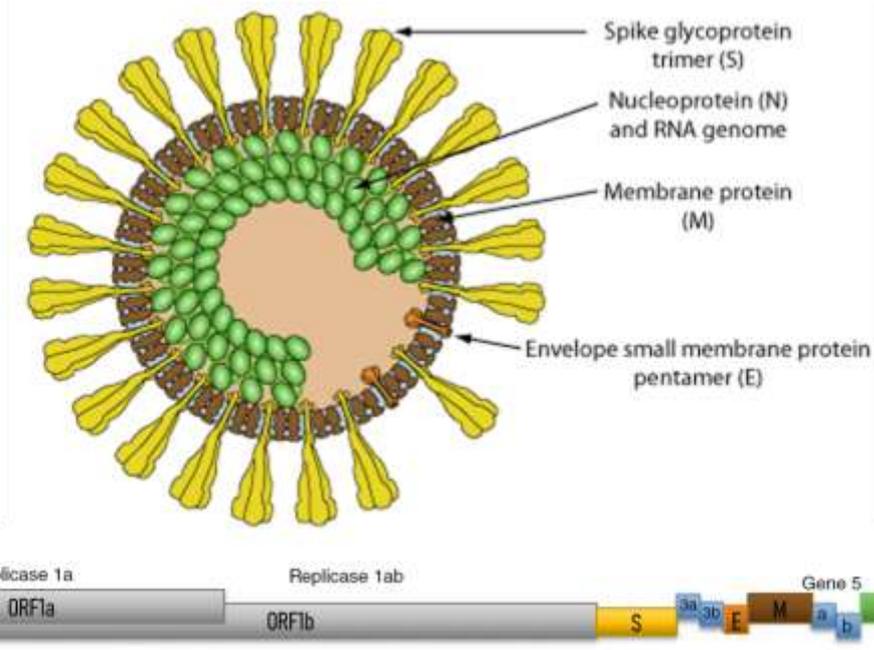


Figure 15 - Schéma d'une particule typique d'IBV et de la composition du génome.

L'ensemble est composé d'un segment unique d'ARN simple brin positif, ainsi que de quatre protéines. La glycoprotéine de surface S (spicule) participe à l'attachement et à la pénétration dans la cellule hôte. Les protéines E (enveloppe) et M (membrane) structurent l'enveloppe virale. Le génome viral est encapsidé par la protéine N (nucléoprotéine). *Virion issu de ViralZone (<https://viralzone.expasy.org/767>), 2021, et génome issu et adapté de Jackwood and de Wit, 2020.*

Le coronavirus le mieux étudié est l'IBV, hautement contagieux, avec une période d'incubation de quelques heures ou jours et une transmission exclusivement horizontale par des voies de transmissions identiques aux VIA : respiratoire, et fécale-orale directe ou environnementale. Le tropisme pathogène est plutôt respiratoire, mais l'IBV peut être excrété par voie digestive également. Cette excrétion peut parfois être détectée durant plusieurs mois dans les formes chroniques d'infection, avec probablement soit une réinfection continue par l'environnement associée à une mauvaise immunisation, soit une persistance et réactivation au niveau des caeca ou des reins (Jackwood and de Wit, 2020). L'épidémiologie des autres coronavirus aviaires est bien moins connue étant donné leur découverte plus récente, mais les niveaux et dynamiques de prévalences observés dans les populations d'Anatidés sauvages laissent penser à des excrétions chroniques digestives similaires (Jonassen et al., 2005; Wille et al., 2015). Dans ces populations réservoirs on observe en outre une forte association de la dynamique épidémiologique des coronavirus et des VIA, ce qui montre leurs similarités dans les modes de transmission et de persistance. Les Ansériformes sauvages constituent ainsi le réservoir majeur connu à ce jour pour les coronavirus aviaires, essentiellement des *Gammacoronavirus* de l'espèce *Duck coronavirus 2714* (DCoV) (Wille and Holmes, 2020a) mais aussi des *Deltacoronavirus*, qu'ils sont capables tout comme les VIA de déplacer dans le monde entier au gré des migrations (Muradrasoli et al., 2010; Rahman et al., 2021; Wille et al., 2015; Wille and Holmes, 2020a). La phylogénie comparée des souches détectées dans les populations d'Ansériformes sauvages et dans les autres espèces sauvages et domestiques montre des échanges viraux avec diverses espèces aquatiques (Charadriiformes, Suliformes, Péléciformes) et avec les populations

d'Anseriformes domestiques. Des « spillovers » depuis les Galliformes domestiques de souches de l'espèce AvCoV (notamment l'IBV) ont été identifiés chez les Anseriformes domestiques et sauvages (Pauly et al., 2019; Wille and Holmes, 2020a; Zhuang et al., 2015), ainsi que chez diverses autres espèces sauvages aquatiques et terrestres (Miłek and Blicharz-Domańska, 2018; Wille and Holmes, 2020a).

Détection des coronavirus

Les méthodes de détection et diagnostic sont similaires à celles décrites précédemment pour les autres virus. Les prélèvements de choix pour l'IBV sont les écouvillons trachéaux et oropharyngés, mais le tropisme digestif et urinaire en phase chronique peut aussi orienter vers des écouvillons cloacaux (Jackwood and de Wit, 2020; OIE, 2018b). Dans une optique d'étudier l'ensemble des coronavirus et en particulier ceux qui concernent les Anseriformes, les prélèvements cloacaux seront primordiaux. Ceux-ci pourront éventuellement être complétés par des prélèvements de fèces ou environnementaux (poussière, eau) frais dans lesquels les chances de détection de coronavirus ou du moins de leur ARN sont brèves mais utiles pour l'information des voies de transmissions infectieuses indirectes. Si les cultures virales à partir d'œufs embryonnés ou de coupes de trachées (TOC) sont toujours nécessaires pour caractériser l'infectiosité d'un échantillon et isoler une souche virale, la biologie moléculaire est aujourd'hui au centre des techniques de diagnostic direct (Jackwood and de Wit, 2020; OIE, 2018b). L'immunologie notamment par des kits ELISA commerciaux pour l'IBV est aussi utilisée, dans le cadre de la surveillance pré ou post-vaccinale en particulier. Les cibles des RT-PCR et RT-qPCR pour la détection et le séquençage sont variées, ciblant des régions conservées du génome pour l'ensemble des coronavirus (gène RdRp dans l'ORF1b ou région 5'-UTR par exemple (Chamings et al., 2018)) ou pour une espèce particulière comme l'IBV (OIE, 2018b). L'identification et la phylogénie des souches détectées se fait ensuite sur la base de la séquence RdRp, sur le gène S complet, voire sur le génome complet (Woo et al., 2012, 2009). Les outils de métagénomique par séquençage à haut débit sans *a priori* ont récemment permis d'élargir énormément les connaissances sur les souches et hôtes de coronavirus (Liais et al., 2014; Ramírez-Martínez et al., 2018; Wille et al., 2019). L'épidémiologie et l'écologie des coronavirus aviaires similaires à celles des VIA, ainsi que les références génétiques grandissantes pour les identifier, font de ces virus de bons marqueurs de transmission à l'interface entre élevages et avifaune sauvage.

II. Méthodes d'étude des interfaces entre avifaune et élevages

a. Étude des dynamiques spatiales et temporelles

Les agents infectieux présentés dans le précédent chapitre sont tous partagés entre compartiments domestique et sauvage, soit avec un réservoir majoritairement domestique (MG, MS, *C. psittaci*, IBV), soit avec un réservoir majoritairement sauvage (VIA, coronavirus, avulavirus). Tant que les transmissions de ces agents aux interfaces sauvage-domestique existent, leur éradication stricte en est théoriquement impossible. Il est donc nécessaire de prendre en compte le compartiment sauvage dans le cadre des mesures de contrôle des agents infectieux partagés, d'autant plus si celui-ci est réservoir (Gortazar et al., 2015; Gortázar et al., 2007). L'étude des interfaces sauvage-domestique commence par connaître au sens large l'écologie des hôtes sauvages, qui pourra être analysée en regard de l'organisation spatiale et temporelle des élevages considérés.

i. Techniques d'étude des dynamiques spatiales et temporelles de populations

Dans l'avifaune, les études des dynamiques spatio-temporelles de population et des phénologies de migration existent depuis longtemps et sur des espèces variées (Newton, 2007a). Celles-ci utilisent historiquement des méthodes classiques et relativement simples techniquement, notamment les analyses de capture-marquage-recapture (CMR) passant par le marquage individuel (bagues métalliques ou colorées, marquages alaires...) dont le contrôle sera direct, soit visuel soit par recapture. Pour aboutir à des conclusions statistiquement robustes sur les dynamiques de population, ces méthodes reposent donc sur la densité du réseau de bagueurs et de personnes contrôleuses (bagueurs, ornithologues, chasseurs...), ainsi que sur des effectifs importants d'oiseaux marqués. À l'occasion de la capture initiale, l'avantage de ces méthodes est de pouvoir profiter des manipulations individuelles pour accumuler des informations biométriques, physiologiques, voire des prélèvements à visée d'étude complémentaire d'ordre géographique (rapports isotopiques dans les plumes), génétique ou infectieuse (FAO, 2007). Les techniques de capture de l'avifaune sont variables en fonction du milieu, de la taille et du comportement des espèces ciblées : des grandes trappes en entonnoir pour les Anatidés, aux filets japonais pour les passereaux, en passant par les filets projetés ou les lassos pour les espèces vives mais de grande taille (FAO, 2007). Cependant, une contrainte réglementaire majeure à dépasser avant toute capture est l'obtention d'une autorisation officielle, délivrée en France par le Centre de Recherche sur la Biologie des Populations d'Oiseaux (CRBPO) du Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN). Toutes les espèces d'oiseaux sauvages en Europe sont en effet protégées par la loi, et leur capture conditionnée par une justification scientifique et éthique complète, dont la préparation peut prendre plusieurs mois. Afin de ménager au mieux le comportement et la santé des oiseaux ciblés, les captures requièrent aussi des compétences théoriques et techniques bien spécifiques dont les détenteurs sont relativement peu nombreux. Outre les contraintes techniques et réglementaires citées, les captures demandent aussi un

investissement de temps et de personnel important, cela d'autant plus que les effectifs ciblés sont élevés (Coombe et al., 2021; FAO, 2007).

Ces dernières décennies le développement d'outils de télémétrie a permis des suivis fins et sensibles des déplacements individuels. La technologie la plus simple est celle reposant sur des émetteurs radio VHF équipés sur les animaux (au moyen de colliers, harnais ou colle), dont il faudra ensuite localiser la position directement sur le terrain à l'aide d'un boîtier récepteur connecté à une antenne radio (FAO, 2007). L'avantage de cette méthode est une extrême compacité du système qui permet de l'équiper sur une large gamme de poids d'espèces, jusqu'à quelques grammes à ce jour. En revanche, cette compacité implique généralement une courte durée de fonctionnement, limitée par la taille de la batterie embarquée dans l'émetteur. Un autre inconvénient est que les distances de détections sont de l'ordre de quelques centaines de mètres au plus, selon le type d'émetteur, ce qui nécessite un quadrillage dense de la zone d'étude pour localiser les individus équipés, soit par des récepteurs fixes enregistrant les données soit par des efforts humains importants à l'aide de récepteurs mobiles. Pour pallier cet inconvénient sur une technologie qui est la seule permettant le suivi des plus petites espèces de par sa compacité, le réseau international de récepteurs fixes MOTUS (<https://motus.org/>) se constitue depuis quelques années, parti d'une initiative canadienne et se diffusant peu à peu à d'autres continents. Outre la télémétrie VHF, depuis ces dernières décennies se développent des technologies de télémétrie satellitaire (GPS, Argos). À la différence de la première, celles-ci reposent sur des émetteurs connectés à des satellites, ce qui permet de suivre les mouvements sur de grandes distances et quasiment en instantané. Les systèmes GPS sont bien plus précis en localisation, de l'ordre de la dizaine de mètres quand les balises Argos sont localisées à la centaine de mètres près. Ce type d'émetteurs a une durée de fonctionnement généralement plus longue que les VHF, de quelques mois à années, mais leur poids reste encore bien supérieur ce qui les réserve à des espèces de taille moyenne à grande (au-delà de 60 g environ) (FAO, 2007). La miniaturisation des technologies progresse cependant rapidement, et leur usage reste relativement adapté pour la gamme de poids de l'avifaune aquatique qui intéresse particulièrement les études d'agents infectieux partagés avec les élevages (FAO, 2007). Bien que ces technologies de balises soient coûteuses ce qui peut limiter le nombre d'individus étudiés, le comportement grégaire des Ansériformes et d'autres groupes taxonomiques permet d'extrapoler avec confiance des dynamiques globales à partir de quelques balises (Cappelle et al., 2011). Au-delà du caractère instantané de la récolte des données, ce type de technologie renseigne bien plus en détail les déplacements que les méthodes classiques de CMR ou de télémétrie VHF. Ces dernières restent cependant utiles car de faible coût, adaptables à toutes espèces, et la CMR en particulier s'appuie sur un historique long de données comparatives permettant d'évaluer des évolutions dans les dynamiques de populations inférées.

ii. Analyse et coordination globale des données écologiques de l'avifaune

Grâce aux différents outils permettant le suivi de déplacements individuels, des modélisations prévisionnelles des mouvements migratoires à l'échelle de populations peuvent être faites. Les résultats peuvent en être affinés au fur et à mesure que des données sont récoltées. Parmi ces modélisations de migrations, on peut notamment citer en Europe le Migration Mapping Tool (<https://euring.org/research/migration-mapping-tool>) supporté par la Commission Européenne et l'EFSA et développé par l'organisme EURING (European Union for Bird Ringing). Cet outil de modélisation est ciblé sur quelques espèces d'oiseaux aquatiques migrateurs réservoirs de VIA. Il permet de visualiser de manière interactive en ligne l'évolution saisonnière habituelle des aires de répartition globales, et ainsi d'anticiper les régions européennes où risqueraient d'arriver d'éventuelles souches détectées dans les régions de nidification (EFSA et al., 2021b; Veen et al., 2007). Dans la même idée, mais pour toutes espèces aviaires et basé sur des données de marquage et contrôles visuels, l'outil Vogeltrekatlas (<https://vogeltrekatlas.nl/>) a été développé par le Vogeltrekstation (centre hollandais pour la migration et la démographie des oiseaux). Dans un objectif de connaître l'écologie du réservoir sauvage des VIA, des études ont été réalisées par des équipes de recherche pour caractériser les déplacements individuels de l'avifaune aquatique, à des échelles de populations plus modestes mais tout aussi utiles. Par exemple, des suivis par satellite de diverses espèces d'Anseriformes migratrices et sédentaires en Afrique et en Asie (Bridge et al., 2014; Gaidet et al., 2010) ont permis de mettre en évidence des voies de migration et des sites de rassemblement à risque pour les déplacements et échanges de VIAHP. À plus petite échelle, un suivi satellitaire de canards à bosse (*Sarkidiornis melanotos melanotos*) dans le delta intérieur du Niger (Cappelle et al., 2011) a permis de caractériser spatio-temporellement l'interface et les risques de contacts entre cette espèce et les volailles de la région. Dans un même objectif de modéliser régionalement les zones et périodes à risque de contacts entre avifaune et volailles, une autre équipe a suivi par télémétrie satellitaire des sarcelles à ailes bleues (*Spatula discors*) aux Etats-Unis (Humphreys et al., 2021). La superposition de ces différentes échelles d'étude, les régionales complétant les continentales voire mondiales, est certainement un bon moyen pour appréhender au mieux la diversité des déplacements et comportements de l'avifaune. C'est dans ce but qu'a été développé le réseau international de télémétrie satellitaire ICARUS (pour International Cooperation for Animal Research Using Space, <https://www.icarus.mpg.de/>) permettant la coordination d'un nombre croissant d'études et de leurs résultats à l'échelle mondiale. Leur coordination passe aussi par la publication des données sur une base de données télémétriques (toutes technologies) en libre accès en ligne : Movebank (<https://www.movebank.org/>).

Il est important de maintenir ces suivis des dynamiques de populations et de mouvements migratoires de l'avifaune, car ceux-ci sont variables d'une espèce voire d'un individu à l'autre, et d'une année à l'autre (Newton, 2007a). De plus, en dehors de la période de reproduction, des déplacements de population

importants peuvent se produire sur l'ensemble de l'aire géographique, au gré des conditions météorologiques et des ressources alimentaires (Guillemain et al., 2021). Les outils de modélisation ont pu lier de tels mouvements opportunistes et les foyers consécutifs de VIA en élevage à des facteurs environnementaux de l'habitat (Yoo et al., 2021), comme par exemple des chutes de pluie abondantes dans une région donnée (Ferenczi et al., 2021). Mais ces facteurs environnementaux favorables sont complexes et encore incomplètement connus, et les multiples méthodes d'études existantes aujourd'hui doivent permettre de les suivre de près à l'échelle régionale voire continentale afin d'améliorer les prévisions de mouvements (donc de risque de transmissions infectieuses). Des outils de visualisation en temps réel des distributions de chaque espèce existent aujourd'hui pour suivre ces évolutions et ajuster au mieux les prévisions. Notamment pour l'ensemble de l'Europe, l'outil Euro Bird Portal (<https://eurobirdportal.org/>) est développé par l'association European Bird Census Council (EBCC) en partenariat avec les organisations ornithologiques nationales et régionales, et soutenu financièrement par l'EFSA pour la prévention des VIAHP. Ce dispositif rassemble l'ensemble des bases de données en ligne européennes, composées de simples mais multiples observations ornithologiques participatives, ce qui permet une visualisation directe et interactive en ligne de la distribution d'un très grand nombre d'espèces d'oiseaux.

b. Étude écologique des interactions à l'interface avifaune-élevages

Si les études écologiques régionales permettent d'évaluer le risque de présence de certaines espèces à l'interface avec les élevages, la présence d'une espèce même en nombre et fréquence importants dans une zone d'élevage ne signifie pas forcément que celle-ci participe à des contacts potentiellement infectieux. Elle peut en effet se trouver attirée par des habitats bien distincts de ceux des élevages. Afin de mieux préciser quelles espèces de l'avifaune peuvent participer aux contacts à l'interface avec les élevages avicoles, il convient donc d'établir leur répartition et leurs comportements à proximité directe des volailles ou de leur environnement. Ce type d'études vient généralement vérifier, objectiver et préciser les observations informelles faites par les éleveurs au quotidien sur leur exploitation. Elles permettent notamment de caractériser dans le contexte particulier des élevages étudiés les espèces commensales en contact plus intense, et les conditions favorables à certains contacts particulièrement à risque (comportement, type d'espèce, abondance).

i. Inventaires de l'avifaune à l'interface

Dans un premier temps, l'avifaune fréquentant les élevages étudiés peut être recensée pour comprendre son abondance et son usage des sites concernés, permettant de caractériser des espèces d'intérêt épidémiologique plus particulier. Ce recensement constitue la base des études ornithologiques classiques

et peut être réalisé avec des méthodes simples d'observation directe, qui sont reproductibles et comparables entre différents milieux (Johnson, 2008; Veen et al., 2007; Whitman et al., 1997). Ces observations sont généralement faites à l'aide de jumelles pour une identification plus précise des espèces voire des sexes et âges, et peut être couplée à un recensement par écoute des cris et chants permettant notamment de repérer les espèces plus cryptiques. En revanche, ce travail requiert des connaissances et compétences ornithologiques bien particulières. Un investissement long sur le terrain souvent par sessions consécutives est aussi généralement requis pour mener à un recensement le plus représentatif possible de la population présente, et ce éventuellement à différentes périodes de l'année. Le dérangement comportemental causé par la présence nécessaire de l'observateur ne doit pas non plus être négligé dans la mise en œuvre des observations directes et dans leur interprétation. Certaines espèces sont en effet particulièrement promptes à repérer et éviter toute présence humaine, notamment celles jugées « nuisibles » de l'agriculture et faisant l'objet de mesures fréquentes d'éloignement : Corvidés, Laridés, Sturnidés, Rapaces.

D'autres moyens de recensement peuvent alors être mis en place afin de compléter voire remplacer les observations directes sur le terrain. En particulier, les méthodes d'observation indirectes par le biais de caméras et pièges photographiques ont été appliquées aux études d'interfaces sauvage-domestique (Elbers and Gonzales, 2019; Kukielka et al., 2013; Scott et al., 2018). Ces méthodes indirectes ont l'avantage d'épargner du temps humain sur le terrain et d'éviter les dérangements induits, mais le temps de post-traitement des informations est autant voire plus long et nécessite également des connaissances ornithologiques pour l'identification d'espèces. En effet, les photographies ou vidéos enregistrées doivent être visionnées et triées pour en extraire ensuite les informations utiles sur la faune sauvage d'intérêt. Selon la qualité du matériel et la distance de la scène d'intérêt, les plus petites espèces peuvent être manquées (non-déclenchement de l'appareil, passage furtif, regard de l'observateur peu sensible) ou paraître difficiles à identifier avec précision. C'est en particulier le cas de l'avifaune essentiellement représentée par des passereaux de petite taille pour lesquels la résolution taxonomique sera parfois moindre (Elbers and Gonzales, 2019; Scott et al., 2018). Ces méthodes sont donc mieux adaptées à l'étude de gros animaux comme les ongulés ou carnivores (Kukielka et al., 2013) ou bien en des points précis observés à courte distance si on veut étudier de plus petites espèces. Dans le but d'évaluer l'efficacité des méthodes de vidéo ou piège photographique mise en place pour la détection de l'avifaune présente, le temps passé sur le site étudié pour l'installation et le relevage du matériel peut être mis à profit pour réaliser des observations directes comparatives.

Le recensement indirect de l'avifaune peut aussi se baser sur les méthodes de capture citée pour l'étude des dynamiques de population. Cependant, aucune technique de capture ne permet de cibler donc de recenser l'ensemble des taxons de l'avifaune présents, et les espèces capturées seront généralement partiellement différentes de celles détectées par observations et écoutes (Whitman et al., 1997). En

particulier avec les techniques de filets passifs (japonais ou nasses), les espèces cryptiques seront plus facilement détectées. Le recensement par capture se présente donc comme une méthode complémentaire aux observations et écoutes (Whitman et al., 1997). Un autre avantage des captures est de pouvoir manipuler les animaux puis les relâcher, ce qui permet la mise en place de mesures biométriques, des analyses écologiques de type CMR et la pose d'équipements télémétriques évoqués précédemment. Mais les contraintes techniques et réglementaires, ainsi que l'orientation des captures vers certaines espèces n'en font pas une méthode exclusive pour inventorier l'avifaune d'un site. Les visites du site étudié à l'occasion des sessions de capture peuvent alors être mises à profit pour réaliser des inventaires complémentaires par observation directe.

ii. Objectivation des interactions de l'avifaune à l'interface

La présence d'une espèce, même en abondance, n'indique pas directement la proximité ou l'intensité des contacts de celle-ci avec l'élevage étudié. Ceux-ci devront donc être évalués par une seconde phase d'observation plus détaillée pour caractériser les espèces montrant une forte proximité avec les hôtes domestiques (Caron et al., 2015, 2014). Alors les observations directes peuvent être employées pour étudier plus spécifiquement les comportements propices aux transmissions infectieuses au niveau de certains points clés de l'interface. Notamment, toutes les zones de regroupement des animaux d'élevage (alimentation, abreuvement, hébergement) peuvent constituer des lieux d'échanges infectieux favorables lorsqu'ils sont fréquentés par l'avifaune commensale. Comme pour l'objectif d'inventaire, les méthodes d'observation directe sont alors les plus simples mais requièrent des compétences ornithologiques et un investissement de temps sur le terrain, et elles induisent potentiellement un dérangement par la présence de l'observateur. L'usage des méthodes indirectes telles que les pièges photographiques ou caméras peut alors être fait pour limiter ce biais. Si leur étendue limitée par le champ de vision de l'appareil utilisé ne permet souvent pas de recenser l'ensemble de la faune visitant un site étudié, leur positionnement en des points clés de l'interface peut permettre d'étudier plus précisément les interactions à la manière des observations directes ciblées (Elbers and Gonzales, 2019; Kukielka et al., 2013; Scott et al., 2018).

iii. Détection moléculaire de l'avifaune

Avec la démocratisation progressive des technologies de biologie moléculaire, les méthodes de détection d'animaux par l'ADN environnemental (ADNe) qu'ils déposent sur leur passage se développent (Deiner et al., 2017; Taberlet et al., 2018). Les matrices aquatiques étant plus simples à traiter par ces méthodes, les premières interfaces d'élevages étudiées sont en particulier celles d'élevages aquacoles (Kajtar, 2021; Mercado-Allen et al., 2021). Mais les milieux terrestres sont étudiés par ces méthodes en milieu naturel (Andersen et al., 2012; Leempoel et al., 2020; Ushio et al., 2017) ou agricole (Valentin et al., 2018), et leur

transposition pourrait être faite vers les interfaces d'élevages avicoles. En particulier pour la recherche d'hôtes aviaires, des séquences « codes-barres » cibles sont décrites et certaines ont été utilisées avec succès pour identifier une diversité d'espèces dans l'environnement naturel ou en captivité (Ushio et al., 2018). Ces séquences génétiques ont la particularité d'être suffisamment variables entre espèces pour permettre leur distinction, tout en étant encadrées de portions conservées au sein du taxon ciblé (les oiseaux par exemple) qui permettent l'hybridation d'amorces de PCR pour l'amplification spécifique (Lijtmaer et al., 2012; Taberlet et al., 2018). Cette caractéristique des séquences codes-barres ciblées peut se retrouver en différents loci du génome des hôtes (gènes mitochondriaux en général), fournissant des séquences plus ou moins longues et plus ou moins discriminantes de certaines ou toutes les espèces étudiées. Actuellement, les séquences disponibles dans les bases de données de références sont variées, et les amorces correspondantes encore peu fixées (de Melo et al., 2021; Lijtmaer et al., 2012; Lohman et al., 2009; Patel et al., 2010; Taberlet et al., 2018). Le processus d'analyse des prélèvements de terrain passe d'abord par l'extraction de l'ADN, la plus douce et sensible possible pour conserver les séquences rares de l'échantillon. Celle-ci peut être précédée, sur le terrain ou au laboratoire, d'une étape de concentration afin de collecter un maximum d'ADNe dans un minimum de volume exploitable, augmentant ainsi la sensibilité de la méthode (Deiner et al., 2017; Lijtmaer et al., 2012; Taberlet et al., 2018). Le simple « barcoding » consiste à identifier une séquence d'espèce unique présente par exemple dans un échantillon de fèces, de muscle (produit alimentaire) ou d'objets de collection (contrôles de trafic d'espèces aux douanes) (Hebert et al., 2004; Lijtmaer et al., 2012). Le séquençage est alors généralement de type Sanger, rapide et fidèle, qui est plus simple techniquement et plus largement répandu dans les laboratoires. Comme ce type de séquençage ne permet pas de distinguer les mélanges de séquences, les prélèvements de matrices complexes d'origine environnementale seront séquencés en « métabarcoding » par d'autres technologies dites de séquençage à haut débit, par exemple les plus communes reposant sur la technologie Illumina (Illumina, Inc., San Diego, California, USA). Grâce à leur grande sensibilité (Furlan et al., 2016; Schultz and Lance, 2015) et l'omniprésence de l'ADNe dans le milieu de vie des espèces recherchées (Andersen et al., 2012; Ushio et al., 2017), les méthodes de « métabarcoding » en tant que méthode d'observation indirecte paraissent finalement plus exhaustives que le piégeage photographique (Leempoel et al., 2020; Mercaldo-Allen et al., 2021). Cette sensibilité accrue de la détection est particulièrement marquée sur les espèces cryptiques ou difficiles à identifier par observations directes ou indirectes (nocturnes, petite taille...). Ainsi, par l'approche de terrain la méthode de « métabarcoding » sur l'ADNe est comparable à celle des observations indirectes. En effet, les prélèvements demandent un temps de travail bref sur le terrain, par une technique et du matériel généralement simples. Les prélèvements peuvent aussi être ciblés sur les points d'intérêt spécifiques de l'interface étudiée, permettant une caractérisation précise de celle-ci. L'avantage en comparaison des observations est de pouvoir s'affranchir presque entièrement de compétences ornithologiques poussées, puisque l'identification se fait simplement par confrontation à des bases de données existantes dont les

espèces sont précisées. En revanche, cette méthode innovante demande un processus complexe et onéreux pour l'analyse en laboratoire des prélèvements, requérant aussi du matériel et des compétences spécifiques. Face à la diversité de matrices de prélèvement (sol, eau plus ou moins trouble, sédiments...) le protocole d'analyse des échantillons nécessite une mise au point spécifique préalable de la méthode, et ce aux différentes étapes du processus (Taberlet et al., 2018). Notamment, le choix des séquences codes-barres est crucial car leur détection sera plus sensible si on cible de courts fragments. En effet, ceux-ci seront détectables plus longtemps au cours de la dégradation de l'ADNe (par fragmentation en portions de plus en plus courtes), celle-ci pouvant être accélérée par l'exposition aux agresseurs physico-chimiques de l'environnement. Si le « métabarcoding » est très exhaustif, son défaut en comparaison des autres méthodes de recensement est aussi un caractère peu voire non quantitatif. En effet, la quantité d'ADNe déposé dans l'environnement dépend de l'espèce (taille notamment), de son activité et du type de milieu (Taberlet et al., 2018). On peut donc considérer qu'il est seulement possible de conclure sur une liste des espèces présentes au site de prélèvement, sans idée de leur abondance absolue ou relative (Deiner et al., 2017; Taberlet et al., 2018). De plus, la résolution temporelle sur la date de visite de l'espèce est variable et potentiellement de plusieurs semaines à mois. Les différentes spécificités de la méthode de « métabarcoding » sur ADNe en font donc un bon complément aux recensements par observation, ainsi qu'aux observations d'interactions et de comportements à l'interface.

c. Étude des agents infectieux de l'avifaune

La connaissance préalable de l'écologie et des dynamiques de transmission des agents infectieux dans le compartiment sauvage (Caron et al., 2017; Munster et al., 2007; Olsen et al., 2006; Wille et al., 2015) permet d'apprécier le risque lié aux interactions constatées, selon les espèces et les périodes impliquées. Cette connaissance préalable requiert des études microbiologiques précises et de large ampleur, sur un spectre d'hôtes varié afin d'évaluer avec la meilleure résolution possible les prévalences d'agents infectieux dans ces populations. En effet, la précision des mesures faites sera plus fine si les effectifs pour chaque espèce ou taxon d'intérêt sont grands. L'effectif échantillonné devra être d'autant plus important en situation de circulation infectieuse endémique, et du fait que les populations considérées sont généralement très grandes dans l'avifaune (Gilot-Fromont and Rossi, 2000). Mais l'accès à des individus sauvages pour réaliser des prélèvements peut être particulièrement difficile pour diverses raisons techniques et réglementaires, aussi l'échantillonnage ou la méthode de prélèvement peuvent être adaptés en comparaison d'études en élevages (Gilot-Fromont and Rossi, 2000). L'analyse et l'interprétation des résultats de prévalences devra alors tenir compte des éventuels biais induits par cette adaptation méthodologique.

i. Échantillonnage direct sur l'avifaune

Une des méthodes les plus répandues pour obtenir des prélèvements (écouvillons, sang, autres) directement sur l'avifaune est la capture. Mais les contraintes techniques et réglementaires citées plus haut pour cette méthode le sont d'autant plus que les effectifs à atteindre pour les prélèvements sont élevés (Coombe et al., 2021; FAO, 2007). Pour contourner en partie ces limites liées aux captures, leur usage peut être optimisé en ciblant des périodes, des espèces ou des sites d'intérêt particulier. Dans le cadre d'une étude d'interface sauvage-domestique, on pourra notamment cibler les captures à proximité de l'élevage, sur des espèces précédemment observées en interaction avec les volailles, et à des périodes où leur abondance a été évaluée maximale. En complément ou en remplacement des captures, des méthodes alternatives d'obtention des prélèvements sont alors souvent mises en place. Les tirs létaux sont parfois utilisés, notamment pour augmenter les effectifs sur les espèces chassables en région et période de chasse autorisée (Gobbo et al., 2021), ou bien sous dérogation pour obtenir rapidement des prélèvements en situation d'urgence (Van De Wiele et al., 2017). L'inconvénient majeur est que cette méthode cible essentiellement des espèces de taille moyenne à grande, omettant notamment l'essentiel des Passériformes qui constituent la majorité de l'avifaune commensale.

ii. Échantillonnage indirect des matières issues de l'avifaune

Lorsque ni les captures ni les tirs ne sont possibles sur les espèces ou le contexte ciblés, ou en complément de ces méthodes, il est possible d'envisager des approches indirectes par prélèvements environnementaux. Les gains de temps administratifs et sur le terrain peuvent être considérables permettant d'échantillonner des effectifs importants (Coombe et al., 2021). La diversité des sources de prélèvements, évoquée précédemment (*Prélèvements pour la détection directe de VIA – p 29*), offre de nombreuses possibilités d'adaptation selon le contexte et les espèces ciblés. Dans un contexte d'étude infectieuse d'une interface sauvage-domestique, les résultats issus de prélèvements environnementaux fourniront en outre des informations intéressantes sur les potentielles voies de transmission indirectes. Cette approche peut aussi être couplée sur les mêmes prélèvements de surfaces, d'eau ou de sol à une détection moléculaire des hôtes aviaires par « métabarcoding », optimisant ainsi l'usage des échantillons et du temps passé à les récolter. Les deux approches existent mais n'ont cependant jamais été couplées pour des études d'agents infectieux et de leurs hôtes aviaires (Coombe et al., 2021; Densmore et al., 2017; Ushio et al., 2018; Xie et al., 2017). Sur des prélèvements environnementaux monospécifiques (fientes ou plumes par exemple), le « barcoding » pourra permettre d'identifier avec certitude l'espèce hôte (Torrontegi et al., 2019).

iii. Méthodes d'analyses microbiologiques adaptées aux interfaces

Outre la multiplicité complémentaire des types de prélèvements pour étudier les agents infectieux de l'avifaune, les recherches infectieuses ciblées peuvent porter sur une large gamme d'espèces virales ou

bactériennes pour accroître les chances de détection (voir partie *Agents infectieux marqueurs des voies de transmissions directes et indirectes – p 39*). Cette recherche ciblée mais à large spectre permet ainsi d’optimiser l’usage de prélèvements issus de l’avifaune qui sont parfois difficiles à collecter, et dont les prévalences et charges infectieuses peuvent être faibles.

Une autre approche de détection d’agents infectieux sans *a priori* se développe actuellement avec la démocratisation des analyses de séquençage à haut débit. La détection et l’identification d’agents infectieux peuvent ainsi se faire en parallèle et de manière non ciblée, couvrant simultanément l’ensemble du pathobiome (l’écosystème des agents infectieux viraux et bactériens), du microbiome (l’écosystème bactérien) (Knutie and Gotanda, 2018; Kreisinger et al., 2015) ou du virome (l’écosystème des virus) (Ramírez-Martínez et al., 2018; Wille et al., 2019). La comparaison de virome pour identifier les transmissions entre compartiments a été notamment utilisée avec des résultats prometteurs à des interfaces sauvages-domestiques végétales (Ma et al., 2020). Chez les hôtes aviaires, la comparaison a été faite pour le moment entre espèces sauvages sympatriques (Ramírez-Martínez et al., 2018; Wille et al., 2019). Le microbiome zoonotique de rongeurs a aussi été étudié à l’interface sauvage-domestique (Jahan et al., 2021). Menant fréquemment à l’identification d’agents infectieux nouveaux dans les espèces sauvages encore peu étudiées, et mettant en évidence des échanges infectieux entre espèces, ces approches complexes offrirait donc certainement des réponses intéressantes à l’interface entre avifaune et volailles.

Mais la grande diversité microbiologique méconnue que révèlent en particulier les analyses métagénomiques dans les populations sauvages soulignent aussi l’importance de confirmer et typer finement les souches d’agents infectieux détectées. Les tests utilisés couramment en laboratoire pour la détection sont en effet généralement développés pour des besoins de diagnostic sur les animaux d’élevage, et leur spécificité souvent éprouvée seulement sur le panel de souches connues dans les espèces domestiques. De plus, dans le but de confirmer les échanges infectieux entre compartiments d’une interface il est nécessaire de valider par typage la similarité (ou non) des souches présentes de part et d’autre. Ces souches étant donc potentiellement variées dans le compartiment sauvage, voire aussi dans le compartiment domestique à son contact, le typage devra être suffisamment fin pour tenir compte et discriminer la diversité possible.

B. Contextes économique, sanitaire et écologique spécifiques des élevages avicoles du Sud-Ouest de la France

I. Description de la filière avicole et palmipèdes du Sud-Ouest de la France

a. Un bassin économique historiquement important

Un des gros bassins de production de volailles en France se trouve dans le Sud-Ouest (Agreste, la statistique agricole, 2020c; Delpont et al., 2021) (Figure 16). À la différence des autres bassins français, la production de volailles y est généralement le type d'élevage majoritaire sur les communes concernées (Figure 16). Le système de production dans le Sud-Ouest est plutôt orienté sur des modèles de qualité supérieure, suivant des méthodes dites traditionnelles (« volailles fermières »), et dont une part majeure est valorisée par divers signes officiels de la qualité et de l'origine (SIQO) c'est-à-dire AOC/AOP, IGP (Tableau 1), biologique ou Label Rouge. Ces SIQO comprennent essentiellement des systèmes en plein air avec des souches à croissance lente (INAO et al., 2019; IRQUALIM et al., 2018), et beaucoup sont de petite taille avec une activité réalisée par une main-d'œuvre à près de trois quarts d'origine familiale (Agreste, la statistique agricole, 2010). Ainsi, en Nouvelle-Aquitaine 55% des élevages de volailles-œufs et 65% des élevages de palmipèdes gras produisent sous SIQO (hors biologique car les chiffres sont agrégés différemment) (INAO et al., 2019), tandis qu'en Occitanie 39% des volumes produits en volailles de chair et 78% en palmipèdes gras sont labellisés sous SIQO hors biologique (IRQUALIM et al., 2018). La part des productions sous SIQO en Nouvelle Aquitaine représente aussi pour la France 16% des volailles et 71% des palmipèdes gras. De plus grandes exploitations dites « standard » non labellisées existent aussi sur la région. Par exemple en Nouvelle-Aquitaine, les SIQO représentent seulement 18% du volume produit de volailles galliformes et 20% pour les palmipèdes gras (INAO et al., 2019).

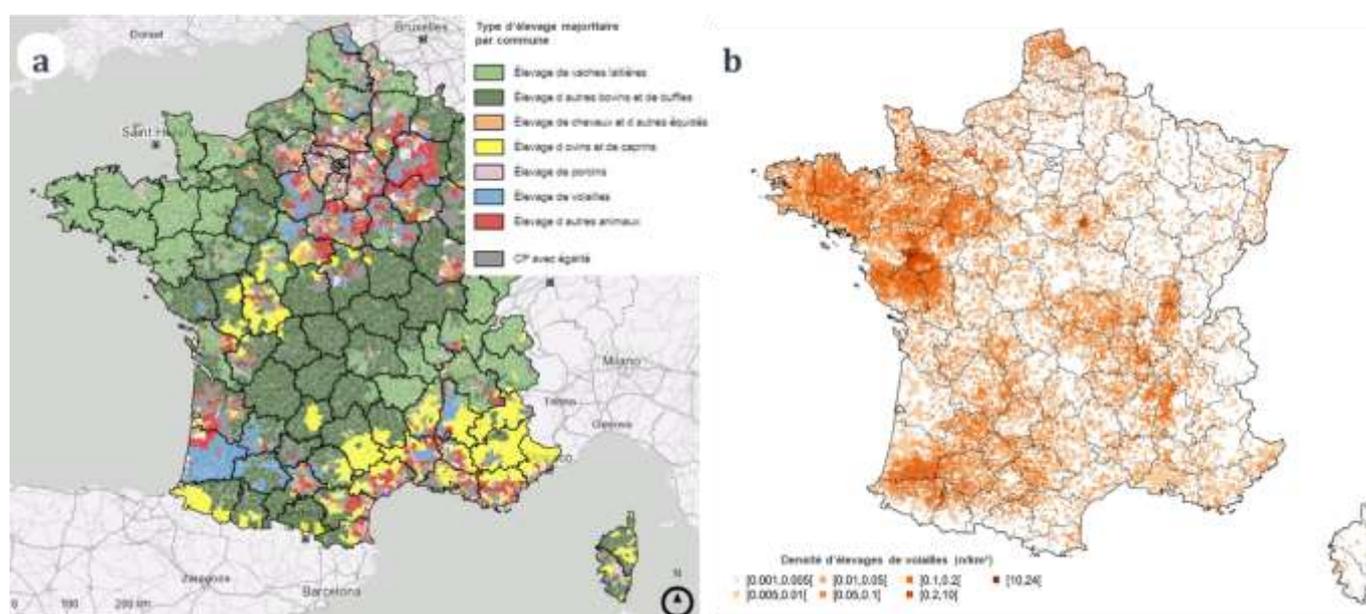


Figure 16 - Répartition géographique des élevages de volailles et de leur part économique en France.

a - Type d'élevage majoritaire (par nombre d'exploitations) par commune, issue de la cartographie Articque (<https://cdonline.articque.com/share/display/regions-elevages>, 2021).

b - Densité d'élevages de volailles par km², issue de Delpont et al., 2021.

Tableau 1 - Principales appellations IGP de volailles du Sud-Ouest.

Source <https://www.inao.gov.fr/>, 2021.

	Nouvelle-Aquitaine	Deux régions	Occitanie
Principales appellations IGP	Volailles des Landes Volailles de Challans Volailles de Cholet Volailles de Vendée Volailles du Val de Sèvres Volailles des Landes Volailles du Béarn	Canard à foie gras du Sud-Ouest Oie du Sud-Ouest Poulet du Périgord Poularde du Périgord Chapon du Périgord Volailles de Gascogne	Poulet des Cévennes Chapon des Cévennes Volailles du Gers Volailles du Languedoc Volailles du Lauragais



Ces chiffres des volailles de qualité produites dans le Sud-Ouest démontrent également la part prépondérante de ce bassin dans la production nationale de palmipèdes gras, en majorité des canards, et élevés sous appellation. Le bassin Sud-Ouest représente ainsi près de 80% de la production de palmipèdes gras française, qui représente elle-même 70% de la production mondiale (Agreste, la statistique agricole, 2020c, 2015, 2010), faisant de la France et de la région Sud-Ouest un des pôles majeurs de production mondiale de canards (FAO, 2021) (Figure 17).



Figure 17 - Distribution géographique mondiale et nationale des canards d'élevage.

Les continents non figurés comportent des effectifs et densités non significatifs en comparaison de l'Europe et du Sud-Est asiatique. Issue de <https://empres-i.apps.fao.org/>, 2021.

La production de palmipèdes gras fait partie intégrante de la culture traditionnelle régionale depuis des siècles, mentionnée dans la littérature dès le XVIII^{ème} siècle mais certainement fondée depuis au moins le XVI^{ème} siècle grâce à l'installation de populations juives dans différentes parties de l'Europe dont le Sud-Ouest de la France (Guémené and Guy, 2004; Mognard, 2011). Le foie gras était alors un mets très fin

digne des tables nobles, dont les quantités produites étaient restreintes par la taille des élevages et le travail de gavage manuel. La tradition de la production de foie gras et de volailles grasses s'ancre ensuite particulièrement dans le Sud-Ouest grâce à trois facteurs principaux (Guémené and Guy, 2004; INAO, 2021; Mognard, 2011; PALSO, 2021) :

- Le système agro-économique régional traditionnellement organisé en métayages en petites exploitations favorisant l'élevage de volailles plutôt que d'autres animaux ;
- La culture du maïs particulièrement ancrée dans la région depuis les conquêtes américaines, qui permettra d'améliorer la qualité et l'efficacité de l'engraissement ;
- La conservation de la viande confite par le gras de palmipèdes qui était à l'époque le seul moyen de préservation dans la région.

Progressivement, les techniques d'élevage, d'engraissement et de conservation s'optimisent dans la filière locale (Guémené and Guy, 2004). Notamment, le changement vers une espèce plus rentable. En effet, l'espèce principalement élevée et engraisée depuis l'Antiquité et le Moyen-Âge pour son foie était l'oie (*Anser anser*) (Mognard, 2011), mais son élevage est long et technique, ses capacités reproductives modérées, et sa co-production carnée peu valorisable. Au moment du développement de la production au XX^{ème} siècle, les canards plus simples à élever ont donc été alternativement utilisés. En particulier, les mâles de canards mulards ont été sélectionnés, issus de croisements entre canard de barbarie (*Cairina moschata*) pour la chair et cane de race Pékin ou Rouen (*Anas platyrhynchos*) pour les facilités de reproduction (Guémené and Guy, 2004). Ces révolutions zootechniques associées au développement des méthodes de conservation (stérilisation, réfrigération) et à l'essor du commerce et des transports au XX^{ème} siècle ont permis un accroissement et une exportation de la production à l'international. Cela a entraîné une démocratisation de la consommation jusqu'aux années 2010 (Figure 18), et en principalement en France où plus de 90% de la population dit consommer du foie gras en particulier à la période des fêtes de fin d'année (CIFOG, 2020). Depuis 1985, la production de foies gras a ainsi été multipliée par quatre (de 5 000 t par an en 1985 à 20 000 t au pic en 2011), bien que freinée par les dernières crises sanitaires d'IAHP à partir de 2015 (Agreste, la statistique agricole, 2020c). La tradition n'a pourtant été officialisée et protégée qu'à partir des années 2000. Ainsi en 2000 a été créée l'appellation IGP « Canard à Foie Gras du Sud-Ouest » (INAO, 2021), puis en 2006 la production a été déclarée « patrimoine gastronomique et culturel français » par la loi nationale (Code rural, 2006).

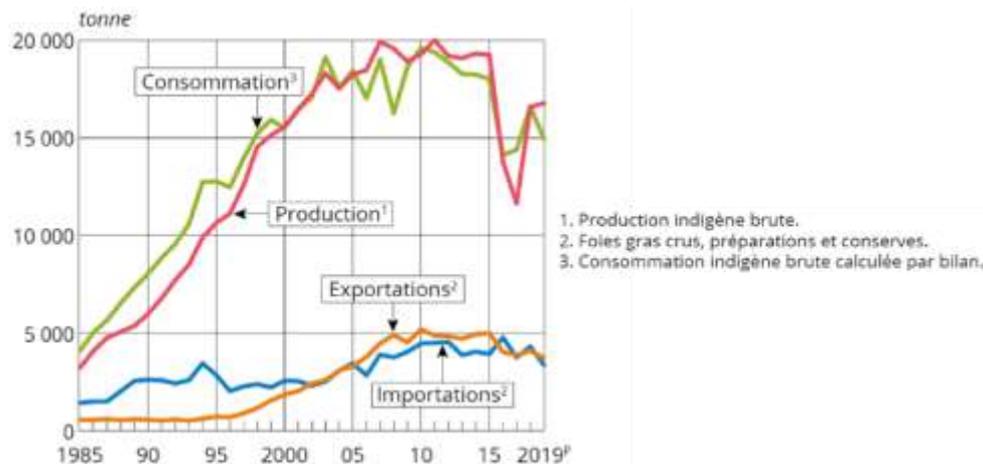


Figure 18 - Évolution de l'économie des foies gras de canard et oie en France de 1985 à 2019.
 Issue de Agreste, la statistique agricole, 2020b.

Le développement de la production observé depuis la fin du XX^{ème} siècle s'est accompagné d'une structuration forte de la filière palmipèdes gras. La concentration régionale d'élevages de même type permet en effet de mettre en commun des compétences et du matériel spécialisés, réalisant ainsi des économies d'échelle. On retrouve ainsi une majorité de petites exploitations évoquées précédemment, mais dont la taille tend à augmenter tandis que le nombre diminue (Agreste, la statistique agricole, 2010). Ces exploitations sont souvent organisées en systèmes intégrés permettant une fragmentation géographique et une spécialisation des étapes distinctes de production (élevage, engraissement, abattage). Si beaucoup d'exploitations sont autarciques et travaillent indépendamment du caneton à l'abattage, la majorité coopèrent toutefois avec d'autres pour au moins une phase de l'élevage, réalisant ainsi des flux importants de matériel et d'animaux entre elles et parfois sur de grandes distances géographiques (Delpont et al., 2018; Guinat et al., 2020b) (Figure 19). En dehors de ces éléments, le personnel spécialisé dans les interventions sanitaires et techniques (attrapeurs, vaccinateurs, gaveurs, transporteurs par exemple) peut aussi être amené à connecter différents élevages de la région (Figure 19). Il est ainsi estimé que la filière des palmipèdes gras française génère aujourd'hui près de 100 000 emplois directs et indirects, de la production à la distribution (CIFOG, 2021), distribués en un millefeuille complexe de réseaux interconnectés.

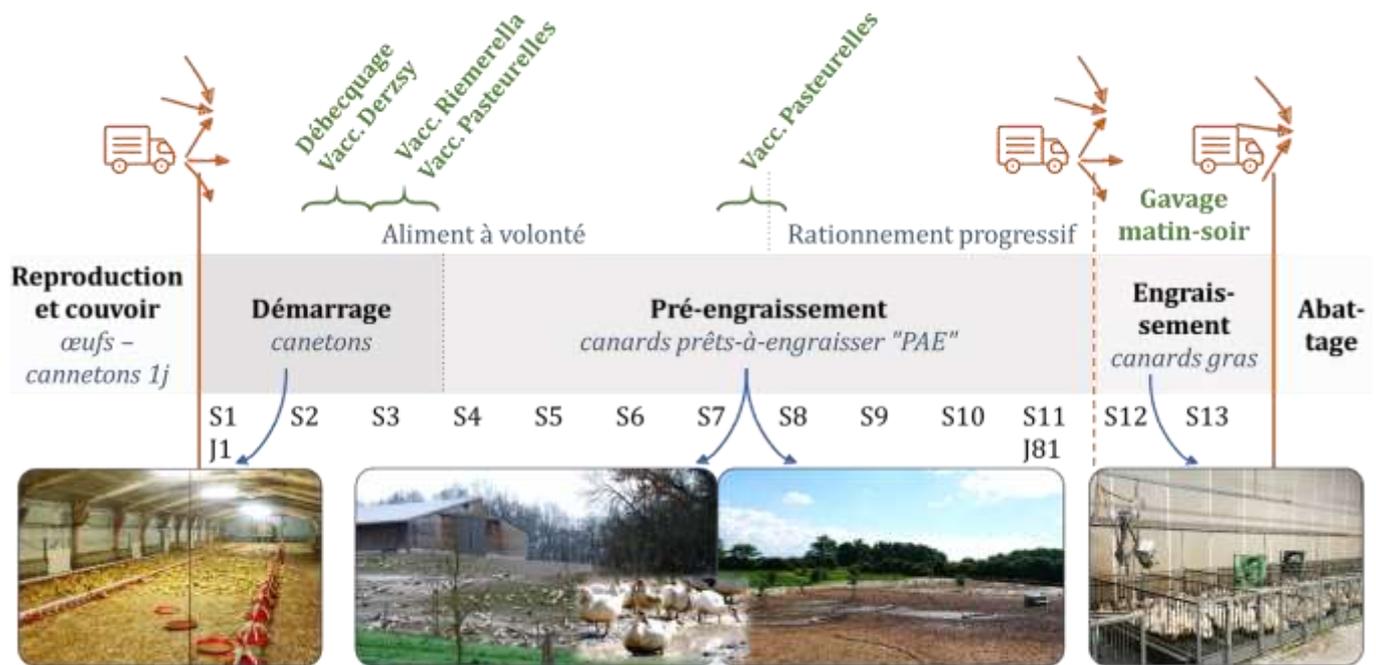


Figure 19 - Schéma d'un cycle de production typique de canards mulards à foie gras.

Les illustrations photographiques montrent le type de logement des canards à chaque phase de leur vie (crédits personnels). **En orange** sont figurés les changements de site obligatoires (trait plein) ou facultatifs pour les sites éleveurs et engraisseurs (trait pointillé), avec les potentielles réunions ou dispersions inter-sites des flux d'animaux figurées par les flèches. **En vert** sont figurées les interventions sanitaires ou zootechniques nécessitant la manipulation des animaux.

b. Principes de la production de palmipèdes gras

Techniquement, la production sous l'IGP « Canard à Foie Gras du Sud-Ouest » (la majorité donc) suit des critères bien spécifiques définis par le cahier des charges officiel (INAO, 2021). Ainsi, les produits de viande, cœurs, gésiers ou foie, crus ou cuits, doivent être issus d'un canard de barbarie ou mulard mâle qui a été élevé, abattu et transformé dans la zone géographique de l'IGP (Chalosse, Gascogne, Gers, Landes, Périgord, Quercy). Ce canard rustique aura été élevé en plein air quasiment depuis son arrivée en élevage à un jour et durant 11 à 14 semaines minimum (Figure 19), se nourrissant de maïs du Sud-Ouest et des aliments glanés sur le parcours extérieur. Âgé d'au minimum 81 jours et pesant au moins 3,5 kg, le canard sera ensuite engraisé par gavage, exclusivement au maïs du Sud-Ouest, distribué matin et soir durant 10 à 14 jours. L'abattage se fait immédiatement en fin d'engraissement pour que le foie conserve un maximum de lipides, celui-ci devant peser au minimum 350 g pour être certifié à l'IGP ou 300 g pour être qualifié de « foie gras » mais avec des objectifs plutôt vers 500-600 g (Guémené and Guy, 2004; INAO, 2021; INRAE et al., 2011; PALSO, 2021). Cette formation de foie gras repose sur une capacité physiologique des oiseaux à synthétiser des lipides (lipogenèse) dans le foie, par un mécanisme de stéatose hépatique (accumulation de triglycérides dans les hépatocytes) réversible. Ce métabolisme lipidique particulier est activé par l'hyperphagie d'aliments riches en amidon et pauvres en protéines et en choline (Litt et al., 2021), tel que le maïs. Pour accélérer et optimiser l'engraissement et réduire ainsi

la durée de cette phase d'élevage fastidieuse et contraignante, les animaux sont restreints dans leurs déplacements dans des bâtiments fermés. Les critères européens de bien-être animal ont mené à interdire l'hébergement en cages individuelles depuis 2011, et les canards sont donc aujourd'hui logés soit par groupes de 3-10 individus en cages surélevées (système majoritaire), soit par 15-25 individus dans des parcs au sol (Figure 19). Le confort thermique et d'ambiance de l'hébergement, ainsi que la technique de gavage sont optimisés par les exploitants engraisseurs, pour lesquels ces éléments sont en plus primordiaux par leur impact direct sur la santé des animaux et la qualité des produits (Guémené and Guy, 2004; Litt et al., 2021). Cependant, les contraintes imposées aux animaux durant cette phase d'engraissement (logement confiné et dense, associé à la manipulation quotidienne pour forcer une ingestion d'aliment excédentaire) sont contraires aux exigences européennes en termes de bien-être énoncées dans la directive 98/58/CE (Conseil de l'Europe, 1998; Litt et al., 2021). C'est pourquoi la production de foie gras européenne est aujourd'hui limitée aux pays historiquement producteurs (la France, la Hongrie, la Bulgarie, l'Espagne et la Belgique), tandis que le Comité Permanent de la Convention Européenne sur la protection des animaux dans les élevages a émis le 22 juin 1999 des recommandations spécifiques sur les conditions d'élevage de palmipèdes, ainsi que des recommandations vis-à-vis des pays producteurs de foie gras pour raffiner les méthodes de production. Ceux-ci sont ainsi conviés à étudier les impacts physiologiques et éthiques du gavage, ainsi qu'à travailler à la recherche et au développement de méthodes alternatives (Conseil de l'Europe, 1999).

II. Épidémiologie des principaux agents infectieux impactant les canards gras

a. Épidémiologie et transmissions intra-élevage

Les canards mulards de par leur rusticité génétique sont plus résistants que les autres espèces d'élevage aux agents infectieux, viraux en particulier. Cependant, divers facteurs génétiques, environnementaux et zootechniques particuliers à la filière foie gras les prédisposent à certaines infections (INRAE et al., 2011). En effet, les modes d'élevage à chaque phase du cycle de vie des canards et l'organisation technico-économique fragmentée de la filière sont favorables à la circulation d'agents infectieux à l'échelle des exploitations et de la région.

Durant la phase de démarrage (deux à quatre semaines), les jeunes canetons plus fragiles et confinés en canetonnières chauffées sont sensibles à des infections notamment par les bactéries du genre *Streptococcus* (syndrome mortalité du jeune caneton, par septicémie), par *Aspergillus fumigatus* (aspergillose, atteinte respiratoire), par la bactérie *Riemerella anatipestifer* (riemerellose, septicémie et dépérissement), par la bactérie *Pasteurella multocida* (pasteurellose ou choléra aviaire, septicémies aiguës à chroniques), ou encore par le *Goose parvovirus* (maladie de Derzsy, syndrome nanisme bec court, croissance hétérogène, dépérissement). Plus tard au cours de la phase de pré-engraissement en plein air

(2-4 à 11-16 semaines), l'exposition et la sensibilité aux infections évoluent, tandis que certaines infections contractées au démarrage peuvent se révéler suite à l'incubation et aux changements environnementaux. On observe notamment encore des infections à *Pasteurella multocida*, ainsi que des syndromes coryza (rhinite) et respiratoires chroniques non spécifiques, dus à divers agents concomitants et souvent non identifiés, tels que probablement les mycoplasmes du canard dont *Mycoplasma anatis*, et peut-être rarement *Chlamydia psittaci* dont les canards sont massivement porteurs asymptomatiques (Vorimore et al., 2015). Ces affections des canards plus âgés sont généralement subcliniques et inaperçues, mais peuvent devenir pathologiques parfois tardivement après l'inoculation à la faveur de facteurs environnementaux, d'un stress (manipulations, compétition alimentaire...) ou d'éventuelles coinfections. C'est pourquoi en phase d'engraissement les maladies infectieuses deviennent plus nombreuses, avec le stress du changement de site additionné des manipulations quotidiennes qui interviennent en fin d'élevage. Le confinement et le matériel partagé peuvent favoriser le développement et la circulation d'agents pathogènes respiratoires à transmission directe et aérienne dont certains des lots regroupés peuvent être préalablement porteurs asymptomatiques. Le stress et le changement alimentaire peuvent aussi déclencher des syndromes de choléra à pasteurelles (la mortalité peut être très élevée) ou des entérites multifactorielles. L'intervention spécifique de gavage peut aussi favoriser les affections dues à la levure *Candida albicans*, agent pathogène opportuniste de la flore digestive qui se développe au gré de déséquilibres microbiens en particulier au niveau de l'œsophage et du jabot qui sont alors très sollicités. Pour cet agent comme pour la vaste majorité des autres infections, la prévention passe essentiellement par la maîtrise zootechnique des facteurs de risque tels que la régulation de la flore microbienne lactique, l'hygiène du matériel et du logement (litière, ventilation), la propreté et la qualité de l'aliment et de l'eau. Pour les agents particulièrement difficiles à maîtriser et provoquant des pertes importantes, des solutions thérapeutiques sont employées, telles que l'antibiothérapie ciblée (souvent dans l'eau de boisson ou l'aliment), ou encore des vaccins commerciaux (Derzsy, pasteurelles) ou des autovaccins ciblant les sérotypes circulants isolés dans l'élevage (pasteurelles, riemerella) (INRAE et al., 2011) (Figure 19).

Ces divers agents infectieux, pathogènes ou non, auxquels sont soumis les canards gras durant leur vie sont généralement transmis et maintenus d'un lot à l'autre au sein d'un élevage grâce à leur persistance environnementale et sur le matériel (outils, machines, équipement du personnel) qui passe d'un bâtiment à l'autre. En effet, l'idéal théorique des mesures de biosécurité permettant de briser ces chaînes de transmission est très souvent confronté aux contraintes techniques et à l'observance des éleveurs, en particulier dans les élevages de petite taille et en plein air, et en particulier dans les élevages de canards qui sont la plupart du temps peu affectés par ces infections (Delpont et al., 2021, 2018). Une fois introduits dans un lot, les agents infectieux s'y disséminent ensuite rapidement (Vergne et al., 2021; Vorimore et al., 2015) par les différents modes de transmission grâce aux facteurs favorisants suivants : (i) nombreux

contacts directs lors des interactions sociales et la vie en promiscuité ; (ii) accumulation de fèces humides en particulier dans les bâtiments et autour des points d'intérêt (eau, aliment) ; (iii) comportement hydrophile des canards qui se plaisent à se baigner et filtrer avec leur bec dans toutes les eaux de surface où persistent le mieux les virus et bactéries. Des infections asymptomatiques peuvent ainsi circuler facilement d'un lot à l'autre et se répandre massivement par transmission intra-lot, comme on l'observe avec *Chlamydia psittaci* (Hulin et al., 2016; Vorimore et al., 2015).

b. Épidémiologie et transmissions inter-élevages

Outre les transmissions et la maintenance intra-élevage des agents infectieux, les nombreux et complexes flux d'animaux et de matériel dans le réseau de la filière en favorisent la diffusion inter-élevages. Ce phénomène a été particulièrement révélé lors des dernières crises d'IAHP, le virus se répandant comme une traînée de poudre au sein des élevages de canards gras du Sud-Ouest en suivant directement et principalement les liens de filière (Briand et al., 2021; Guinat et al., 2020b, 2019; Le Bouquin et al., 2016) (Figure 20). Ce phénomène survient particulièrement au moment de la mise à l'engraissement, où les lots (généralement de milliers de têtes) d'un élevage de canards prêts-à-engraisser sont subdivisés parmi différents sites d'engraissement où ils sont ensuite fréquemment rassemblés avec des lots d'autres origines (Figure 19). Comme également de nombreux sites d'engraissement sont aussi éleveurs, des transmissions indirectes par les matériaux ou l'environnement peuvent se faire au passage d'un transporteur sur le site. Bien sûr, des mesures de biosécurité idéalement appliquées en entrée et sortie d'élevage devraient drastiquement réduire le risque de diffusions infectieuses, mais comme évoqué précédemment celles-ci souffrent toujours de failles techniques ou humaines qui permettent une persistance microbiologique dont les VIAHP hautement infectieux ont de toute évidence aisément profité (Delpont et al., 2018; Guinat et al., 2020a; Huneau-Salaün et al., 2022; Ssematimba et al., 2013). Un facteur certainement accélérateur de la diffusion infectieuse dans le Sud-Ouest est la cohabitation spatiale d'élevages de tailles et de spécialisations variées, impliquant une sensibilisation et une observance variables de la biosécurité (Delpont et al., 2021). Cette variabilité existe au sein de la filière palmipèdes gras, mais aussi dans d'autres productions de volailles dont les densités sont importantes sur la région. Ainsi, des liens directs ou indirects avec les volailles de basse-cour peu biosécurisées (Souvestre et al., 2021) ou avec d'autres espèces d'élevages commerciaux généralement plus biosécurisés (Delpont et al., 2021) sont présents et permettent des transmissions infectieuses dont de VIAHP (Guinat et al., 2018; Souvestre et al., 2019), bien que plus sporadiques en comparaison des flux massifs que représente le réseau de la filière palmipèdes gras.

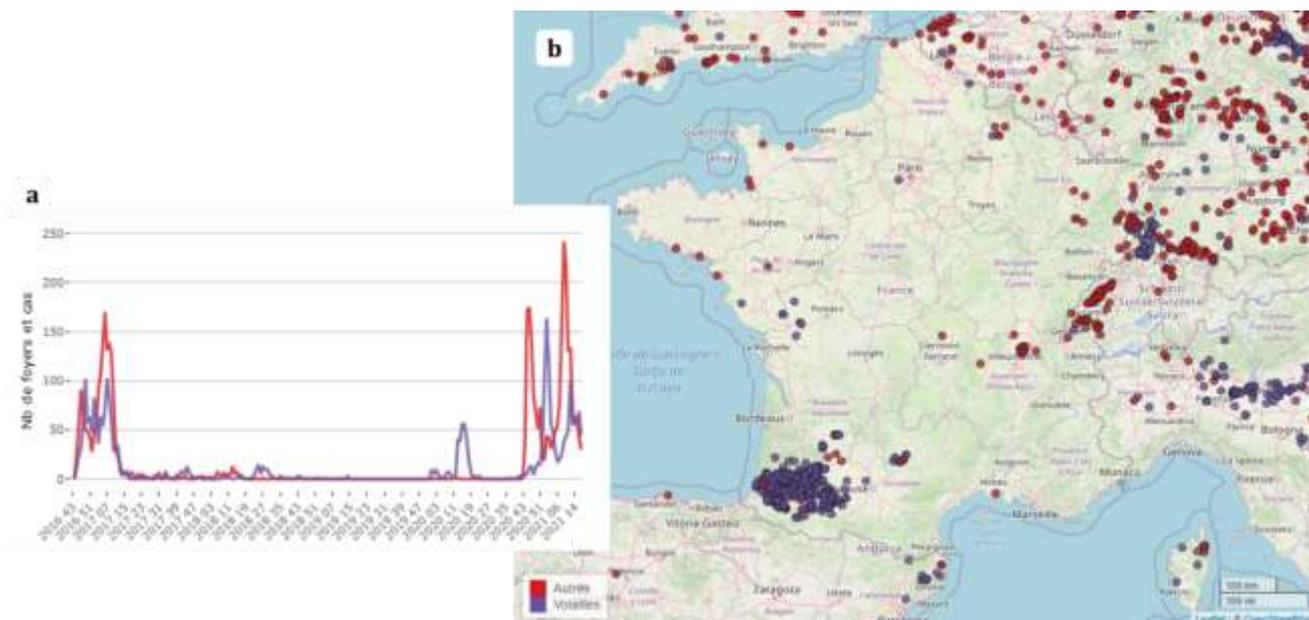


Figure 20 - Nombre et distribution géographique des cas sauvages et domestiques d'IAHP en France de 2016 à 2021.

a – Évolution temporelle du nombre de cas entre la semaine 43 de 2016 (26 octobre) et la semaine 14 de 2021 (01 mai).

b – Distribution géographique de ces cas en France.

Issue de la carte interactive de la Veille Sanitaire Internationale de la plateforme ESA (<https://shiny-public.anses.fr/shiny-vsi/>).

La densité et l'interconnexion des élevages de volailles dans la région Sud-Ouest et en particulier dans le bassin de Chalosse, ont ainsi amené les autorités sanitaires de la DGAL à classer ce dernier comme zone à risque de diffusion (ZRD) (DGAL, 2021c) (Figure 21). Ces zones géographiques ont été établies suite à l'épidémie de 2020-2021 sur la base des données épidémiologiques et de densités d'élevages y montrant une probabilité de diffusion de virus entre élevages supérieure au reste du territoire. L'objectif est d'y renforcer les mesures de biosécurité et de surveillance en période à risque d'IAHP, afin de prévenir et détecter précocement les éventuels foyers en élevages. En effet, c'est notamment à cause de ces facteurs favorables intra et inter-élevages que les dernières épidémies d'IAHP des hivers 2015-2016 (H5N1 FP européen variant HP), 2016-2017 (H5N8 2.3.4.4b d'Asie) et 2020-2021 (H5N8 2.3.4.4b) ont tout particulièrement impacté le Sud-Ouest et sa filière palmipèdes gras (EFSA et al., 2021a, 2017; Le Bouquin et al., 2016). L'épisode de l'hiver 2020-2021 a été le plus dévastateur avec plus de deux millions de volailles infectées sur 492 foyers en France (contre 77 en 2016 et 484 en 2017), dont 475 dans le Sud-Ouest, auxquels s'ajoutent les abattages préventifs en zones périphériques aux foyers (Anses, 2021; EFSA et al., 2021b) (Figure 20).

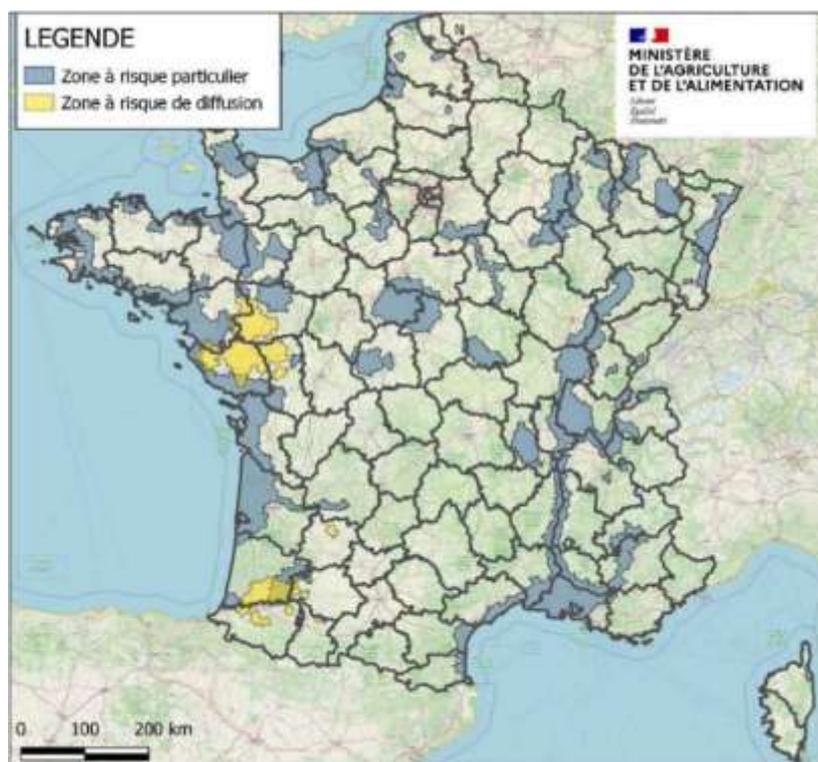


Figure 21 - Répartition géographique des zones à risque d'IAHP.

Les Zones à risque particulier (ZRP) correspondent à un risque supérieur d'introduction par l'avifaune aquatique, et les Zones à risque de Diffusion (ZRD) correspondent à un risque supérieur de diffusion inter-élevages une fois l'introduction survenue. Ces zones font l'objet de mesures sanitaires réglementaires supplémentaires (surveillance, biosécurité, autorisation) durant les périodes à risque d'IAHP telles que décrétées par la DGAL, et ce vis-à-vis de diverses activités en lien avec des oiseaux captifs (volailles, gibiers, oiseaux d'ornement) pour leur élevage, leur transport, ou leur rassemblement. DGAL, 2021.

Provoquées par différents réassortants de sous-type H5 et de même clade (Beerens et al., 2017; King et al., 2021), les épidémies de 2016-2017 et 2020-2021 ont été toutes deux initiées par une introduction du VIAHP dans la filière régionale *a priori* par le réservoir sauvage, à la suite des déplacements migratoires descendants en début d'hiver depuis l'Europe du Nord eux-mêmes provenant d'Asie centrale en début d'automne (Anses, 2021; EFSA et al., 2021a, 2017; Guillemain et al., 2021). Ces introductions dans le secteur domestique et particulièrement dans les élevages de palmipèdes gras sont alors hautement favorisées par différents facteurs. Géographiquement d'abord, les introductions du compartiment sauvage vers domestique sont hautement plus probables à proximité de zones humides où l'avifaune réservoir est abondante et circule de façon dense (Paul et al., 2014; Velkers et al., 2020), pouvant alors infecter les élevages par contact direct ou par contamination environnementale. Ainsi, les foyers index en élevage sont toujours situés dans ou à proximité de milieux favorables aux Anseriformes sauvages migrateurs (Anses, 2021). Ce risque géographique a conduit en 2016, en accord avec les données ornithologiques et l'expertise de l'OFB, à établir des zones à risque particulier (ZRP), où le risque d'introduction par la faune sauvage est plus élevé, ce qui demande comme pour les ZRD un renforcement des mesures sanitaires en période à risque d'IAHP (DGAL, 2016b). Le bassin avicole du Sud-Ouest et sa ZRD se situe ainsi entre différentes ZRP (Figure 21), favorisant l'entrée puis la propagation infectieuse

aux élevages. Outre cette proximité avec des ZRP, la situation géographique entre littoral Atlantique et piémont pyrénéen favorise également un climat humide et un réseau hydrographique développé (voir paragraphe suivant), facilitateurs pour la persistance infectieuse dans l'environnement et la circulation diffuse de l'avifaune aquatique. Le risque d'introduction dans le compartiment domestique n'y est donc jamais nul même à distance des ZRP. Si la France et en particulier le Sud-Ouest voient les cas sauvages arriver plus tardivement et plus sporadiquement que d'autres pays comme les Pays-Bas, l'Allemagne ou le Danemark (Anses, 2021; EFSA et al., 2021a), la moindre contamination du réservoir sauvage peut suffire à provoquer quelques introductions grâce aux autres facteurs favorisant. Un second facteur de risque pour l'introduction dans la filière palmipèdes gras est aussi l'excellente réceptivité de ces espèces domestiques pour les VIA, nécessitant une faible charge virale pour déclencher une infection. Ainsi même une moindre contamination environnementale ou un contact peu intense (distant ou de peu d'individus) suffisent à contaminer un élevage. À cela s'ajoute un troisième facteur intrinsèque au mode d'élevage de la filière palmipèdes gras, reposant sur une phase de plein air intégral de plusieurs semaines qui augmente fortement le cumul de risque d'exposition à des agents infectieux aviaires par contacts ou par l'environnement (Koch and Elbers, 2006).

Si les facteurs favorisant l'introduction infectieuse depuis l'avifaune sont particulièrement remarquables dans l'initiation des épidémies d'IAHP, ils permettent aussi des échanges mutuels d'autres agents infectieux que les VIAHP à l'interface entre avifaune et palmipèdes gras. Ainsi, cette filière montre une forte prévalence de VIAFP de sous-types H5 ou H7 (souvent au-delà de 5% et jusqu'à plus de 30%) à l'échelle européenne (Gonzales et al., 2010), tandis que les analyses phylogénétiques montrent des introductions distinctes depuis le réservoir sauvage (Cherbonnel et al., 2007; Marinova-Petkova et al., 2016). L'écologie similaire entre VIAFP et VIAHP permet d'utiliser localement l'épidémiologie des premiers pour identifier et mieux cibler les mesures de prévention sur les sites à risque d'introduction ou de diffusion. C'est sur cette idée que s'est mise en place une surveillance de grande envergure des VIA au sein de la filière palmipèdes gras depuis 2018, motivée par la Commission Européenne et mettant en commun les compétences de l'Anses (et son LNR influenza à Ploufragan), de l'ENV), et du CIFOG (DGAL, 2021a, 2018). Ce dispositif prévoit ainsi le dépistage virologique par autocontrôle (à la charge des opérateurs) de 20 individus de chaque lot de palmipèdes prêts-à-engraisser avant leur mouvement vers un site d'engraissement extérieur à l'élevage d'origine. Grâce à cette surveillance, le site foyer index régional de décembre 2020 dans les Landes avait par exemple été systématiquement identifié infecté de VIAFP sur les lots des hivers précédents, démontrant une exposition particulière de cet élevage à l'introduction de VIA (Anses, 2021). S'ils ont lieu pour les VIA très surveillés, on imagine que de tels échanges infectieux entre compartiments sauvage et domestique dans la région peuvent se produire pour une variété d'autres agents infectieux décrits précédemment.

Au-delà des risques économiques que représentent les introductions et circulations infectieuses variées dans la filière palmipèdes gras du Sud-Ouest de la France, se pose aussi un risque important de santé publique. En effet, l'organisation et le mode d'élevage impliquent de nombreuses interventions humaines nécessitant la manipulation des animaux (Figure 19). Les manipulations sont quotidiennes en particulier en fin d'élevage au moment de l'engraissement, tandis que les oiseaux ont cumulé plusieurs semaines d'expositions infectieuses en plein air et peuvent présenter une excrétion renforcée à la faveur du stress induit. Les manipulateurs de gavage et d'abattoir (accrochage et plumage surtout) se trouvent alors particulièrement à risque d'être exposés aux agents infectieux des palmipèdes. Par conséquent, *Chlamydia psittaci* a été à de multiples occasions identifiée chez des personnes exposées dans la filière foie gras, provoquant parfois des symptômes graves (Laroucau et al., 2009; Vorimore et al., 2015). La sensibilisation à la protection des agents exposés aux canards ou à leur environnement direct durant les diverses interventions est donc primordiale pour prévenir des maladies professionnelles débilitantes (Hulin, 2016; Sraka, 2004). Si les infections à chlamydia parfois symptomatiques révèlent la forte exposition des professionnels de la filière, celle-ci pourrait avoir lieu avec tout autre agent zoonotique. La circulation importante de VIAHP chez les palmipèdes gras pourrait ainsi représenter un risque sanitaire humain potentiel en cas d'évolution zoonotique d'une souche, notamment celles du clade 2.3.4.4.b circulant répétitivement et dont le potentiel d'une telle évolution est reconnu (Shi and Gao, 2021). Cela constitue un des motifs de la lutte contre l'introduction de ces virus dans le secteur domestique, immense réservoir d'émergences de possibles variants viraux et très proche de l'Homme. Dans ce contexte, et afin d'accompagner scientifiquement et techniquement les progrès nécessaires en termes de biosécurité en élevages avicoles, la Chaire de Biosécurité Aviaire a été construite en octobre 2016 à l'initiative de l'ENVT. En partenariat avec différents autres acteurs publics (INRA, ANSES, ONCFS, DGAL) et les organisations professionnelles (SNGTV, CIFO, GDS France, ITAVI), ce dispositif de plusieurs années vise à faire face globalement et durablement aux enjeux de biosécurité dans la filière. Le dispositif a ainsi pour objectifs de contribuer à la formation et à la recherche dans ce domaine, mettant un accent particulier sur les élevages de palmipèdes gras (DGAL, 2016c).

III. Description écologique et épidémiologie de l'avifaune sauvage locale

a. Écologie des populations d'oiseaux sauvages du Sud-Ouest de la France

La situation géographique de la région du Sud-Ouest de la France entre littoral Atlantique et piémont pyrénéen favorise différentes caractéristiques environnementales qui influencent l'écologie et l'épidémiologie de la population d'avifaune sauvage. Comme évoqué dans le paragraphe précédent, la localisation géographique favorise un climat humide, avec des précipitations fréquentes et un cumul abondant, qui viennent alimenter un réseau hydrique important descendant des Pyrénées et s'écoulant vers l'Adour et la Garonne (Figure 22). À ce réseau hydrographique de surface naturel s'ajoutent des

retenues d'eau artificielles formant des plans d'eau parfois très vastes, et qui permettent d'alimenter les cultures locales telles que le maïs qui a des besoins importants en eau durant la saison estivale moins pluvieuse.

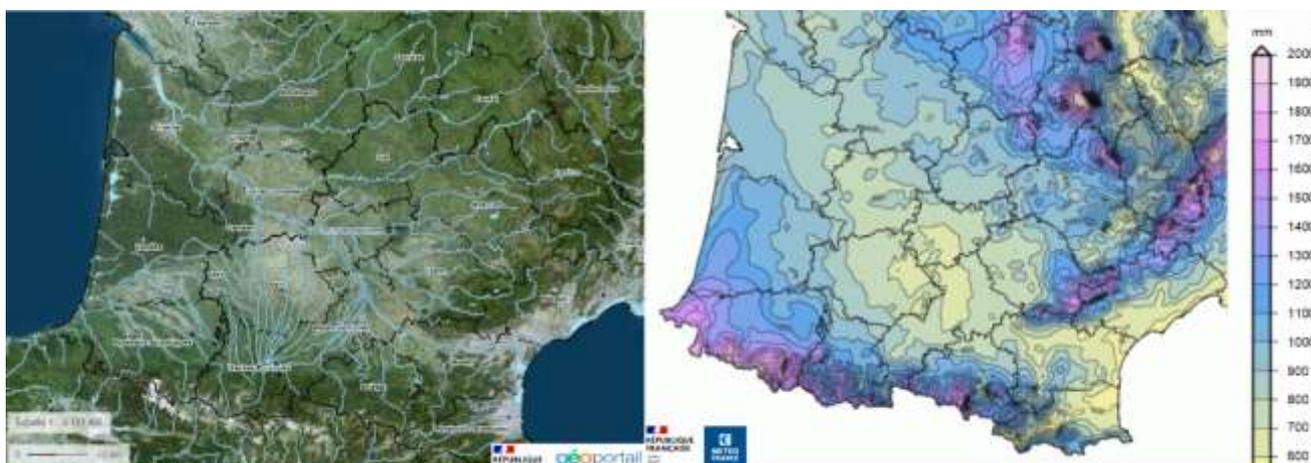


Figure 22 - Hydrographie et pluviométrie du Sud-Ouest de la France.

À gauche : Réseau hydrographique et photographie aérienne, issu de Géoportail (<https://www.geoportail.gouv.fr/>, 2021).

À droite : Moyenne sur 1981-2010 des cumuls annuels de pluviométrie, issu de Météo France (<https://meteofrance.com/actualites-et-dossiers/magazine/meteo-questions/ou-et-quelle-periode-pleut-il-le-plus-en-france-metropolitaine>, 2021).

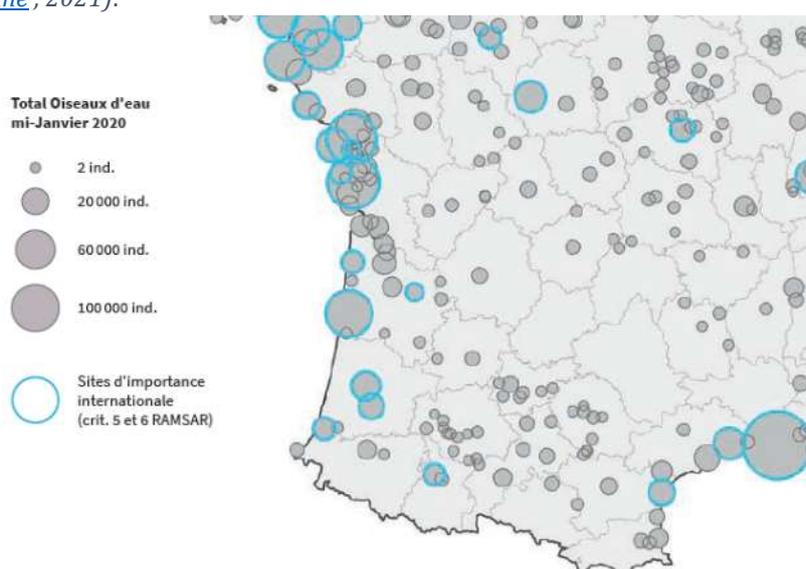


Figure 23 - Sites du réseau de comptage Wetlands International dans le Sud-Ouest de la France, et leurs effectifs moyens d'oiseaux d'eau sur les mois de janvier 2016 à 2020.

Issue de Schmaltz et al., 2020.

Cet environnement humide complexe, tempéré par la douceur océanique, crée des conditions favorables pour de nombreuses espèces d'oiseaux aquatiques, qu'ils soient sédentaires ou migrateurs venant y passer la saison d'hivernage ou en halte migratoire. En effet, la région comprend de nombreux plans d'eau où les oiseaux aquatiques font l'objet de suivis par comptages hivernaux (Schmaltz et al., 2020), et dont quelques-uns sont classés comme sites d'importance internationale, selon la Convention de RAMSAR, (Figure 23). Cette avifaune est composée de diverses espèces d'Anseriformes (canards de surface et

plongeurs, oies, cygnes), de Charadriiformes (goélands, mouettes, sternes, limicoles), de Suliformes (cormorans), de Péléciformes (hérons, aigrettes, ibis, spatules), ou encore de Gruiformes (grues cendrées *Grus grus*). Les sites classés RAMSAR sont particuliers pour leur taille globale de population hivernante d'avifaune aquatique (Réserve Nationale de Faune d'Arjuzanx dans les Landes), ou pour abriter plus de 1% de la population mondiale hivernante de grues cendrées (Arjuzanx, autres sites des Landes, Lac de Puydarrieux en Hautes-Pyrénées) ou de canards souchets *Spatula clypeata* (Réserve Naturelle Nationale du Marais d'Orx dans les Landes) (Schmaltz et al., 2020).

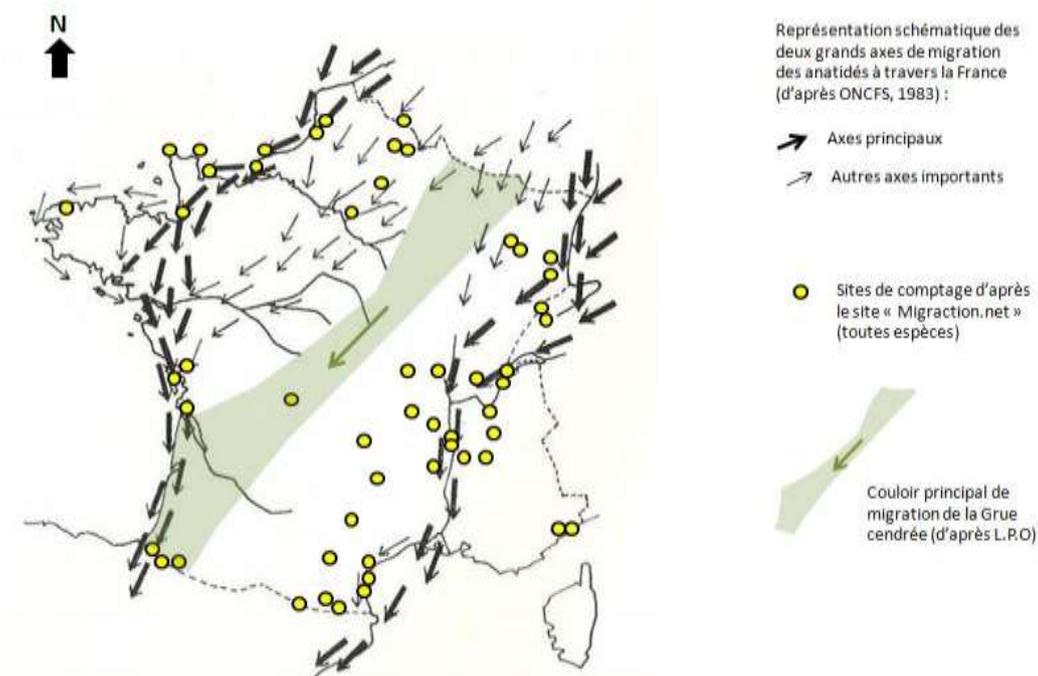


Figure 24 - Axes et sites observatoires de migration de l'avifaune aquatique (Anatidés et Grues cendrées) en France.

Issue de B.E.T. (<https://bet-barussaud.fr/oiseaux-les-couloirs-de-migration-existent-ils/>, 2017).

Outre un environnement favorable à l'avifaune aquatique en particulier en hiver, la région se situe sur l'axe de migration aviaire ouest-européen, longeant le littoral océanique depuis la mer du Nord et la Manche, puis traversant les Pyrénées par le littoral ou par les cols de montagne (Figure 24). Mais il faut préciser que la France et en particulier le Sud-Ouest se trouvent plutôt en bordure de l'aire de répartition hivernale et en fin de parcours migratoire postnuptial pour les Anseriformes, qui arrivent souvent d'Europe du Nord-Est voire d'Asie centrale (Scott and Rose, 1996). La région voit donc ces oiseaux sauvages aquatiques arriver tardivement en automne et plus sporadiquement que d'autres pays européens comme les Pays-Bas, l'Allemagne ou le Danemark (Guillemain et al., 2021). De plus, ces populations d'Anseriformes réalisent des déplacements depuis les pays voisins, plutôt que directement depuis l'Europe de l'Est et l'Asie comme le font les canards bagués aux Pays-Bas par exemple (Figure 25). On voit notamment que des canards qui ont été capturés durant l'hiver aux Pays-Bas se retrouvent aussi parfois en France et dans le Sud-Ouest, démontrant que ces populations participent à des mouvements

régionaux intra-saisonniers au gré du climat et des ressources, qui ne sont pas négligeables au regard de l'épidémiologie des agents infectieux (Guillemain et al., 2021).

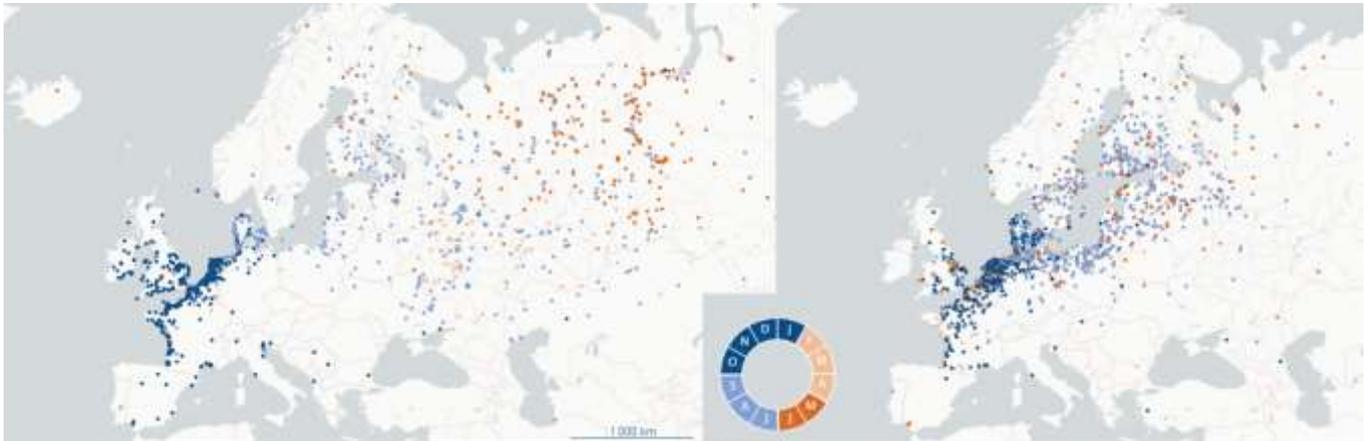


Figure 25 - Sites de marquage et de contrôle (capture physique ou visuelle) de canards ayant été marqués ou observés en hiver aux Pays-Bas.

Les couleurs des points de localisation représentent la saison à laquelle l'observation a été faite. **À gauche**, Canards siffleurs (*Mareca penelope*) réputés migrateurs de longue distance. **À droite**, Canards colverts (*Anas platyrhynchos*) à comportement migratoire variable. Issues de vogeltrekatlas.nl, 2021.

À côté des migrations et hivernages importants de l'avifaune aquatique dans la région du Sud-Ouest de la France, les espèces terrestres tels que les Passériformes, les Columbiformes ou encore les rapaces s'y comptent abondamment. En effet, l'axe de migration ouest-européen est également suivi par les migrateurs terrestres, certains atteignant l'Espagne, l'Afrique du Nord voire les régions sub-sahariennes pour hiverner et n'étant que de passage à l'automne. D'autres hivernent dans le Sud-Ouest en provenance de sites de reproduction nordiques (Newton, 2007a). C'est le cas par exemple des Turridés (grives et merles) qui nichent en Europe du Nord et Scandinavie, et dont les populations à l'automne (hivernantes ou migratrices) se superposent dans le Sud-Ouest de la France (Lahournat et al., 2021) (Figure 26). La ligne des Pyrénées joue peut-être un rôle dans l'adaptation des comportements migratoires, celle-ci formant une barrière naturelle (altitude et vents) sur le trajet descendant des migrateurs ouest-européens (Alerstam and Ulfstrand, 1974; Cavina, 2014), tandis que les milieux naturels et agricoles du piémont ainsi que le climat y sont favorables à un séjour hivernal. Ainsi, les populations de Pigeon ramier (*Columba palumbus*) sont importantes en automne-hiver dans le Sud-Ouest en comparaison d'autres régions de France, cumulant les populations sédentaires croissantes (Fontaine et al., 2020) avec les hivernantes et migratrices transpyrénéennes (Hobson et al., 2009). De nombreuses autres espèces qui hivernent dans le Sud-Ouest de la France proviennent de régions nordiques de la France et au-delà, essentiellement des passereaux insectivores ou à alimentation mixte (Newton, 2007a) comme les rougegorges familiers (*Erithacus rubecula*) et autres Muscicapidés, les étourneaux sansonnets (*Sturnus vulgaris*), les bergeronnettes grises (*Motacilla alba*) et pipits (*Anthus spp.*), mais aussi des granivores tels que les pinsons (*Fringilla sp.*) et autres Fringillidés. Ces populations migratrices viennent selon les espèces remplacer ou se superposer aux populations sédentaires locales.

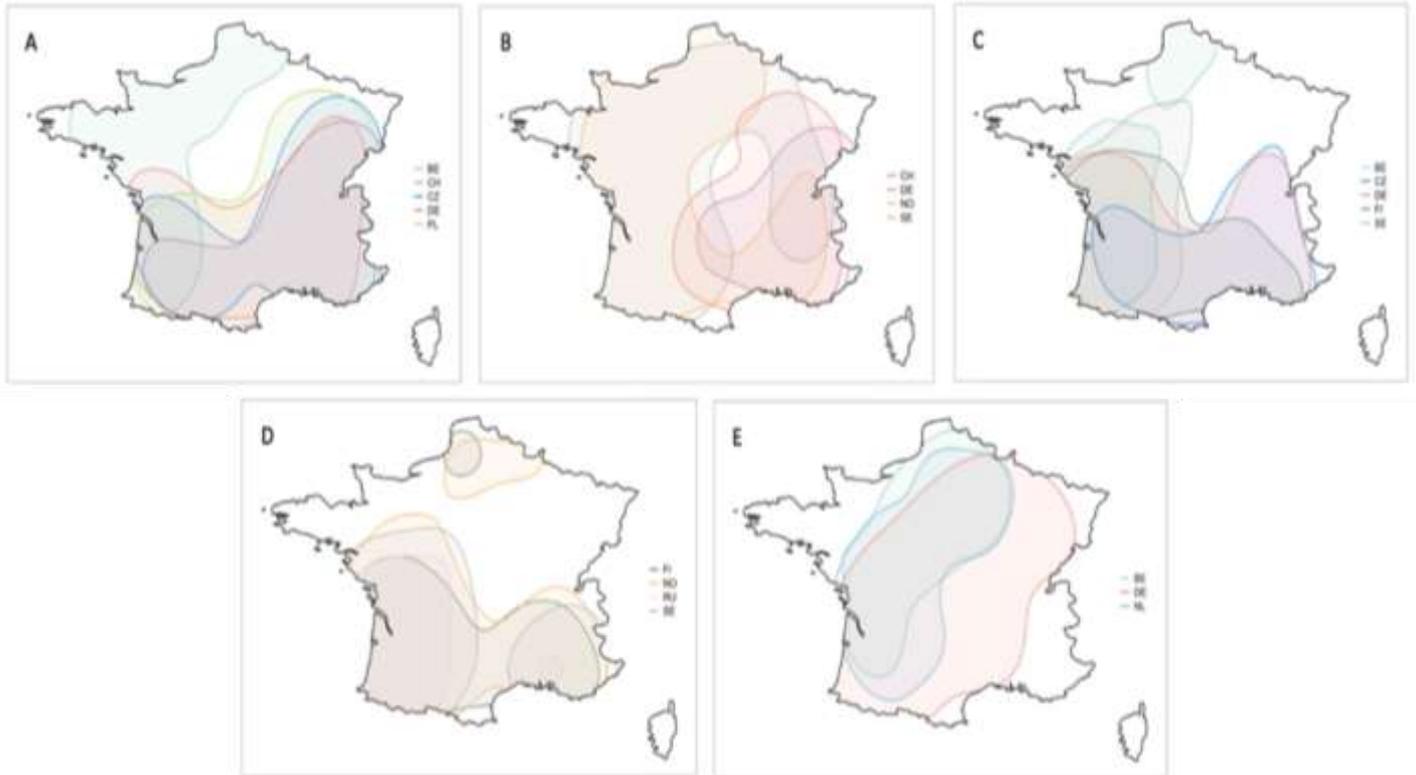


Figure 26 - Distribution spatiale des contrôles en France à l'automne de turridés marqués dans divers autres pays européens.

Estimation de l'aire géographique à 70%. Chaque pays d'origine (reproduction) des populations contrôlées est indiqué par une couleur distincte : BE - Belgique, CH - Suisse, CZ - Tchéquie, DE - Allemagne, PL - Pologne, NO - Norvège, SE - Suède, FI - Finlande, RU - Russie, NL - Pays-Bas.

A- Merle noir *Turdus merula* ; **B-** Grive litorne *Turdus pilaris* ; **C-** Grive musicienne *Turdus philomelos* ; **D-** Grive mauvis *Turdus iliacus* ; **E-** Grive draine *Turdus viscivorus*. Issue et adaptée de Lahournat et al., 2021.

On remarque cependant que malgré les suivis de migration et de populations aquatiques en hivernage, la dynamique annuelle et de long terme des populations d'avifaune du Sud-Ouest de la France est relativement méconnue en comparaison d'autres régions françaises. Notamment, la densité du réseau de naturalistes amateurs participant au partage de données de recensement d'oiseaux participatives, par exemple sur la base commune Faune-France (<https://www.faune-france.org/>), est faible dans la région (Figure 27a). Ainsi le Gers est 93^{ème} sur 96 départements pour le nombre de contributeurs actifs (n=270), et 85^{ème} sur 96 pour le nombre de contributions (n=172 190, soit 0,2% de la France) pour l'année 2021. On observe les mêmes tendances pour le programme national de suivi temporel des populations d'oiseaux communs (STOC), qui demande plus de compétences ornithologiques et reflète aussi le dynamisme associatif et professionnel de l'ornithologie locale pour recruter des participants (Fontaine et al., 2020) (Figure 27b). Ces faibles chiffres de contributions participatives sont aussi corrélés à la plus faible population dans ces zones essentiellement rurales, le Gers représentant par exemple 0,3% de la population française.

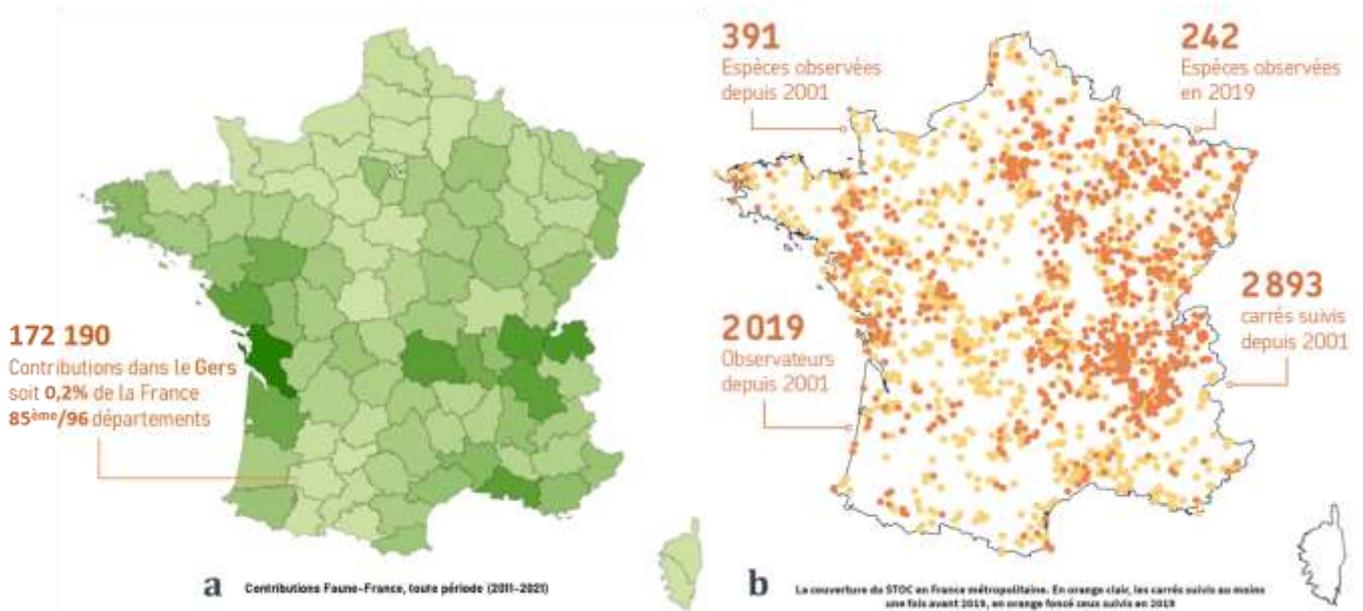


Figure 27 - Distribution des données ornithologiques participatives en France.

a - Nombre relatif de contributions de tout type (données ponctuelles, listes exhaustives, programmes nationaux) dans le Gers en comparaison du reste de la France. Issue et adaptée de <https://www.faune-france.org/> octobre 2021.
b - Localisation des points de suivi du programme STOC couverts entre 2001 et 2019 (**orange clair**), et en 2019 (**orange foncé**). Issue de Fontaine et al., 2020.

Pourtant, le programme STOC a permis de montrer un fort déclin à l'échelle nationale des populations d'avifaune terrestre en milieu rural (-29,5% de 1990 à 2020), tandis que les espèces généralistes s'adaptent et prennent les niches écologiques vacantes (+19,4% de 1990 à 2020) (Fontaine et al., 2020). Le suivi de ces changements justifie donc aussi une couverture spatiale et temporelle d'autant plus détaillée des milieux ruraux, en particulier dans les régions négligées comme le Sud-Ouest. Dans les populations aquatiques également des changements écologiques sont en cours, avec un certain nombre d'espèces en déclin quand d'autres sont en expansion. Ainsi, le Héron Garde-bœufs (*Bubulcus ibis*) montre la plus forte augmentation de population d'oiseaux d'eau, croissante de 21% sur 2008-2020 (Schmaltz et al., 2020). Là encore, le manque de données spatio-temporelles (hors sites de comptage annuel) sur ces espèces limite la compréhension des changements en cours en termes de démographie, d'utilisation des milieux et donc de possibles interactions avec d'autres compartiments, domestiques notamment.

b. Épidémiologie des agents infectieux de l'avifaune du Sud-Ouest de la France

Concernant l'épidémiologie des agents infectieux de l'avifaune dans la région du Sud-Ouest de la France, elle est essentiellement étudiée en relation avec les maladies des élevages avicoles, en particulier l'influenza aviaire. Ainsi, une faible contamination par les VIAHP a été détectée par surveillance événementielle dans le réservoir de l'avifaune aquatique locale en comparaison d'autres régions européennes (Anses, 2021; EFSA et al., 2021a). En parallèle, le rôle épidémiologique de l'avifaune commensale a été étudié dans la région par le même dispositif de surveillance événementielle (SAGIR) et

par des programmes de surveillance active. En effet, le besoin d'étudier cette population observée abondamment sur les élevages de volailles s'est rapidement fait ressentir pour comprendre leur implication potentielle dans la circulation virale, et adapter les mesures de protection avant et après l'apparition de foyers. Les différentes hypothèses étudiées étaient que l'avifaune pourrait réaliser quelques déplacements infectieux biologiques ou mécaniques entre sites (élevage-élevage ou aquatique-élevage) grâce à la densité spatiale des élevages en plein air de la région, voire qu'elle pourrait jouer un rôle de réservoir secondaire local et permettre l'entretien de la circulation virale au moins jusqu'au repeuplement des élevages assainis (Anses, 2016). Durant l'épidémie de VIAHP de 2015-2016, dont l'origine est l'élevage (mutation d'un H5 FP en HP), des recherches virologiques ont ainsi été réalisées : (i) dans l'avifaune commensale capturée aux filets (600 passereaux) sur 37 élevages foyers ; (ii) dans 3 colonies de hérons garde-bœufs de la région (138 fèces) ; (iii) dans les centres de sauvegarde de la faune sauvage de la région (9 rapaces et 1 cincle plongeur) ; (iv) ainsi que dans les corvidés piégés dans la région (23 individus) (Anses, 2016). Réalisés au mois de mai, alors que l'essentiel des élevages ont été infectés en décembre-janvier, ces prélèvements se sont révélés tous négatifs pour le sous-type H5. Étant donnée la durée d'excrétion virale limitée à quelques jours après l'infection chez les espèces ciblées, la fenêtre temporelle retardée par rapport aux foyers en élevage n'a donc pas permis de montrer de transmission à l'avifaune commensale. Si celle-ci avait eu lieu, l'étude a en tout cas montré une absence de maintien durable de l'infection dans les populations ciblées. Les tailles d'échantillons limitées sur chaque site ont aussi pu empêcher la détection de faibles prévalences locales. La surveillance événementielle renforcée durant la période à risque sur la zone Sud-Ouest n'a pas non plus permis d'identifier de cas sauvages parmi les oiseaux analysés (Le Bouquin et al., 2016). L'hiver suivant, c'est un H5N8 originaire de l'avifaune aquatique migratrice en provenance d'Asie centrale qui atteignait l'Europe. L'épidémiologie de ce VIAHP dans la faune sauvage s'est avérée bien différente en comparaison de l'épisode précédent, avec 52 cas détectés par surveillance événementielle dans l'avifaune française, dont 27 dans le Sud-Ouest, d'espèces commensales (Passériformes, Columbiformes, rapaces, Hérons garde-bœufs) et aquatiques (canards, goélands) (Van De Wiele et al., 2017). Un programme de surveillance virologique active de l'avifaune commensale a été mis en place en urgence par tirs ciblés (324 individus) sur 29 foyers d'élevages immédiatement après dépeuplement (Van De Wiele et al., 2017), ainsi que sur une des précédentes colonies de hérons garde-bœufs servant de dortoir hivernal (127 fèces) (Phouratsamay, 2018). Tous ces prélèvements se sont révélés négatifs pour les VIA, mais les espèces commensales ciblées par tirs (Columbiformes et Sturnidés, ainsi que Corvidés, Vanneaux et Hérons garde-bœufs) n'incluaient pas les petits Passériformes plus abondamment observés sur les élevages et capturés l'hiver précédent. Là encore, les effectifs prélevés sur chaque site ont pu limiter la sensibilité de détection pour de faibles prévalences virologiques. Pour ces deux hivers consécutifs, aucune analyse sérologique de l'avifaune n'a été réalisée, limitant aussi la fenêtre temporelle de détectabilité d'éventuelles infections. Il est donc nécessaire de compléter ces études épidémiologiques locales, en dehors et durant les épisodes

épidémiques à VIAHP, afin d'améliorer les connaissances sur la circulation de ces virus entre les élevages de volailles en plein air et leur avifaune commensale.

Le Héron Garde-bœufs a été particulièrement ciblé par ces études locales car observé fréquemment par les éleveurs de volailles sur les parcours extérieurs à proximité des oiseaux domestiques, et souvent par groupes de dizaines voire centaines d'individus. Il est en outre de taille moyenne (300 g environ) et capable de voler rapidement sur de grandes distances, et affectionne particulièrement les élevages et les zones humides pour s'alimenter et se reposer. Il peut ainsi représenter un hôte relais idéal pour les VIA et autres agents infectieux des oiseaux aquatiques à l'interface entre élevages et réservoir naturel. Sa population est également en forte expansion depuis quelques années, avec une écologie encore méconnue dans la région. Ici comme ailleurs en Europe, l'espèce a donc été désignée comme potentiel hôte relais des VIA pour les élevages qu'il fallait cibler dans les études de surveillance infectieuse (Veen et al., 2007). Grâce à ce ciblage particulier, les prélèvements de fèces réalisés entre 2016 et 2017 sur colonies et dortoirs de la région pour la surveillance de VIA ont aussi permis une évaluation de leur niveau d'excrétion pour d'autres agents infectieux potentiellement présents en élevages (Phouratsamay, 2018). Les populations semblaient donc porteuses de MG à des prévalences variant entre 0% et 20,2% selon les sites et les périodes, ainsi que de *Chlamydia* sp. à des prévalences entre 3,3% et 8,1%. Sans identification plus précise, il est impossible de certifier que ces portages infectieux participent au rôle épidémiologique des hérons garde-bœufs autour des élevages. Cette étude donne cependant des pistes à poursuivre dans d'autres populations de la région ou sur une période de suivi plus longue, afin d'évaluer plus précisément ce possible rôle. Si aucun VIA n'y a été identifié, la durée d'excrétion brève et les faibles prévalences attendues en période non-épidémique expliquent sans doute ces résultats. On peut cependant se fonder sur la détection et l'identification de souches de chlamydia ou de mycoplasmes en tant que marqueurs dans cet hôte sauvage potentiel relais. Ainsi la détection de souches identiques à celles d'élevages ou identiques à celles d'espèces sauvages permettrait d'évaluer le niveau de contacts infectieux réalisés par cette espèce à l'occasion de ses visites sur les élevages ou sur les sites réservoirs aquatiques, respectivement.



Objectifs de travail

Dans le contexte des changements agricoles et écologiques en cours, il devient essentiel de mieux appréhender les interfaces épidémiologiques entre avifaune et élevages avicoles. Ce besoin est particulièrement pressant dans le bassin de production de volailles du Sud-Ouest de la France après une succession de crises sanitaires dues à l'IAHP au cours des hivers 2015-2016, 2016-2017 puis 2020-2021. Les limites techniques et méthodologiques des études précédentes sur l'avifaune commensale des élevages avicoles de la région doivent aussi être dépassées afin de compléter les premières conclusions.

Afin d'éclairer globalement le rôle épidémiologique de l'avifaune commensale vis-à-vis des agents infectieux des volailles, les questions que nous avons essayé d'explorer sont les suivantes : quelle population d'avifaune fréquente les élevages de volailles en plein air au fil des saisons ? Quelles sont les interactions écologiques pouvant favoriser les échanges infectieux à cette interface sauvage-domestique ? Les interactions observées sont-elles efficaces pour les éventuels échanges infectieux ?

Dans le but d'objectiver les occasions d'échanges infectieux entre les compartiments aviaires sauvage et domestique, il est nécessaire de commencer par une évaluation écologique de cette interface. En effet, les recherches d'agents infectieux sont fastidieuses et limitées en sensibilité de détection à l'échelle de populations très grandes que constitue l'avifaune commensale. Il est donc indispensable de cibler spatio-temporellement et taxonomiquement les programmes de prélèvements biologiques, sur le principe d'une surveillance basée sur le risque. Les espèces les plus abondantes ou bien connues pour leur bonne réceptivité à certains agents infectieux sont alors des cibles préférentielles d'étude épidémiologique. La phase initiale de l'étude de l'interface est passée alors par le recensement des espèces aviaires présentes sur la zone d'étude, ceci à l'échelle géographique la plus restreinte possible pour tenir compte des spécificités d'habitat et de niche écologique, et sur différentes saisons étant données les potentielles variations de populations. Cet inventaire a permis d'évaluer les abondances des différentes espèces de l'avifaune au cours du temps autour du site d'étude. Afin de mieux caractériser le risque épidémiologique local représenté par les espèces les plus pertinentes (abondantes, réceptives...), l'étude de leurs déplacements entre sites a permis de mettre en évidence la possibilité d'un rôle de relais infectieux. Pour mieux préciser les modalités d'éventuels échanges infectieux, il était nécessaire de mener une étude plus détaillée des interactions comportementales entre populations à l'interface sauvage-domestique. Enfin, ces modalités objectivées ont pu être confrontées aux résultats d'une analyse du statut sanitaire vis-à-vis de quelques marqueurs infectieux des populations de chaque compartiment de l'interface. Cette comparaison a permis d'évaluer l'efficacité des interactions existantes pour les transmissions infectieuses d'un côté à l'autre de l'interface.

Ce travail a été mené dans le contexte particulier d'un élevage de canards mulards en plein air caractéristique du Sud-Ouest de la France, choisi comme modèle d'étude. Dans ce contexte, les objectifs du travail expérimental suivant sont donc : (i) d'établir par différentes méthodes comparées une description de la population d'oiseaux sauvages fréquentant ces élevages, permettant d'en caractériser les espèces commensales ; (ii) d'évaluer plus finement les interactions de cette communauté avec le compartiment domestique, à l'échelle d'un élevage mais aussi entre sites d'élevages et réservoirs aquatiques sauvages ; et enfin (iii) de caractériser le profil infectieux des compartiments de l'interface par différentes méthodes de prélèvement complémentaires, orientées sur les VIA ainsi que d'autres marqueurs d'échanges infectieux.

Les résultats et conclusions présentés dans ce document devraient permettre de mieux appréhender les risques épidémiologiques que représentent les contacts directs et indirects avec l'avifaune commensale à travers le modèle des canards élevés en plein air, ceci pour éclairer les décisions de gestion et prévention sanitaires à l'échelle des élevages ou des filières.



~ ~ ~

Deuxième partie : Étude expérimentale

~ ~ ~



A. Étude écologique et comportementale de l'avifaune commensale autour d'un élevage avicole plein air

I. Description de la population d'avifaune sauvage fréquentant un élevage avicole en plein air

a. Introduction

Dans le cadre de l'étude de l'interface épidémiologique entre l'avifaune commensale et un élevage avicole, il est essentiel de disposer d'une base de référence de la composition de la population sauvage fréquentant le site étudié. En effet, chaque espèce de la communauté se distingue des autres par son écologie, et donc par ses implications potentielles dans les circulations infectieuses. Comme évoqué précédemment, la région du Sud-Ouest français est particulière par sa situation géographique, ainsi que par son profil de milieux essentiellement ruraux dont la biodiversité aviaire est en forte tendance évolutive ces dernières décennies. La bonne connaissance des éventuels acteurs épidémiologiques locaux est donc un prérequis essentiel avant toute investigation plus ciblée les concernant. La caractérisation de la population d'avifaune permettra alors d'établir quelles sont les espèces sauvages commensales, c'est-à-dire les espèces abondantes ou fréquentes sur le site car occupant une niche écologique adaptée aux élevages. Parmi celles-ci, on pourra aussi évaluer lesquelles sont les plus abondantes et quelles sont celles qui présentent a priori une bonne réceptivité à certains agents infectieux. Cette phase descriptive initiale passera ainsi par le recensement des espèces aviaires présentes sur la zone étudiée, ceci à l'échelle géographique la plus restreinte possible pour tenir compte des spécificités d'habitat et de niche écologique, et ce sur différentes saisons étant données les potentielles variations de populations. L'objectif de cette caractérisation écologique est de pouvoir ensuite mener une étude épidémiologique adaptée au contexte local. Grâce à l'usage de méthodes standard dont les résultats seront aisément comparables, la constitution d'une telle référence servirait aussi pour situer cette population en comparaison d'autres contextes : naturels ou anthropisés, autres élevages. Elle pourrait aussi permettre de situer l'état actuel de la population dans une perspective d'en suivre l'évolution dans le futur.

b. Matériel et méthodes

Choix et description du site d'étude

Un élevage unique a été choisi pour cette étude afin de concentrer les efforts nécessaires à notre approche pluridisciplinaire. Celui-ci a été sélectionné comme représentatif du système de production de canards à foie gras, situé dans le sud du département du Gers et produisant sous appellation IGP « Canard à Foie Gras du Sud-Ouest ». L'attraction de l'avifaune y est a priori forte puisque cet élevage suit un programme d'agroforesterie (Bestman et al., 2018), qui a amené à y conserver ou planter des haies d'arbres fruitiers en périphérie de certains parcours des canards, ainsi que des essences à bois sur l'ensemble des parcours (Figure 28a). Outre ce contexte environnemental favorable à l'étude ornithologique de l'interface

sauvage-domestique, l'élevage était aussi adapté à l'étude épidémiologique orientée sur les VIA puisqu'il s'intègre par ses multiples échanges dans le réseau de la filière foie gras du Sud-Ouest, et a été foyer d'IAHP durant l'épidémie de 2016/2017 (Figure 28b). Enfin, les derniers critères de choix portaient sur les facilités logistiques, très importantes à considérer pour notre étude de longue durée. L'élevage était ainsi situé à une distance raisonnable du laboratoire (1h30 de route) permettant d'y intervenir rapidement en cas de besoin et surtout de rapatrier rapidement les prélèvements biologiques fraîchement collectés pour une préservation optimale au laboratoire. De plus, les exploitants étaient très favorables à ces travaux de recherche, faisant preuve d'une grande ouverture d'esprit et facilitant dès que possible les protocoles mis en œuvre sur leur propriété, sans pour autant que leurs pratiques soient modifiées pour influencer d'une manière ou une autre l'étude.

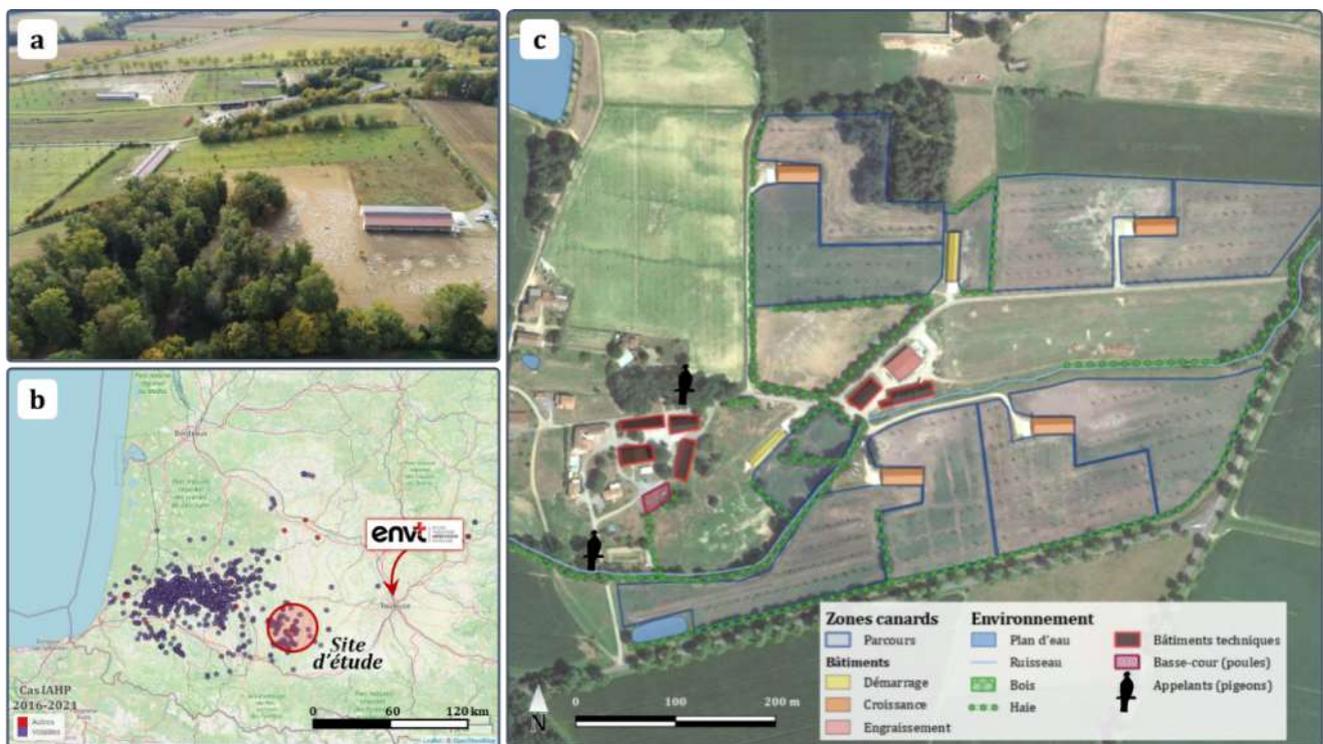


Figure 28 - Description et localisation du site d'étude.

a – Photographie aérienne depuis le Nord de l'élevage (image Benjamin Vollot).

b – Localisation du site d'étude comparée à la distribution des foyers d'IAHP de 2016 à 2021, ainsi qu'à la situation du laboratoire (figuré par le logo **envt**). Fond de carte issu de la cartographie interactive des foyers HPAI de la Plateforme ESA, accessible sur <https://shiny-public.anses.fr/shiny-vsi/> (novembre 2021).

c Vue aérienne et plan détaillé de l'élevage d'étude, montrant l'environnement et la présence d'autres oiseaux domestiques autour des zones d'élevage des canards.

L'élevage est composé de deux bâtiments dits « canetonnières », destinés à la phase de démarrage des canetons de 1 à 21-28 jours, attenants chacun à un petit parcours (0,5 ha) (Figure 28c). Les lots démarrés sont ensuite répartis pour leur phase de croissance jusqu'à 14-16 semaines dans quatre bâtiments attenants chacun à deux grands parcours (1,5 ha), utilisés en rotation d'un lot à l'autre. Les phases suivantes d'engraissement et d'abattage-transformation se font sur le site, avec un croisement de lots au moment de l'entrée en engraissement : réception de lots extérieurs pour optimiser le remplissage de la salle, et surtout envoi de lots vers des sites d'engraissement extérieurs.

Concernant l'environnement naturel du site qui pourrait influencer le profil des espèces sauvages présentes, l'élevage d'étude s'intègre à un paysage agricole de type polyculture et élevage comprenant diverses espèces animales (volailles, ruminants, équins essentiellement) ainsi que des cultures variées fourragères ou destinées à l'alimentation humaine. Ce paysage s'étend sur un relief collinaire en bas de piémont pyrénéen, caractérisé par une alternance de vallées agricoles et de reliefs boisés linéaires dans l'axe Nord-Sud. Ce relief favorise le drainage des eaux dans les rivières en fond de vallées, et les zones humides sont rares et peu étendues dans la région. Ainsi l'avifaune aquatique est relativement peu abondante, mais se concentre le long de ces rivières et surtout autour des réserves artificielles dispersées pour assurer les besoins en eau de l'agriculture. L'une des plus vastes à proximité du site d'étude (rayon de 20 km) est le lac de Puydarrieux, zone classée Natura 2 000 pour préserver l'habitat de 39 espèces d'oiseaux, et site d'importance internationale (convention de RAMSAR) pour sa population migratrice et hivernante de grues cendrées (*Grus grus*) représentant plus de 1% de la population continentale. Dans l'environnement proche de l'élevage, des points peuvent présenter une attractivité particulière pour l'avifaune ainsi qu'un possible risque infectieux. On note ainsi la présence de deux volières où sont gardés captifs des pigeons ramiers utilisés comme appelants pour la chasse, ainsi qu'une basse-cour d'une quinzaine de poules pondeuses, et quelques petits plans d'eau permanents dont l'un (au Nord-Ouest) de plus grande taille est utilisé comme réserve agricole (Figure 28c).

Recensement de la population d'avifaune

Les méthodes utilisées se sont donc principalement basées sur des outils classiques d'écologie, centrés sur le site d'étude. L'ensemble a été réalisé par Benjamin Vollot, ornithologue professionnel expérimenté, notamment en identification visuelle et auditive de toutes espèces de l'avifaune française, en suivis ornithologiques par les protocoles standardisés classiques, ainsi que dans les techniques de captures et manipulations.

Dans un premier temps, des transects standardisés d'environ 2,5 km de long ont été parcourus à pieds sur l'élevage, couvrant l'ensemble des zones de vie des canards et des types d'habitats naturels (Figure 29a). Ces transects ont été faits une fois par visite, en début de matinée ou fin d'après-midi et avant tout dérangement par d'autres protocoles de l'étude, afin d'optimiser les chances de détection d'un maximum d'espèces. À chaque réalisation du transect, l'ensemble des contacts visuels (confirmés aux jumelles) ou auditifs avec des oiseaux sauvages étaient notés (en vol ou à proximité du sol), pour finalement déterminer un effectif minimal. Lorsque des comportements permettaient de le préciser et en période de reproduction, l'indice de reproduction était aussi précisé. Celui-ci était défini selon la codification internationale à 16 niveaux établie par le European Bird Census Council (EBCC) (voir Annexe A). L'indice de reproduction le plus élevé (donc le plus certain) était conservé pour chaque espèce. En complément, afin de recenser l'avifaune nocturne à chaque visite, trois points d'observation ont été réalisés de nuit sur

les différents types d'habitats naturels du site (Figure 29a). Ces points ont consisté en l'observation et l'écoute durant cinq minutes, en notant chaque espèce contactée et son effectif minimal. En début d'écoute, afin d'augmenter leur détection, une séquence de cris des six espèces de rapaces nocturnes potentiellement présentes dans la zone géographique a été diffusée en boucle à trois reprises : Chouette hulotte (*Strix aluco*), Chevêche d'Athéna (*Athene noctua*), Effraie des clochers (*Tyto alba*), Petit-duc scops (*Otus scops*), Hibou moyen-duc (*Asio otus*) et Grand-duc d'Europe (*Bubo bubo*). L'ensemble de ces protocoles d'observation ont été réalisés par Benjamin Vollot, ornithologue professionnel expérimenté dont les identifications sont donc jugées fiables.

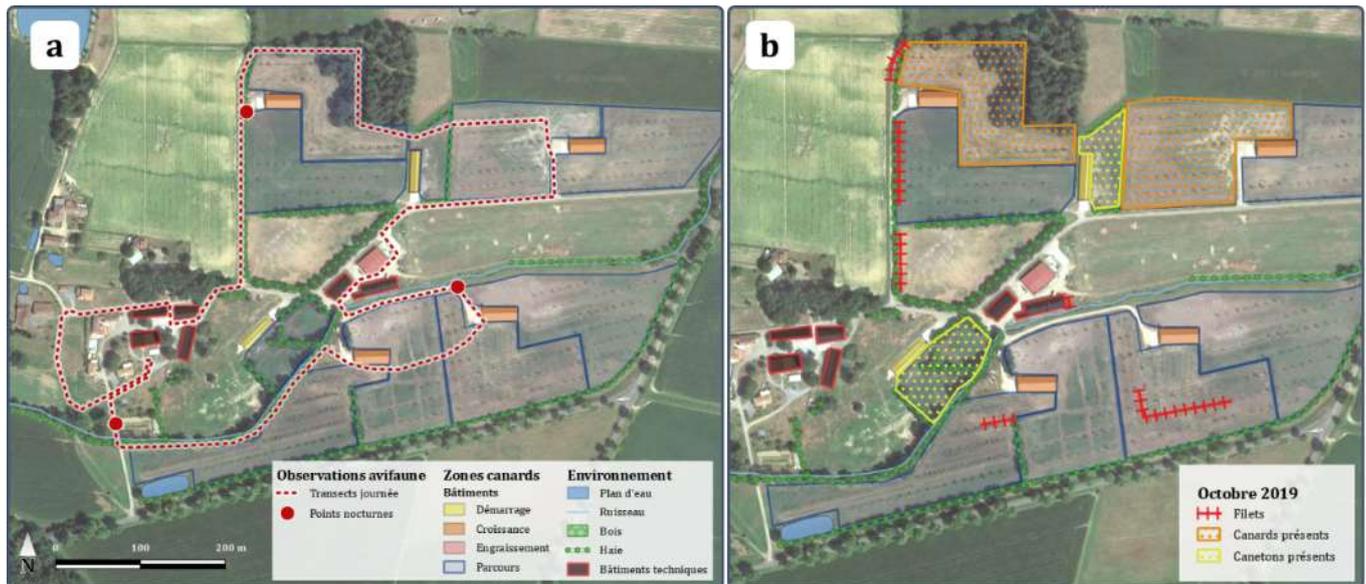


Figure 29 - Plan détaillé des protocoles de recensement ornithologiques sur l'élevage.

a – Plan des transects matinaux et points d'écoute nocturnes.

b – Configuration des parcours occupés par les canards et des filets japonais pour la session de captures d'octobre 2019.

En complément de ces protocoles d'observation, des sessions de captures de l'avifaune ont été mises en place dans le but de collecter des prélèvements biologiques et d'évaluer plus en détail la structure de leur population par CMR. La mise en place de cette méthode invasive sur des populations protégées par la réglementation a nécessité l'autorisation d'un programme personnel spécifique au projet auprès du CRBPO, et la compétence technique et scientifique de "bagueur généraliste" de Benjamin Vollot a été mise à contribution pour la réalisation des captures. Celles-ci ont été faites à l'aide de filets japonais tendus le long des haies en bordure ou sur les parcours, ciblant différents types d'habitats du site. Comme l'usage et donc la végétation et l'accès des parcours variaient au cours du temps au fil des rotations de lots, les filets ont été disposés en des emplacements différents à chaque session pour s'adapter à ces changements de contexte. Ces variations ont aussi permis de jouer sur l'effet de surprise en n'habituant pas les oiseaux à un même emplacement. La disposition des parcours occupés et des filets est illustrée par exemple pour la session d'octobre 2019 (Figure 29b). Ces sessions de captures duraient trois jours pour limiter le dérangement sur les populations locales, mais aussi afin de conserver un effet de surprise tout en

essayant de maximiser l'effectif capturé pour l'étude. Pour chaque individu capturé, une bague métallique d'identification individuelle par code alphanumérique fournie par le MNHN était posée à l'une des pattes. L'espèce, l'âge le plus précis possible, et le sexe si identifiable étaient notés. Des mesures biométriques étaient prises tant que possible, permettant d'évaluer l'état physiologique ou de caractériser la morphologie des individus : masse corporelle, état d'engraissement sous-cutané, stade de mue, longueurs de tarse ou d'aile, entre autres.

Afin de compléter notamment à d'autres périodes de la journée les recensements visuels par transects standardisés, et en profitant à moindre effort du temps passé sur le site pour les captures ou d'autres besoins, les oiseaux vus et entendus depuis l'élevage (en vol ou à proximité du sol) par tous les intervenants durant chaque visite sur place ont été notés tant que possible.

Les visites du site d'étude pour ce recensement ornithologique se sont réparties d'avril 2019 à novembre 2020, en six sessions d'observations standardisées et huit sessions de captures, résultant en dix visites différentes permettant des observations opportunistes (Tableau 2). La répartition s'est faite selon les contraintes logistiques (disponibilités des intervenants, météo favorable aux captures) et administratives (restrictions Covid-19 ou IAHP par exemple), tout en couvrant les différentes saisons biologiques de l'avifaune que sont la reproduction et l'hivernage séparées par des périodes de transition ou de migration selon les espèces.

Tableau 2 - Répartition temporelle des sessions de chaque protocole ayant servi à l'étude de la population d'avifaune.

Les saisons biologiques globales sont indiquées par un code couleur : **jaune** pour la saison de reproduction, **vert** pour la saison d'hivernage, et les tons plus clairs pour les périodes de transition et éventuelles migrations précédant ces saisons. Les intervenants principaux sont indiqués par leurs initiales : Benjamin Vollot et Chloé Le Gall-Ladevèze.

Numéro visite	Année	Mois	Date début	Date fin	Protocole	Intervenants principaux
1	2019	Avril	09/04/2019		Transect	B.V. – C.L.G.L
2	2019	Mai	20/05/2019		Transect	B.V. – C.L.G.L
3	2019	Juillet	22/07/2019	25/07/2019	Captures	B.V. – C.L.G.L
4	2019	Août	26/08/2019	29/08/2019	Captures	B.V. – C.L.G.L
5	2019	Octobre	22/10/2019	26/10/2019	Captures	B.V. – C.L.G.L
6	2019	Novembre	24/11/2019	27/11/2019	Captures	B.V. – C.L.G.L
7	2020	Janvier	27/01/2020	30/01/2020	Captures	B.V. – C.L.G.L
			28/01/2020		Nocturnes	B.V.
			31/01/2020		Transect	B.V.
8	2020	Février	21/02/2020		Nocturnes	B.V.
			22/02/2020	25/02/2020	Captures	B.V. – C.L.G.L
			22/02/2020		Transect	B.V.
9	2020	Mai	27/05/2020		Nocturnes	B.V.
			28/05/2020		Transect	B.V.
			28/05/2020	31/05/2020	Captures	B.V. – C.L.G.L
10	2020	Novembre	10/11/2020		Nocturnes	B.V.
			11/11/2020		Transect	B.V.
			11/11/2020	14/11/2020	Captures	B.V. – C.L.G.L

Analyse des données d'observation

De par leur caractère quasiment instantané, pour chaque transect les effectifs recensés pour chaque espèce étaient le résultat de la somme des individus vus ou entendus. À ces effectifs ont été ajoutés ceux résultant des triplets de points nocturnes du même mois (même session). Ceux-ci étaient calculés comme l'effectif maximal sur les trois points pour chaque espèce, puisque le protocole pouvait induire une attraction des mêmes individus. Ces effectifs recensés par les méthodes standardisées ont été comparés de façon descriptive aux résultats des observations opportunistes durant les sessions de captures. Cette méthode étant plus étalée dans le temps, les effectifs par espèce pour chaque session de trois jours ont été calculés comme l'effectif maximal dénombré simultanément sur toute la session. La comparaison des résultats standardisés et opportunistes a été réalisée en calculant pour chaque protocole les quartiles des effectifs par session où l'espèce était présente. À ces distributions d'effectifs ont été associées des indications sur la probabilité de reproduction de l'espèce sur ou à proximité du site d'étude d'après les comportements observés : nidification possible si des mâles chanteurs sont entendus, et nidification probable ou certaine si des comportements de couples, des nids occupés ou des poussins sont observés par exemple (voir Annexe A).

Les effectifs issus de chaque protocole d'observation ont servi à calculer pour chaque session des valeurs de richesse spécifique (nombre d'espèces), ainsi que des indices de diversité : indices de Shannon (H) et Simpson (D) (diversité spécifique pondérée par la fréquence) convertis en nombres effectifs d'espèces (Jost, 2006), et indice de Pielou (J) (équirépartition) basé sur l'indice de Shannon (Pielou, 1966). Ces indices ont été calculés comme suit à l'aide de la librairie 'vegan' sur R version 4.0.5 (R Core Team, 2019)

:

$$\mathbf{H} = \exp\left(-\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i\right) \quad (\text{Shannon});$$

$$\mathbf{D} = \frac{1}{\sum_{i=1}^S p_i^2} \quad (\text{Simpson});$$

$$\mathbf{J} = \frac{\ln \mathbf{H}}{\ln S} \quad (\text{Pielou});$$

avec p_i la proportion d'individus appartenant à l'espèce i , et S la richesse spécifique (nombre d'espèces), de sorte que $\sum_{i=1}^S p_i = 1$. Selon les définitions utilisées, l'indice de Shannon représente l'entropie dans la population échantillonnée, c'est-à-dire l'incertitude d'identifier l'espèce d'un individu tiré aléatoirement dans la population. L'indice de Simpson exprime la diversité également, mais représente la probabilité que deux individus tirés aléatoirement dans la population appartiennent à la même espèce. Cet indice est moins sensible que celui de Shannon aux espèces rares dans la population échantillonnée, ce qui le rend plus adapté à comparer des populations entre différents contextes (habitats, saisons) (Jost, 2006).

L'indice de Pielou, complémentaire des indices de diversité, représente l'équitabilité des abondances d'espèces, c'est-à-dire l'homogénéité de distribution des individus entre les différentes espèces (Jost, 2006; Pielou, 1966).

Analyse des données de captures-recaptures

Les captures et marquages individuels ont permis de calculer les mêmes richesses spécifiques et indices de biodiversité par session que décrits pour les protocoles d'observation.

c. Résultats

Analyse des données d'observation

Les observations opportunistes sur les 10 visites d'avril 2019 à novembre 2020 ont permis de détecter 99 espèces d'oiseaux, tandis que les observations standardisées sur 6 sessions de transects et points nocturnes ont permis de n'en détecter que 67 parmi les 99 précédentes. Dans les deux protocoles, certaines espèces ont été détectées seulement à une occasion, tandis que d'autres l'ont été plusieurs fois voire systématiquement comme les moineaux domestiques (*Passer domesticus*), moineaux friquets (*P. montanus*) ou bergeronnettes grises (*Motacilla alba*) (Figure 30). Parmi les espèces notées autour de l'élevage, 18 ont présenté des indices de reproduction locale probable à certaine, auxquelles s'ajoutent 32 espèces ayant des indices de reproduction possible (mâles chanteurs sur le site) (Figure 30). La plupart de celles-ci se retrouvent sans surprise en tête des fréquences d'observation au fil des visites. Pour les 67 espèces communes aux deux protocoles, ces fréquences sont globalement concordantes. En termes d'effectifs par session, la plupart des espèces ont été dénombrées à moins de six individus simultanés et même le plus souvent moins de deux, les observations opportunistes, non exhaustives, tendant à réduire ces dénombrements (médianes globales de deux sur les transects et un sur les opportunistes, troisièmes quartiles de six et trois respectivement) (Figure 30). En revanche, les observations opportunistes ont permis de détecter certains très gros effectifs absents lors des transects pour certaines espèces grégaires. On peut citer en particulier les pigeons ramiers (*Columba palumbus*) avec des groupes de 500 et 2 000 individus durant l'hiver 2020 tandis que le maximum dénombré par les transects était de 2 pour cette espèce, ou bien pour les hérons garde-bœufs (*Bubulcus ibis*) jusqu'à 400 individus observés ce même hiver quand au plus 18 ont été observés simultanément sur les transects. Les vanneaux huppés (*Vanellus vanellus*) ainsi que les grues cendrées (*Grus grus*) ont été eux absents des transects, mais dénombrés jusqu'à 100 et 24 individus par les observations opportunistes.

Les indices de biodiversité calculés à partir des deux protocoles d'observation ont également montré des différences. On retrouve ainsi que les observations opportunistes fournissent des valeurs de richesse spécifique par visite, systématiquement plus élevées pour ce type de protocole (34 à 57 espèces, contre

28 à 38 sur les transects et points nocturnes) (Figure 31a,b). Les indices de diversité spécifique de Shannon et de Simpson ont été concordants et globalement plus élevés sur les observations opportunistes, sauf durant l'hiver 2019-2020 où les grands groupes de quelques espèces citées plus haut ont fortement abaissé ces indices (Figure 31d,e). Enfin, l'équitabilité de Piélou a été en moyenne similaire entre les deux types de protocoles, autour de 0,7 à 0,8, sauf à nouveau pour les mêmes raisons durant l'hiver 2019-2020 où cet indice calculé à partir des observations opportunistes a chuté, révélant la répartition très hétérogène des abondances selon les espèces (Figure 31g,h).

Analyse des données de captures-recaptures

Les captures aux filets réalisées sur huit sessions de juillet 2019 à novembre 2020 ont permis d'identifier 59 espèces d'oiseaux, essentiellement de l'ordre des Passériformes qui est majoritairement ciblé par cette méthode (Figure 32). Les effectifs capturés par session de trois jours ont varié de 141 (février 2020) à 265 (août 2019) avec une moyenne à 207 captures, ce qui a résulté en un total de 1465 individus capturés et 1719 captures. En effet, 178 captures correspondaient à des recaptures d'individus précédemment capturés (soit environ 10% de recaptures), auxquelles se sont ajoutées 65 recaptures intra-session, ainsi que 11 morts (soit 0,64% pour un seuil d'acceptabilité estimé à 0,2% par le CRBPO). Parmi ces morts, cinq étaient liées au stress ou à une prédation au filet, et six étaient imputables au prélèvement sanguin, qui a donc été évité sur les pinsons des arbres (quatre morts) à partir de janvier 2020. Le pourcentage de recaptures inter-session était variable selon les espèces, nul pour les espèces migratrices ou capturées en très faibles effectifs, et s'élevant jusqu'à 64% pour les grimpeaux des jardins (*Certhia brachydactyla*) suivis par les moineaux friquets (25%) (Figure 32). Les effectifs capturés par sessions ont été assez variables, montant jusqu'à 61 pour les moineaux domestiques en août 2019 (Figure 32). Ainsi la distribution des espèces au fil des saisons n'était pas homogène, certaines étant capturées à chaque session (moineaux domestiques et friquets, rougegorges, pinsons des arbres, mésanges bleues - *Cyanistes caeruleus* et mésanges charbonnières - *Parus major*) et d'autres seulement en passage migratoire (gobemouches noirs - *Ficedula hypoleuca*, pouillots fitis - *Phylloscopus trochilus*, rousserolles effarvates - *Acrocephalus scirpaceus*), ou bien durant l'hiver (pipits - *Anthus spp.*, grives mauvis - *Turdus iliacus*, grosbecs - *Coccothraustes coccothraustes*, bécassines des marais - *Gallinago gallinago*) ou durant la saison de reproduction (rossignols - *Luscinia megarhynchos*, roitelets - *Regulus sp.*, fauvettes des jardins - *Sylvia borin* et fauvettes grisettes - *Sylvia communis*). Cette distribution temporelle des espèces capturées résulte en une richesse spécifique sur les sessions variant de 21 (janvier 2020) à 32 espèces (août 2019), soit légèrement inférieure à celle issue des observations standardisées (Figure 31a,c). En revanche, les indices de diversité de Shannon et Simpson, ainsi que l'indice d'équitabilité de Piélou, étaient similaires entre captures et observations standardisées (Figure 31d,f,g,i), révélant l'abondance plutôt homogène des espèces capturées.



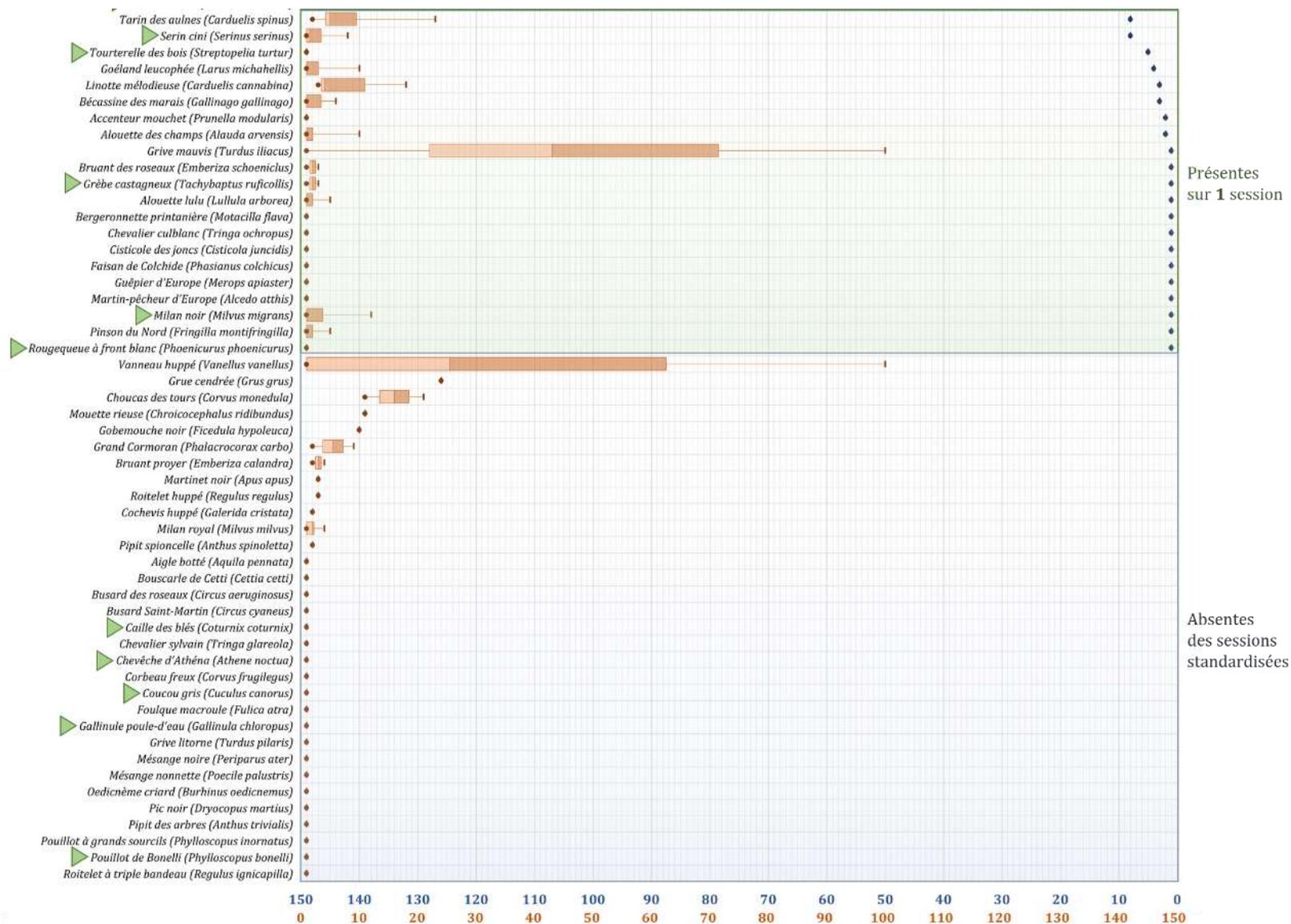


Figure 30 - Distribution des effectifs des espèces de l'avifaune sur l'élevage, par protocole d'observation.

Pour chaque espèce, les effectifs minimums, maximums, ainsi que les quartiles (premier, médiane et troisième) sur l'ensemble des sessions standardisées ou visites sont représentés. La probabilité de reproduction locale d'après les indices observés est indiquée à gauche du nom de chaque espèce.

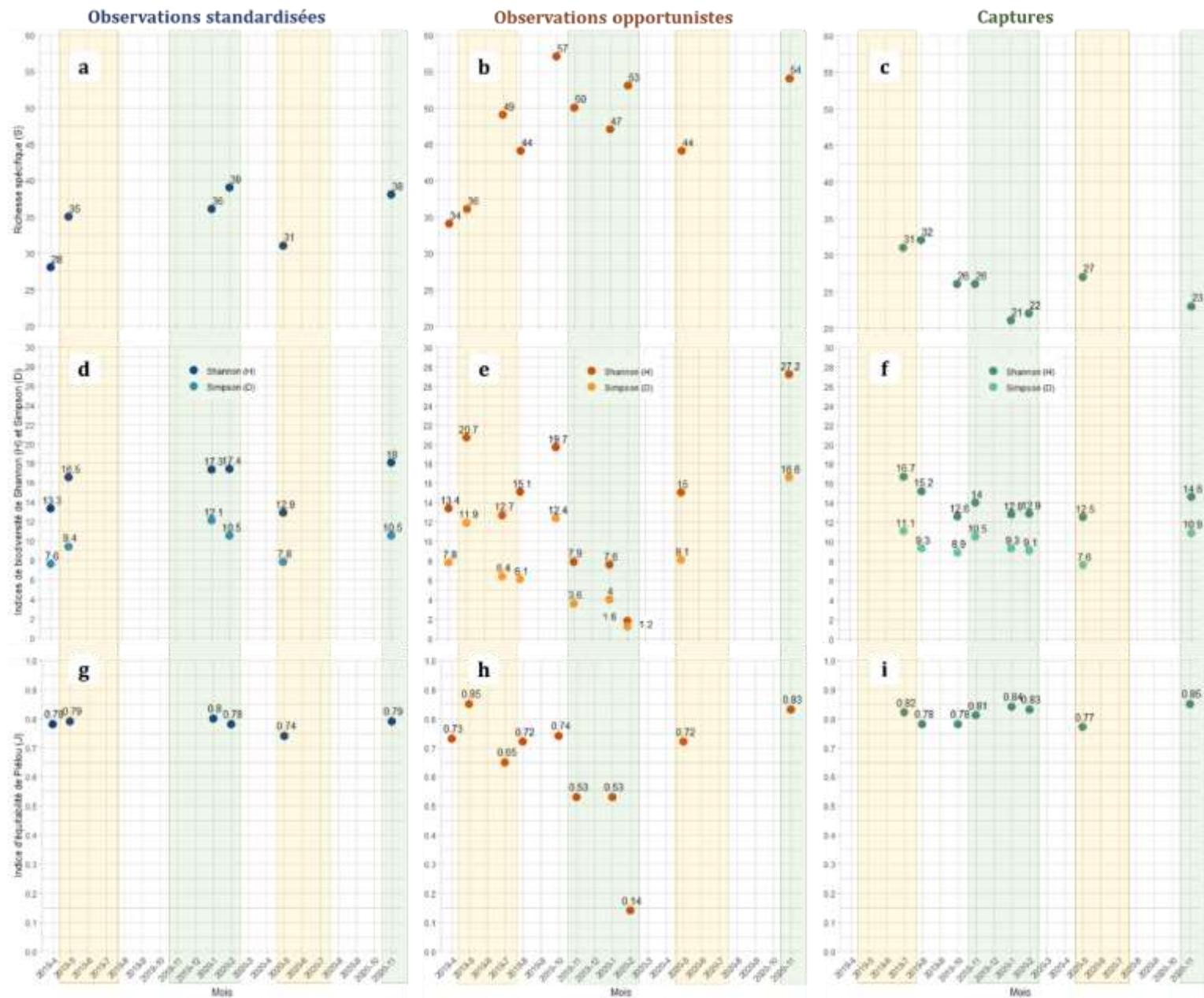


Figure 31 - Evolution temporelle de la richesse spécifique et des indices de diversité sur l'élevage selon le protocole d'inventaire.

Les saisons biologiques de reproduction (jaune) et d'hivernage (vert) sont indiquées. Les valeurs calculées sont les richesses spécifiques (a, b, c), les indices de diversité de Shannon et Simpson (d, e, f), et les indices d'équité de Pielou (g, h, i).

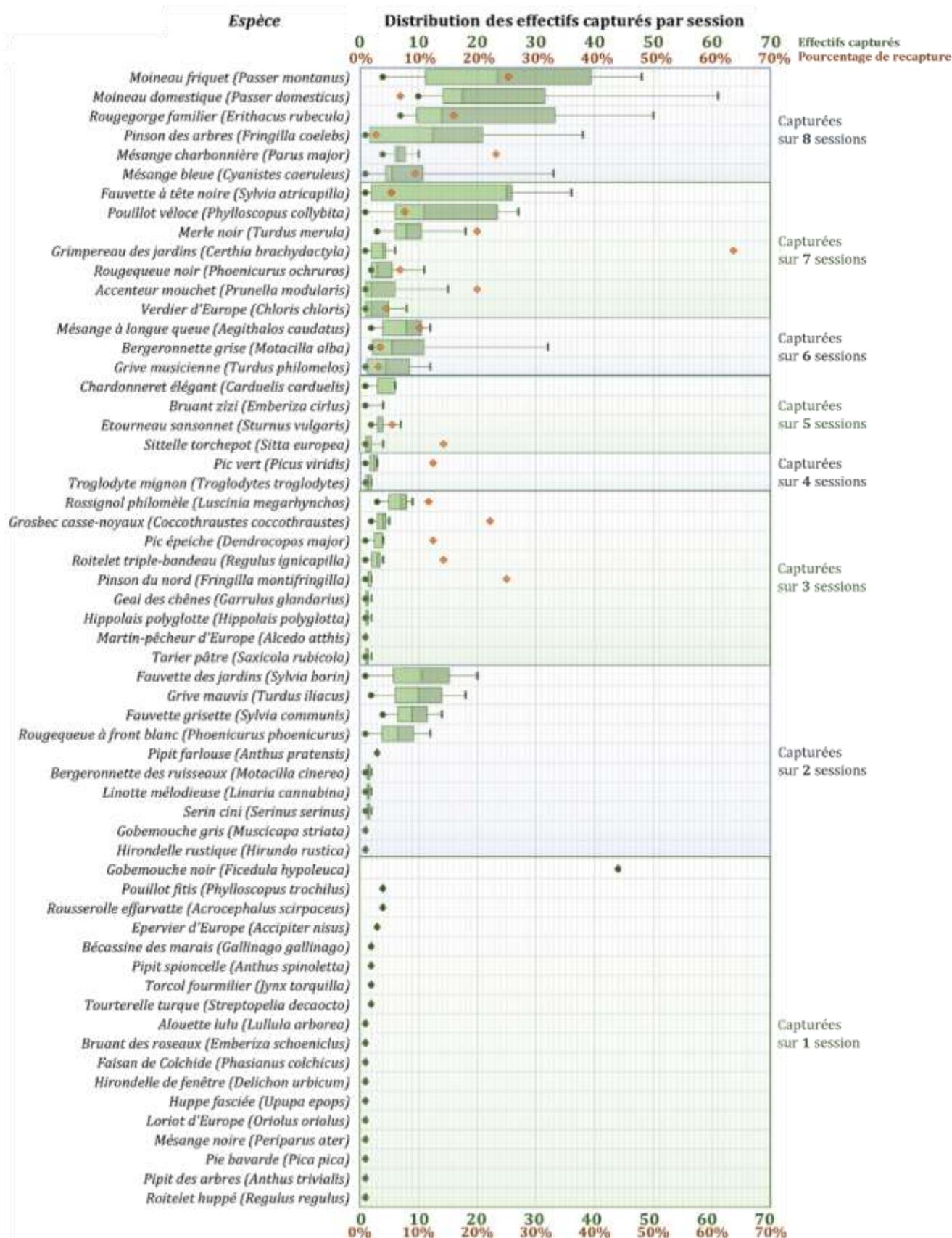


Figure 32 - Distribution des effectifs par session des espèces de l'avifaune capturées sur l'élevage. Pour chaque espèce, les effectifs minimums, maximums, ainsi que les quartiles (premier, médiane et troisième) sur l'ensemble des sessions de captures sont représentés. Le pourcentage d'individus recapturés d'une session à une autre au moins une fois est indiqué par les points oranges.

d. Discussions

Les deux modes de recensement par observation de l'avifaune semblent complémentaires pour évaluer la fréquentation de l'élevage : les protocoles standardisés pour un dénombrement plus précis de toutes les espèces présentes à un instant donné, et les observations opportunistes pour une détection plus exhaustive d'espèces visiteuses ponctuelles mais remarquables par leur taille ou leur nombre. Cette variabilité de sensibilité et représentativité des résultats des méthodes d'inventaires est connue de la communauté scientifique (Johnson, 2008). En ne prenant en compte que les protocoles standardisés de transects et points d'écoute nocturnes qui sont utilisés classiquement pour établir ces indices de diversité, il est possible de comparer les valeurs de l'élevage avec d'autres sites. L'indice de Simpson est alors le plus approprié car moins sensible aux espèces rares dont la présence va être la plus susceptible de varier selon le type de milieu considéré (Jost, 2006), mais certains auteurs ne donnent que l'indice de Shannon sur leurs études. Ainsi, en comparaison de diverses régions agricoles françaises en saison de reproduction, les valeurs de diversités spécifiques sur l'élevage de canards se situent dans le groupe des paysages agricoles de plus grande diversité ornithologique (Jeliazkov et al., 2016). En comparaison de milieux périphériques à la ville de Rennes en 1995-1996 (Clergeau et al., 1998), la richesse spécifique sur l'élevage est plus importante quelle que soit la saison (28 à 38 espèces contre 14 à 26), mais les indices de diversité sont légèrement inférieurs à ceux des zones périphériques résidentielles ou agricoles au printemps ($D=7,6-9,4$ contre $D=10,4-11,3$), et légèrement supérieurs en hiver ($D=10,5-12,1$ contre $D=8,5-9,5$). Avec l'érosion générale de la diversité ornithologique (Fontaine et al., 2020) survenue depuis l'époque de cette étude bretonne (Clergeau et al., 1998), il est toutefois probable que ces valeurs de biodiversité soient devenues inférieures. L'élevage de canards étudié ici par un protocole d'observations standardisées durant presque deux années consécutives semble donc héberger une diversité d'espèces de l'avifaune sauvage assez remarquable en comparaison de sites agricoles et périurbains. La variation saisonnière de la richesse spécifique et des indices de diversité est particulièrement visible à partir des observations standardisées. Ces valeurs sont ainsi plus élevées durant les saisons d'hivernage que de reproduction, ce qui peut suggérer deux hypothèses non exclusives l'une de l'autre. La première serait la confirmation que le site étudié est favorable à diverses espèces durant l'hiver qui immigrent à l'automne depuis les régions nordiques de l'Europe grâce aux conditions climatiques et géographiques évoquées précédemment (*Écologie des populations d'oiseaux sauvages du Sud-Ouest de la France - p 79*). La deuxième serait liée à un biais d'observation facilitée en saison hivernale, du fait de l'absence de feuillage ainsi que de la moindre discrétion des oiseaux qui sont moins vulnérables et plus mobiles pour trouver des ressources alimentaires qu'en période de reproduction. En particulier, les hérons, vanneaux, grues, goélands et mouettes cités plus haut ont été essentiellement observés en saison hivernale, ce qui pourrait représenter un risque d'introduction infectieuse accru étant donné leur écologie aquatique, leur taille moyenne à grande et leur réceptivité connue pour les agents affectant les canards (VIA, coronavirus, avulavirus notamment).

Les résultats d'inventaires par captures ont montré une moindre richesse spécifique mais une diversité similaire en comparaison des observations standardisées. Ceci reflète sans doute le biais spécifique lié à la méthode de capture aux filets, qui cible plutôt les espèces de petite taille, à proximité du sol et plutôt autour des haies et bâtiments où elles ont leur activité (FAO, 2007; Whitman et al., 1997). Cette méthode a ainsi permis de détecter quelques espèces discrètes qui n'avaient pas été détectées par les protocoles d'observation (Fauvette des jardins, Hippolais polyglotte - *Hippolais polyglotta*, Pouillot fitis, Rousserolle effarvate, Gobemouche gris - *Muscicapa striata* et Torcol fourmilier - *Jynx torquilla*), alors que les espèces plus grandes ou volant à des altitudes plus élevées (par exemple hérons, rapaces, goélands) n'ont pas pu être capturées. Un biais induisant une réduction de la probabilité de captures a aussi été observé (moindres effectifs en comparaison des observations, moindre proportion de recaptures) pour les espèces de milieux ouverts ou les plus adaptées aux activités humaines (bergeronnettes grises, moineaux, étourneaux sansonnets) qui se montrent agiles à éviter les filets et apprennent rapidement leur emplacement. L'orientation de l'effort de capture en direction de ces espèces nécessite donc des adaptations particulières de méthodes pour tenter de les surprendre, ce qui ne fonctionne généralement que quelques heures : ouverture des filets tôt à l'aube ou tard au crépuscule, en des dispositions complexes et proches de zones de concentration, attractions auditives par des enregistrements de cris et chants, entre autres. D'autres espèces au contraire se montrent très faciles à capturer par les filets japonais, comme les rougegorges, les accenteurs mouchets (*Prunella modularis*) ou les merles noirs (*Turdus merula*) dont les proportions de recaptures sur une même session de trois jours étaient les plus élevées parmi les espèces dont les effectifs étaient supérieurs à 25 individus (au-delà de 25% des individus).

En complément des évaluations de richesse et diversité spécifiques par les captures, il a été tenté d'estimer les tailles de populations pour les espèces les plus communes. Ce travail a fait l'objet du stage de Master 1 *Gestion Intégrée des Maladies Animales Tropicales* de Gauthier Vercher durant le premier bimestre de 2021. Pour ce faire, les historiques individuels de marquage-recapture pour les espèces ou groupes d'espèces les plus abondamment capturés ont été utilisés pour calculer l'estimateur de Chapman à deux sources (Chapman, 1951). Ces estimations devant se baser sur des populations fermées, il fallait initialement sélectionner des sessions de captures proches dans le temps (un à deux mois, pour faire l'hypothèse d'une absence d'émigration ou immigration d'individus) et dont la distribution des espèces était similaire. L'évaluation de cette similarité a été faite par calcul de l'indice de dissimilarité de Bray-Curtis (Bray and Curtis, 1957). Cependant, les résultats des estimations de tailles de populations, présentés ici à titre informatif (Figure 33), ont paru très irréalistes en surestimant grandement celles-ci. Il est fort probable que ce soit dû aux hypothèses de population fermées, nécessaires à l'estimateur utilisé et qui étaient trop éloignées de la réalité sur le site étudié et entre sessions (répartitions d'abondances similaires à 68% au plus entre sessions espacées d'un mois). Le temps limité pour réaliser ces analyses

n'a pas permis de pousser celles-ci plus loin pour trouver des solutions d'adaptation. Il est aussi probable que les effectifs capturés par espèce et par session aient été trop faibles pour obtenir des recaptures en nombre suffisant d'une session à la suivante. Le protocole de captures n'était donc pas adapté à cette estimation, car initialement prévu pour recenser et prélever des matières biologiques sur l'avifaune présente, ciblant en particulier les moineaux et bergeronnettes (*Étude épidémiologique longitudinale de différents agents infectieux aviaires dans les compartiments sauvage et domestique autour d'un élevage avicole plein air - p 157*).

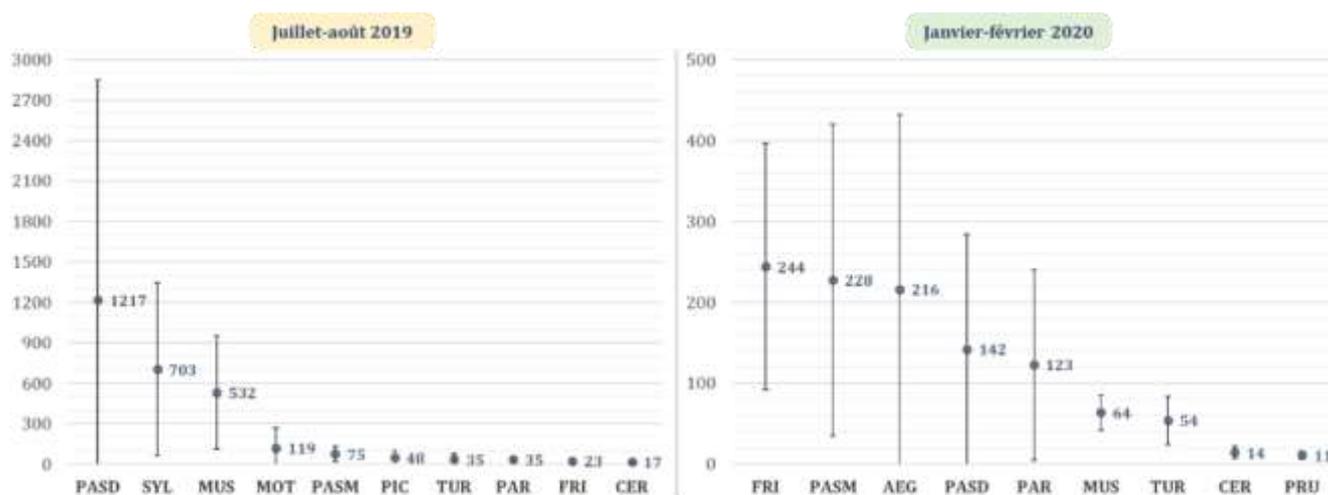


Figure 33 - Estimation des tailles de populations pour chaque paire de sessions de captures considérée.

Les barres verticales indiquent les intervalles de confiance à 95%. PASD : *Passer domesticus* ; SYL : parvordre Sylviida (fauvettes, rousserolles, hippolais) ; MUS : Muscicapidés (rougegorges, rougequeues, gobemouches, rossignols, tariers) ; MOT : *Motacilla spp.* (bergeronnettes) ; PASM : *Passer montanus* ; PIC : Pucidés (pics, torcols) ; TUR : *Turdus spp.* (merles, grives) ; PAR : Paridés (mésanges) ; FRI : Fringillidés (pinsons, grosbecs, chardonnerets, verdiers, linottes) ; CER : Certhioidés (grimpereaux, troglodytes, sittelles) ; AEG : Aegithaloidés (orites, pouillots) ; PRU : *Prunella modularis*.

Malgré les biais cités plus haut, la méthode de captures au filet apporte donc des résultats différents et complémentaires des méthodes d'inventaire par observation. En effet, elle cible plus particulièrement les espèces actives à proximité du sol qui représentent une part importante de la population commensale des élevages qui nous intéressent dans le cadre d'études épidémiologiques. Certaines espèces cryptiques ont ainsi pu être détectées sur le site grâce à cette méthode (Whitman et al., 1997). En outre, elle permet de caractériser plus finement la population présente grâce à l'identification des âges ou des états physiologiques, et elle peut permettre l'usage de méthodes de marquage-recapture pour estimer les tailles de populations en orientant le protocole dans ce but. Il faut en revanche citer le caractère fastidieux et très technique de cette méthode, nécessitant l'investissement de temps prolongé d'une à deux personnes minimum compétentes pour la technique de capture et manipulation ainsi que pour l'identification ornithologique et physiologique. Le recensement par captures ne se justifie donc quasiment qu'en études de moyen à long terme produisant des données répétées et en quantités exploitables statistiquement, c'est-à-dire qu'un investissement de temps important doit y être consacré pour que la méthode soit exploitable de façon fiable (FAO, 2007; Whitman et al., 1997). L'accès physique

à des oiseaux sauvages sains qui pourront servir à la collecte d'échantillons biologiques en justifie également le choix pour les études épidémiologiques (FAO, 2007), mais toujours en complément des observations ornithologiques qui serviront à mieux cibler et adapter les captures aux espèces présentes.

L'analyse et la comparaison des résultats issus des différentes méthodes de recensement ornithologique permet de souligner quelques points généraux. Tout d'abord, l'élevage de canards étudié ici semble très propice à l'avifaune commensale. Le site comporte en effet une richesse spécifique et des indices de diversité relativement élevés en toutes saisons en comparaison de paysages similaires agricoles ou périurbains (Clergeau et al., 1998; Jeliaskov et al., 2016). Ce phénomène peut être sans doute expliqué par différentes caractéristiques du site étudié. Comme évoqué précédemment, la localisation géographique du Sud-Ouest de la France est favorable à des passages d'espèces migratrices sur leur couloir de migration, et le piémont pyrénéen de climat doux et humide offre des conditions favorables d'hivernage et de reproduction. Le paysage environnant est aussi favorable à une diversité d'espèces d'habitats variés, grâce à une agriculture de petites surfaces en polyculture et élevages alternant avec du boisement (Chiatante et al., 2021). La composition du site lui-même semble aussi très propice à diverses espèces, de par les bâtiments nombreux et notamment les plus anciens conservés (cavités et abris hébergeant des nids de moineaux ou hirondelles notamment), de par l'activité d'élevage et de cultures végétales (alimentation pour insectivores et granivores), et de par la présence de végétation variée et dense notamment en ornement autour des habitations ou sur l'élevage dans le cadre de la conduite en agroforesterie (abris et repos, alimentation par les fruits et insectes, nidification) (Bestman et al., 2018; Mupepele et al., 2021). Il serait alors intéressant de comparer ces résultats à d'autres types d'élevages de la même région afin d'identifier des caractéristiques propres à chacun qui favoriseraient ou non l'avifaune dans ce contexte.

Deuxièmement, le profil des espèces identifiées sur l'élevage met en évidence la présence de nombreuses espèces menacées à moyen ou long terme. En particulier, ce site héberge des populations reproductrices de Moineau friquet et Moineau domestique, espèces particulièrement en déclin en France et en Europe qu'il convient donc de préserver. Les populations de Moineau friquet et domestique ont perdu respectivement 29,7 millions et 246,7 millions d'individus entre 1980 et 2017 en Europe (Burns et al., 2021), soit un déclin de populations respectives de 60,2% et 4,6% entre 2001 et 2019 en France (Fontaine et al., 2020). Le Moineau friquet a ainsi un statut « en danger » sur la Liste Rouge nationale de l'UICN (UICN France et al., 2016). Les populations nicheuses d'Hirondelle rustique et surtout d'Hirondelle de fenêtre sur le site doivent aussi être préservées, celles-ci étant classées « quasi menacées » sur la Liste Rouge nationale de l'UICN (UICN France et al., 2016) et montrant un déclin en France sur 2001-2019 de 25,3% et 23,3% respectivement (Fontaine et al., 2020). Parmi les espèces les plus fréquemment observées sur le site, le Roug gorge familier est aussi en déclin en France (9,2% sur 2001-2019), ainsi que le Pic vert (10,4%), le Pouillot véloce (11%) et le Troglodyte mignon (20%). En revanche, la

Bergeronnette grise très abondante montre une relative stabilité de sa population à l'échelle française. Avec l'érosion actuelle de la diversité ornithologique en France et en Europe, en particulier en milieu rural (Burns et al., 2021; Fontaine et al., 2020), il semble donc primordial de conserver ce type de site favorable à la biodiversité globale. Cette préservation globale semble d'autant plus importante dans le contexte d'une prévention intégrée des circulations infectieuses à l'interface sauvage-domestique. En effet, la chute de diversité des espèces de milieux ruraux se fait en faveur d'espèces généralistes qui occupent leur niche écologique par opportunisme, comme les étourneaux sansonnets, les hérons garde-bœufs ou certains corvidés (Fontaine et al., 2020). Or ces espèces généralistes ont souvent un mode de vie grégaire et seront plus facilement mobiles entre sites, ce qui peut donc faciliter leur contribution aux échanges et diffusions d'agents infectieux à l'interface sauvage-domestique (Caron et al., 2015). La chute de diversité spécifique pourrait ainsi contribuer à atténuer un éventuel effet de dilution pour certains agents infectieux, dans une situation où les hôtes restants y seraient aussi plus réceptifs et donc amplifieraient leur circulation, ce d'autant plus en contexte de contraintes écologiques globales (Morand and Lajaunie, 2018a, 2018b).

Les espèces recensées sur le site sont très majoritairement des Passériformes, Columbiformes, Piciformes et quelques rapaces Accipitriformes, Strigiformes ou Falconiformes. Grâce à l'usage de méthodes classiques d'observations standardisées dont les résultats sont aisément comparables à d'autres études, il est possible de situer la population par rapport à d'autres contextes géographiques. Notamment, des études réalisées en élevages avicoles dans d'autres régions européennes et françaises diffèrent dans la répartition des espèces d'avifaune (Gotteland et al., 2009; Lubac et al., 2012; Veen et al., 2007). Si les Passériformes y sont toujours majoritaires avec notamment la présence fréquente et abondante des Moineaux domestiques, en revanche les Corvidés, Sturnidés et Columbides y sont aussi parmi les espèces majoritaires mais pas les bergeronnettes grises. L'élevage du Gers étudié comme modèle ici semble donc différer en particulier par son profil d'espèces plus riche, et par la présence abondante des bergeronnettes grises. Comme dans les autres élevages européens où l'avifaune a été recensée, quelques espèces d'autres ordres et notamment aquatiques ont également pu être observées, plus ponctuellement mais parfois en groupes importants : hérons garde-bœufs, vanneaux huppés, grues cendrées, grands cormorans, hérons cendrés, bécassines des marais, goélands et mouettes. Il faut aussi noter la présence occasionnelle d'espèces aquatiques (canards colverts en particulier, mais aussi foulques macroules, grèbes castagneux ou gallinules poules d'eau) dans la petite réserve d'eau en amont Nord de l'élevage (Figure 28c). À l'exception des hérons et bécassines qui étaient parfois observés sur les parcours des canards (occupés ou non), les espèces aquatiques étaient uniquement observées en vol de passage au-dessus ou à côté de l'élevage. Mais ces espèces représentent un risque potentiellement accru pour les transmissions infectieuses, par leur taille (charges infectieuses excrétées), leur comportement grégaire, et souvent leur capacité de déplacement sur de grandes distances permettant d'établir des

connexions avec d'autres élevages ou avec des zones humides réservoirs naturels pour les agents infectieux adaptés aux canards d'élevage. Leur présence ne doit donc pas être négligée dans le cadre d'une étude épidémiologique de l'interface sauvage-domestique locale.

La vaste diversité des groupes taxonomiques présents sur l'élevage implique aussi une diversité de traits d'histoire de vie et donc d'usages du milieu. Par cette diversité que l'on constate dépendante du contexte local, l'implication de chaque espèce dans les échanges infectieux au sein de la communauté aviaire et en particulier à l'interface sauvage-domestique peut varier. Le recensement de l'avifaune présente localement est donc une première étape essentielle à la connaissance des éventuels protagonistes de l'épidémiologie locale, bien qu'il soit souvent omis dans les études épidémiologiques (Caron et al., 2015). Ainsi, les espèces commensales les plus fréquemment et abondamment observées doivent être ciblées en priorité pour leur possible rôle épidémiologique vis-à-vis d'agents pathogènes aviaires. En effet, l'abondance et la fréquence sont des premiers facteurs de risque pour la participation à une éventuelle circulation infectieuse locale puisqu'elles accroissent l'exposition de et par l'espèce (Caron et al., 2015). Les différentes méthodes de recensement appliquées au modèle de l'élevage d'étude ont alors permis de mettre en évidence les espèces les plus abondantes et donc les plus à risque d'être impliquées dans les échanges infectieux à l'interface. Ainsi l'analyse de la distribution des observations permet notamment de sélectionner pour cette présomption de risque les deux espèces de moineaux, les bergeronnettes grises, les rougegorges familiers (*Erithacus rubecula*), les pinsons des arbres (*Fringilla coelebs*), les tourterelles turques (*Streptopelia decaocto*), les étourneaux sansonnets (*Sturnus vulgaris*), et éventuellement les hirondelles de fenêtre (*Delichon urbicum*) et rustiques (*Hirundo rustica*) présentes uniquement en saison de reproduction. Le rôle des hérons garde-bœufs dans ce contexte local reste à préciser également car leur observation est relativement ponctuelle et centrée sur la saison hivernale, mais parfois en très grands groupes de plusieurs centaines, et l'espèce a une affinité reconnue pour les environnements agricoles et les zones humides. En tenant compte du biais de capture, l'analyse de la distribution des effectifs capturés conforte la liste des espèces commensales d'intérêt identifiées par les protocoles d'observation. On peut cependant y ajouter les fauvettes à tête noire (*Sylvia atricapilla*), les pouillots véloces (*Phylloscopus collybita*) et les merles noirs.

II. Analyse des contacts et interactions entre la communauté d'hôtes aviaires autour de canards élevés en plein air

a. Introduction

L'abondance d'une espèce au niveau de l'interface permet d'établir son caractère commensal et son intérêt épidémiologique a priori, qui permettront donc une première priorisation de l'investigation épidémiologique dans sa direction (Veen et al., 2007). Mais l'abondance d'une espèce sur ou à proximité de l'élevage à quelques instants donnés (lors des observations) n'indique pas directement la proximité ou l'intensité des contacts de celle-ci avec l'élevage. En particulier, il n'est pas indiqué que l'espèce en question est présente sur les parcours des canards domestiques, ou qu'elle participe à des contacts potentiellement infectieux par voies directes ou indirectes avec les canards. Comme les espèces abondantes identifiées par la première phase d'inventaire sont encore nombreuses et de traits d'histoire de vie variés (granivores ou insectivores, terrestres ou arboricoles, sédentaires ou migrateurs...), il est nécessaire de mieux cibler l'étude épidémiologique suivante sur les espèces les plus proches des canards. En effet, la variété de leurs modes de vie implique aussi des techniques de captures et prélèvements différentes si on veut étudier leurs agents infectieux. Les contacts entre avifaune et canards de l'élevage devront donc être caractérisés par une seconde phase d'étude écologique plus détaillée (Caron et al., 2015, 2014; Scott et al., 2018). Afin de mieux préciser quelles espèces de l'avifaune commensale peuvent participer à ces contacts, l'objectif ici était donc d'établir leur répartition à proximité directe des canards ou de leur environnement et de caractériser de possibles interactions. La précision fine de cette répartition spatiale et temporelle en lien avec celle des canards, ainsi que le détail des comportements individuels devraient alors permettre d'identifier plus finement les espèces commensales d'intérêt épidémiologique dans ce contexte. L'analyse de leurs interactions dans le réseau d'hôtes servira ensuite à évaluer et quantifier les occasions de contacts, et donc les potentielles voies de passage direct ou indirect pour des agents infectieux, en particulier entre les compartiments sauvage et domestique de l'interface. Le suivi longitudinal sur une année complète et sous différentes conditions environnementales permettra aussi de caractériser les conditions les plus favorables à la visite des espèces commensales d'intérêt auprès des canards.

b. Matériel et méthodes du travail de terrain

Le recensement de l'avifaune commensale et de ses comportements autour des canards de l'élevage d'étude s'est basé sur des observations réalisées entre l'été 2020 et l'été 2021. Le protocole impliquait des visites de deux jours une fois par mois, qui ont été faites dans le cadre d'une thèse d'exercice vétérinaire (Toulouse 2023) par Pierre Fiévet que j'ai co-encadrée (mise au point du protocole et méthodes d'analyses). La mise en place du protocole s'est faite progressivement pour arriver à affiner et adapter celui-ci aux contraintes et au contexte de l'élevage. Pierre était déjà initié à l'identification

visuelle ornithologique, et a suivi en préparation des séances de perfectionnement sur l'élevage avec l'aide de Benjamin Vollot pour s'adapter au mieux aux espèces locales. L'adaptation du protocole a aussi impliqué l'optimisation de la méthode d'enregistrement des informations en direct pour fluidifier les observations, par des fiches de relevés spécifiques ainsi que des enregistrements vocaux, ensuite retranscrits en tableur numérique.

À chaque visite de deux jours, trois parcours extérieurs étaient préalablement sélectionnés (aléatoirement si plusieurs) parmi trois catégories d'occupation par les lots de canards : un parcours vide depuis au moins deux semaines, un parcours occupé depuis au moins deux semaines, et un parcours ayant subi un changement récent d'occupation dans les deux dernières semaines, ceci afin de distinguer l'effet de la présence des canards de celui de leur dégradation environnementale, sur la fréquentation des oiseaux sauvages. Sur les deux jours de présence, les trois parcours ainsi sélectionnés ont été visités en alternance à raison de quatre sessions d'observation par jour : une démarrant 30 min après le lever du jour, une en milieu de matinée solaire, une en milieu d'après-midi solaire, puis à la dernière heure avant le coucher de soleil. L'observateur se positionnait sur des points définis pour chaque parcours et horaire, lui permettant de visualiser un angle maximal comprenant le bâtiment d'élevage sans déranger les activités des oiseaux, et tout en n'étant pas gêné par la direction de la lumière du soleil. Après cinq minutes d'attente discrète, permettant aux oiseaux sauvages de reprendre une activité normale, la session d'observation commençait. Celle-ci consistait en 30 balayages continus aux jumelles de l'ensemble de la surface visible du parcours et de l'entrée du bâtiment pour enregistrer en instantané le comportement et la localisation (notamment la proximité avec les canards) de chaque oiseau sauvage présent sur une projection verticale d'environ 5 m du parcours ou du bâtiment.

c. Publications scientifiques

L'article scientifique suivant, accepté en mai 2022 par la revue *Scientific Reports*, expose le détail de la méthodologie des phases d'observations individuelles, ainsi que de la suite des analyses à partir des données générées, et discute des résultats obtenus.

Ces travaux ont également fait l'objet de communications en congrès :

- une présentation de poster à la conférence *69th WDA / 14th EWDA - Joint Virtual Conference* du 31 août au 02 septembre 2021 (Le Gall-Ladevèze, 2021a) (Annexe B).
- une présentation orale associée à un article aux *14èmes Journées de la Recherche Avicole et palmipèdes à foie Gras*, les 09 & 10 mars 2022 à Tours (Le Gall-Ladevèze, 2022) (Annexe E).

Quantification and characterisation of commensal wild birds and their interactions with domestic ducks on a free-range farm in southwest France

Chloé Le Gall-Ladevèze ¹, Claire Guinat ^{2,3}, Pierre Fievet ⁴, Benjamin Vollot ⁵, Jean Luc Guérin ¹, Julien Cappelle ^{6,7}, Guillaume Le Loc'h ^{1,*}

1. IHAP, ENVT, INRAE, Université de Toulouse, Toulouse, France
2. Department of Biosystems Science and Engineering, ETHZürich, Mattenstrasse, Basel, Switzerland
3. SIB, Lausanne, Switzerland
4. ENVT, Toulouse, France
5. Independent researcher, Aigues-Vives, France
6. ASTRE, CIRAD, INRAE, Université de Montpellier, Montpellier, France
7. CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France

* Corresponding author (email: guillaume.leloch@envt.fr)

Abstract

The role of commensal birds in the epidemiology of pathogens in poultry farms remains unclear. Our study aimed to identify potential key species for interactions with domestic ducks on one free-range duck farm in southwest France. Methods combined direct individual observations on duck outdoor foraging areas, network analysis, and general linear mixed models of abundances. Results showed a wide diversity of wild bird species visiting foraging areas, heavily dominated in frequency by White wagtails (*Motacilla alba*) and Sparrows (*Passer domesticus* and *Passer montanus*). These also were the only species seen entering duck premises or perching on drinkers in the presence of ducks. Moreover, White wagtails were the species most frequently observed on the ground and in close proximity to ducks. Network analysis suggested the role of White wagtails and Sparrows in linking ducks to other wild birds on the farm. The abundance of White wagtails was positively associated with open vegetation, with the presence of ducks and particularly in the afternoon, while the abundance of Sparrows was positively associated only with the fall-winter season. By precisely characterising interactions, the study was able to identify few wild bird species which should be prioritized in infectious investigations at the interface with poultry.

Introduction

Commensal wild birds are species that live permanently or temporarily near human activities, benefitting from food and shelter resources ¹. Such as the ubiquitous House Sparrow (*Passer domesticus*), they can be present in all types of human-made environments, ranging from town-centres to isolated farms ¹⁻⁴. Depending on the human activities considered, commensalism involves different profiles of species, according to their life history traits making them adapted to the specific resources from which they benefit and to the specific hazards that threaten them ^{3,5}. In poultry farms, and particularly free-range farms, the frequent presence of commensal wild birds alongside domestic poultry has raised concerns about possible transmission of pathogens such as avian influenza viruses (AIV) between wild and domestic bird communities ^{6,7}. While the main reservoir hosts for these viruses are waterbirds (Anseriformes and Charadriiformes) ^{8,9}, common commensal species such as Sparrows, Starlings and Pigeons have also been shown to be susceptible to AIV in experimental conditions ¹⁰⁻¹⁵. Commensal birds could thus play a role in AIV transmission at the wild-domestic bird interface. Although previous surveillance studies have shown that commensal birds were less susceptible to AIV infection in comparison with waterbirds ⁸, their mobile behaviour and frequent presence on poultry farms make them suitable candidates as bridge hosts, i.e. hosts providing a link through which AIV could be transmitted between poultry farms and with other wild bird populations ¹⁶.

Southwest France is a poultry production region with a high density and diversity of species and breeding systems. Free-range systems such as traditional foie gras duck farms are particularly abundant in the region ¹⁷. Free-range farming systems automatically increase the likelihood of contacts at the wild-domestic bird interface, especially for the slow growing foie gras ducks which live for at least 11 weeks with unlimited access to outdoor foraging areas. This exposure was recently called into question as the region, in particular its duck sector, was deeply affected by recurrent HPAI waves in the past few years ¹⁸⁻²¹. Preventive contact-restriction measures have been consequently enforced on poultry farms to reduce the risk of direct and indirect AIV transmission at the wild-domestic bird interface. These measures are mainly based on covering drinkers and feeders, and food and litter storages, generally repelling the presence of wildlife on farms, and confining flocks during high-risk periods of AIV introduction ²². However, these measures remain costly and sometimes inconsistent with traditional free-range production systems ^{23,24}. Their efficiency also has not yet been assessed as no quantitative data are available on wild bird visits and contacts with free-range poultry in southwest France ²⁴. Nevertheless, few publications have broadly described wild bird visiting patterns on poultry farms in the southwest and other regions in France ²⁵⁻²⁷. The results show variations of wild bird communities between regions and seasons, with overall few to no visits of waterbirds and maximal abundances on farms for Sparrows (*Passer domesticus*), Finches (*Fringilla spp.*), Pigeons and Doves (*Columbidae*), Starlings (*Sturnus vulgaris*) and Magpies and Jackdaws (*Corvidae*). However, knowledge gaps remain with

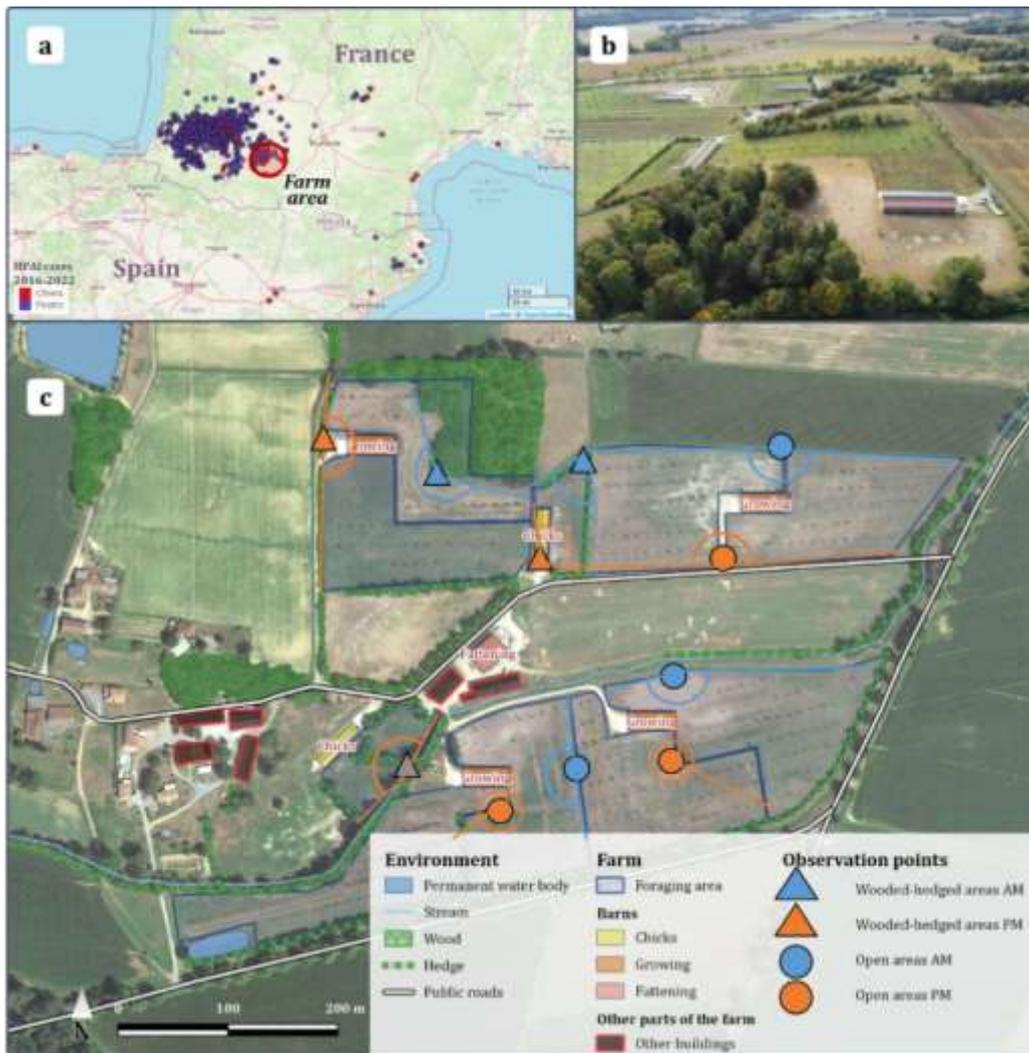
regard to an accurate quantification and characterisation of interspecies (wild-wild and wild-domestic) interactions involving commensal wild birds through their biological seasons. Moreover, it is very likely that declining rural avian biodiversity due to decades of agroecosystem changes ^{28,29} has had an impact on interactions at the wild-domestic bird interface. Indeed, declining farmland specialist species may have left more space to thrive around poultry farms for the generalist commensal species that are better adapted to more homogenised agricultural landscapes ^{29,30}.

The present study aims to identify potential key commensal wild bird species in the avian host community that are in contact with domestic ducks. We do so by studying one typical duck farm in southwest France, combining direct individual observations, general linear mixed models of abundances, and network analysis. Specifically, the study focused on (i) describing wild bird species and their interactions with domestic ducks, (ii) analysing the network of wild bird species co-occurrence with domestic ducks, and (iii) investigating the environmental factors influencing wild bird species abundance.

Methods

Study site

The study site is a typical duck farm in the department of Gers, southwest France, which was affected by HPAI during the 2016-2017 winter epizooty (Figure 1.a). The surroundings of the farm are an undulating landscape of small mixed crop and stock farms with woods on hills (Figure 1.b). Although not a wetland area, many artificial water dams of various sizes are dispersed in the surroundings for agricultural use. The farm breeds mule ducks under the 'Canard à Foie Gras du Sud-Ouest' label, which requires at least 14 weeks of unlimited outdoor access. The farm is composed of two small 0.5 ha outdoor foraging areas for ducklings (one day to one month of age), and eight large 1.5 ha foraging areas for growing ducks (one month to 14-16 weeks of age) (Figure 1.c). Like an increasing number of poultry farms in the region, an agroforestry program is implemented on the farm, so trees for wood are planted on all outdoor foraging areas, and hedges of fruit trees are planted around some of the areas (Figure 1.b and 1.c).



Field observations of wild birds

From July 2020 to June 2021, standardised observations of wild birds were implemented on the farm's outdoor foraging areas. An average of 8.7 (median of 8) observation sessions (each lasting one hour) were conducted each month four weeks apart (except in February and May due to the regulatory stamping out and cleaning for HPAI that took place on the farm) over two consecutive days. Generally, four sessions were distributed evenly over the day: half an hour after sunrise, mid-morning, mid-afternoon, and one hour before sunset. In total, 87 observation sessions were carried out during 20 days distributed over 10 months (see description in Supplementary Table S1). For each month, three of the 10

foraging areas were randomly selected to meet the following criteria: one with ducks present on it, one with no ducks for at least two weeks, and one with a recent change in use (installation or removal of ducks in the preceding two weeks). The three selected areas were then visited on an alternating basis over the two days of observation, so that each had at least one morning and one afternoon observation when possible, or at least two different times of day (see details in Supplementary Table S1). The same observation points were used for each foraging area, with only a regular adaptation to the direction of sunlight between morning and afternoon (Figure 1.c). Due to regulatory restrictions on duck movements between farms and on outdoor access during the high-risk period of HPAI introduction in the winter of 2020-2021, no area with a recent change in use was present in January 2021, and no area with presence of ducks in March, April and June 2021 (see Supplementary Table S1). Each observation session was conducted by the same person and consisted of 30 continuous left-to-right screenings of the area using binoculars to record individual observations of each wild bird present on a vertical projection of up to 10 meters of the area including fences. For each bird, the following information was recorded (see details in Supplementary Table S2): species, behaviour and direct environment (location, type of perch or ground, proximity of less than 1m from a domestic duck). If a bird could not be identified to the species level, all birds of the same genus or family were grouped together in the database. The observer also recorded the following environmental information: date, time, weather, presence and number of domestic ducks.

Description of wild bird population diversity and behaviours

For each observation session, the maximum number of individuals observed per species during a single screening (i.e. at the same time) was recorded. This number was used as an estimation of the minimum number of individuals per species and per session. All sessions of the same month were then grouped together to calculate the monthly means of minimum number of individuals per species on the farm. The Shannon and Simpson diversity indices, and Piélou evenness index^{31,32} were calculated based on the monthly means rounded to the upper integer, using the “diversity” function of the “vegan” package on R software version 4.0.5³³. The three indices were defined by the following formulae:

$$H = \exp\left(-\sum_{i=1}^S p_i \ln p_i\right) \quad (\text{Shannon});$$

$$D = 1 / \sum_{i=1}^S p_i^2 \quad (\text{Simpson});$$

$$J = \frac{\ln H}{\ln S} \quad (\text{Piélou})$$

where p_i is the proportion of individual birds in the species i , and S is the species richness (number of species), so that $\sum_{i=1}^S p_i = 1$. According to these definitions, the Shannon index represents the entropy in the population, i.e. the uncertainty in identifying the species of a random individual in the population.

The Simpson index represents the diversity, i.e. the probability for two random individuals to belong to the same species. This second diversity index is less sensitive to rare species than the first one, so it is more suitable to compare populations from different contexts ³¹. The Pielou index represents the equitability of species abundances, that is the evenness of distribution of individuals among the different species ^{31,32}.

The data subset of observations in presence of ducks on the area (for either more than two weeks or recently introduced, counting for 34 out of the 87 sessions) were used to quantify behaviours allowing contacts (direct or indirect) between wild birds and domestic ducks. Recordings of whether each wild bird was at a distance of less than one meter from a duck were used to assess direct contacts ³⁴, including droplet emissions (allowing airborne viral transmissions based on approximate droplet emission distance ³⁵ and virus infectivity in droplets ³⁶) or even physical contacts. Indirect contacts via biological matter (allowing indirect viral transmissions such as faeces, surfaces, water, or airborne particles) were assessed via recordings of bird locations on duck foraging areas, in particular around aggregation spots, such as duck premises, feeders, drinkers, and on trampled wet ground. The cumulative numbers of individuals showing each type of interaction with ducks (direct or indirect), or each type of behaviour (entering premises, on the ground or perched) were then compared between species or group of species.

Network of between-species co-occurrences

To analyse the co-occurrence patterns (as a proxy for indirect contacts) between wild bird species and domestic ducks, data of observations on the 87 sessions with or without ducks on the area were used. An undirected weighted network was built, considering bird species (wild bird species or groups of species, and domestic ducks) as nodes, and two different bird species recorded during the same observation session (i.e., co-occurrence) as an edge. Edges were then weighted by the frequency at which a given pair of bird species was recorded. Each node was characterised by its degree, representing the number of other nodes (i.e., species) connected to it. Communities of more densely connected species ³⁷ were defined by a walktrap algorithm based on a random walk through the edges ³⁸ using the “cluster_walktrap” function of “igraph” package ³⁹, with a four-step walk selected as giving the most synthetic and biologically accurate result ³⁸. The network analysis was conducted using the “igraph” package ³⁹ on R software version 4.0.5 ³³.

Influence of environmental factors on wild species abundance

Environmental factors influencing the abundance of commensal wild birds on foraging areas were investigated, focusing on the species most at risk for interactions at the wild-domestic interface. To do so, counts of the most abundant species in presence of ducks were analysed according to environmental variables. Species selected for the analysis were the most frequently observed in presence of ducks, i.e. present on more than 25% of sessions with ducks in the area: White wagtails and Sparrows. This ensured

also to exclude species with observation counts too low for analysis, i.e. too low for models to converge or to be interpretable. The following explanatory categorical variables were considered: time of day (morning or afternoon), weather (sun, clouds, or rain), season (spring-summer or fall-winter), type of surrounding vegetation of the area (woods and hedges, or open field) and presence of ducks on the area (either absent, or present in the last two weeks). All further statistical work was conducted using R software version 4.0.5³³. As univariate distribution of abundances for both species showed no significant effect of weather (p-values over 0.7 for Kruskal-Wallis rank sum tests), this variable was excluded from model selections. Association between pairs of categorical explanatory variables was examined using chi-squared tests, considered significant if their p-value was greater than 0.05. The strength of this association was estimated by Pearson's Phi using "phi" function from package "effectsize"⁴⁰, and considered too large to keep both variables if their value was greater than 0.5⁴¹. Since species' counts showed a negative binomial distribution, and to account for groups of sessions from the same two-day visits of each month, general linear mixed-effects models using a log link negative binomial error distribution were used with the month as the random variable, using the "glmer.nb" function from "lme4" package^{42,43}. Variable selection within the multivariate analysis was based on automated selection based on AIC using the function "dredge" from package "MuMIn"⁴⁴, starting from a full model with all interactions between explanatory variables. Among minimal ranked models in a range of two units above the lowest AIC, the most parsimonious one was selected as the final model. The regression coefficients for the final model were expressed as odds ratios (OR) with 95% confidence intervals (CI), and its goodness of fit was estimated by the trigamma conditional R²⁴⁵ using the "rsquared" function from package "piecewiseSEM"^{46,47}.

Results

Description of wild bird population diversity and behaviours

A total of 42 wild bird species were observed on foraging areas of the farm during the 87 observation sessions and exactly 2,000 individual observations (species-behaviour-environment); the vast majority belonged to the order *Passeriformes*. The most frequently observed species was White wagtail (*Motacilla alba*, MOTALB) in 84% of the total number of sessions, House and Tree Sparrows (*Passer domesticus* and *P. montanus*, PAS spp) in 79% of sessions, and Common Chaffinch (*Fringilla coelebs*, FRICOE) in 28% of sessions, while other species were observed on less than 25% of sessions. The minimal number of individuals (i.e. maximum observed at the same time) varied with species, and ranged up to 44 individuals for European Goldfinch (*Carduelis carduelis*, CARLIS). Resulting monthly means of minimum species group sizes ranged from 1 to 29.3, with a few increases in the number of gregarious species (Table 1).

Table 1. Monthly mean (+- standard deviation) of minimum number of individuals per species, listed in descending order of cumulative means. The darker the cell, the higher the mean. National population status of each species is taken from UICN France (2016) ⁶⁸, indicated as breeding (B), wintering (W), migrant (M). A combination of statuses is indicated if different populations are present along the year, and figured in bold if the population is consistently evaluated and significant for the species according to UICN's criteria.

Species	Code	Status	Jul.	Aug.	Sep.	Oct.	Nov.	Dec.	Jan.	Feb.	Mar.	Apr.	May	Jun.
<i>Passer domesticus</i> & <i>P. montanus</i>	PAS spp	B	4.3 +-3.5	4 +-2.1	11.9 +-14.5	12.2 +-7.5	5 +-4.8	16.6 +-13.6	7.1 +-4		5.8 +-2.7	3.4 +-1.9		3.5 +-2.3
<i>Carduelis carduelis</i>	CARLIS	B-W-M					24 +-16.6	14 +-18.4	1		29.3 +-18.2	4		1
<i>Motacilla alba</i>	MOTALB	B-W	3.7 +-2.9	3.1 +-1.7	9 +-9	5.3 +-2.4	5.4 +-2	5.2 +-3.7	2.7 +-1.2		2.3 +-1	2.6 +-1		1.9 +-0.6
<i>Aegithalos caudatus</i>	AEGCAU	B	2 +-1.4		4		6.5 +-0.7	7			2 +-0			
<i>Emberiza spp</i>	EMB spp	B-W-M	1				11 +-12.7		1.7 +-0.6		1.5 +-0.7			1 +-0
<i>Columba palumbus</i>	COLBUS	B-W-M		1	1				14			1.7 +-0.6		
<i>Cyanistes caeruleus</i>	PARCAE	B	1		3	2.5 +-0.7	1.5 +-0.7	2	2		2	1.5 +-0.7		1
<i>Fringilla coelebs</i>	FRICOE	B-W-M			1	1	2 +-1.4	4.4 +-4.5	2.8 +-2.9		2.3 +-1.5	1 +-0		1.3 +-0.5
<i>Streptopelia decaocto</i>	STRCTO	B-M	1.2 +-0.5	1	1.3 +-0.6	6	2	1			2 +-0	1 +-0		
<i>Sturnus vulgaris</i>	STUVUL	B-W-M	1.5 +-1		1	2		2.5 +-2.1			2			5 +-2.8
<i>Anthus spp</i>	ANT spp	B-W-M					2	7	2.5 +-2.1		1	1		
<i>Phylloscopus collybita</i>	PHYCOL	B-W-M			1.3 +-0.6	1	3	3.8 +-2.3	1		2	1		
<i>Phoenicurus ochruros</i>	PHOOCH	B-W-M	1.6 +-0.9	3	1.8 +-1	1	1	1			1	1.4 +-0.6		1 +-0
<i>Picidae</i>	PIC spp	B-W	1 +-0	1.5 +-0.7	1.5 +-0.7		1	1	2		1	1 +-0		1
<i>Erithacus rubecula</i>	ERIRUB	B-W-M		1	1	3 +-1.7	1.3 +-0.6	1.3 +-0.5	1		2			
<i>Turdus merula</i>	TURMER	B-W-M	2 +-1.7		1	1	1.5 +-0.7	1 +-0			1 +-0	1.3 +-0.6		1 +-0
<i>Saxicola rubicola</i>	SAXTOR	B-W-M	2		1	1						3		2.5 +-0.7
<i>Parus major</i>	PARMAJ	B-M			1.5 +-0.7	1.5 +-0.7	1	2 +-1.4	1		1 +-0	1		
<i>Garrulus glandarius</i>	GARGLA	B-W	2 +-2	2 +-1.4	1 +-0	2 +-0								
<i>Corvus corone</i>	CORONE	B-W						2	3					1
<i>Chloris chloris</i>	CARCHL	B-W-M	2									3		
<i>Elanus caeruleus</i>	ELACAE	B				1.5 +-0.7			1			2 +-0		
<i>Sylvia atricapilla</i>	SYLATR	B-W-M			1 +-0						1.5 +-0.7	1		1
<i>Sitta europea</i>	SITEUR	B		1 +-0	1.3 +-0.6	1	1							
<i>Certhia brachydactyla</i>	CERBRA	B	1	1 +-0			1							
<i>Luscinia megarhynchos</i>	LUSMEG	B-M	1	1 +-0	1									
<i>Motacilla cinerea</i>	MOTCIN	B-W	1 +-0	1								1		
<i>Upupa epops</i>	UPUEPO	B-W	1 +-0	1								1		
<i>Columba livia</i>	COLLIV	B	2											
<i>Ficedula hypoleuca</i>	FICUCA	B-M			1 +-0		1							
<i>Ardea cinerea</i>	ARDCIN	B-W-M		1										
<i>Buteo buteo</i>	BUTBUT	B-W-M												1
<i>Cuculus canorus</i>	CUCCAN	B-M		1										
<i>Pica pica</i>	PICPIC	B									1 +-0			
<i>Sylvia communis</i>	SYLCOM	B-M										1		

The monthly number of wild bird species ranged from 14 to 20 (Figure 2). The diversity indices of Simpson (D) and Shannon (H) and the evenness index of Pielou (J) (Figure 2) showed similar patterns, with highest values in April (D=15.4, H=17.4, J=0.95) and July (D=13.8, H=15.8, J=0.95), then dropping during fall and winter down to the lowest values in March (D=4.1, H=8.3, J=0.73).

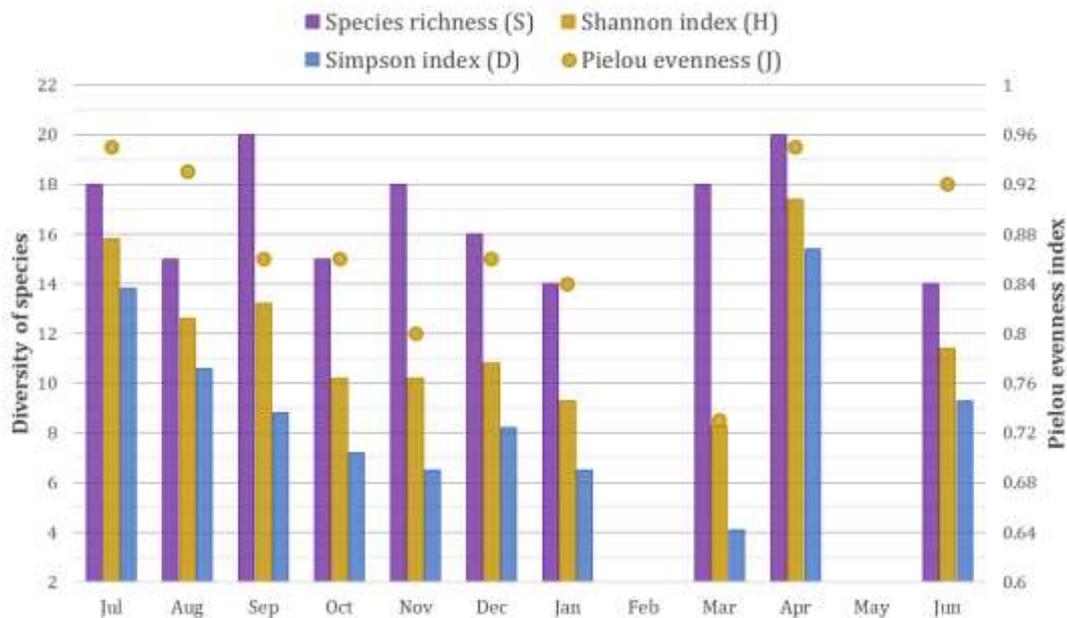


Figure 2. Monthly observed bird diversity indices on duck foraging areas.

Using data of observations in presence of ducks, the direct environment of individual birds were analysed to quantify behaviours allowing potential direct or indirect interactions between wild birds and domestic ducks. Nine of the 23 species (8 of the 22 groups of species) observed in the presence of domestic ducks were recorded at least once at less than one meter from ducks (Figure 3.a). The frequency of these direct contacts represented 131 observations in the 953 total observations with presence of ducks (13.7%), implying a cumulative count of 294 individuals out of the 2,446 cumulative individual birds. The vast majority of direct contacts implied MOTALB with 106 observations of 245 individuals, accounting for 83% of all birds showing direct contact with ducks and for 23% of all interactions with ducks shown by the species (Figure 3.a). This was followed by PAS spp, with 14 observations of 32 individuals, accounting for 11% of birds in direct contact with ducks and for 3% of interactions with ducks by the species (Figure 3.a). This was followed by *Turdus merula* TURMER and *Garrulus glandarius* GARGLA with each one 5 individuals (each one accounting for 1.7% of birds in direct contact, and respectively 19% and 36% of interactions by each species), followed by *Aegithalos caudatus* AEGCAU (3 individuals, 1.0% of birds in direct contact and 100% of interactions by the species), *Streptopelia decaocto* STRCTO (2 individuals, 0.7% of birds in direct contact and 40% of interactions by the species), and *Sturnus vulgaris* STUVUL and *Phoenicurus ochruros* PHOOCH (each one with 1 individual, 0.3% of birds in direct contact, and respectively 50% and 4% of interactions by each species) (Figure 3.a). Recordings of bird behaviour and

locations on foraging areas revealed situations of proximity between wild birds and duck aggregation areas such as feeders, drinkers or inside duck premises (Figure 3.b). These observations (41 out of 953, implying a cumulative count of 70 individuals) implied only 3 species: MOTALB (25 observations of 32 individuals), PAS spp (15 observations of 37 individuals) and STRCTO (1 observation of one individual on a drinker). Only MOTALB and PAS spp were observed flying into duck premises, by 3 and 28 individuals (on 3 and 9 occasions), respectively (Figure 3.b). Contrary to other species, MOTALB were most of the time observed on the ground of duck foraging areas, on 272 observations (52% of 523 for the species) implying a cumulative number of 623 individuals out of 1,079 (58%). Of these, 114 observations of 243 individuals (22%) were precisely on wet ground trampled by ducks (Figure 3.b).

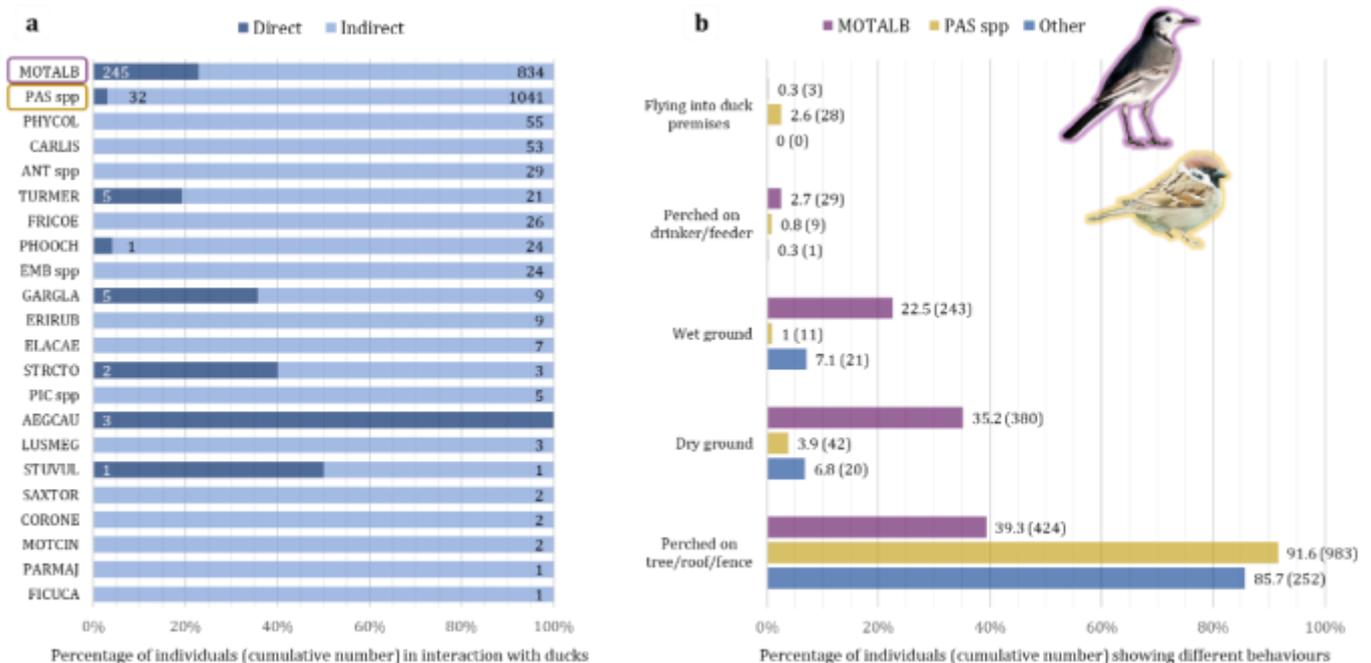


Figure 3. Distribution of cumulative numbers of individuals by species or species group involved in different types of interactions with domestic ducks over 953 observations of 2,446 cumulative individuals in total. **a.** Distribution by proximity with ducks, considering a direct interaction as a distance to ducks closer than one meter (indirect otherwise). **b.** Distribution by type of behaviour in the two most abundant species groups compared to all others.

Species names are coded as follows: AEGCAU: *Aegithalos caudatus*; ANT spp: *Anthus spp.*; CARLIS: *Carduelis carduelis*; CORONE: *Corvus corone*; ELACAE: *Elanus caeruleus*; EMB spp: *Emberiza spp.*; ERIRUB: *Erithacus rubecula*; FICUCA: *Ficedula hypoleuca*; FRICOE: *Fringilla coelebs*; GARGLA: *Garrulus glandarius*; LUSMEG: *Luscinia megarhynchos*; MOTALB: *Motacilla alba*; MOTCIN: *Motacilla cinerea*; PARMAJ: *Parus major*; PAS spp.: *Passer domesticus* & *P. montanus*; PHOOCH: *Phoenicurus ochruros*; PHYCOL: *Phylloscopus collybita*; PIC spp.: *Picidae*; SAXTOR: *Saxicola rubicola*; STRCTO: *Streptopelia decaocto*; STUVUL: *Sturnus vulgaris*; TURMER: *Turdus merula*.

Network of between-species co-occurrences

The undirected weighted network of between-species co-occurrences on the farm over one year was analysed. The network consisted of 36 nodes, one for domestic ducks and the other 35 for wild bird species (including 4 groups of species and 31 individual species) (Figure 4). Nodes were connected by 323 edges representing the aggregation of 1217 observed co-occurrences of species pairs on the 87 selected observation sessions. Frequencies of co-occurrences (i.e., weight of edges) were very heterogeneous, with MOTALB and PAS spp paired on 74% of sessions as these species were observed on 85% and 80% of sessions, respectively. In contrast, other pairs of wild species were observed on less than 25% of all observation sessions. In presence of ducks on the area (34 observation sessions), only two species were co-occurring with ducks on more than 25% of sessions: MOTALB (94% of sessions) and PAS spp (85% of sessions). The two species were paired on 82% of sessions in presence of ducks. Other high frequencies of co-occurrences involved MOTALB with PHOOCH (23% of sessions), MOTALB or PAS spp with FRICOE (both 22% of sessions), and PAS spp with PHOOCH (21% of sessions). All other species' pairs were observed on less than 19% of sessions. Degrees (i.e., number of paired species) were also heterogeneous, from MOTALB co-occurring with all other species and showing the highest degree of 35, to ARDCIN and CUCCAN that were rarely observed and both showing a degree of 2. PAS spp showed the second highest degree of 34, followed by FRICOE and PHOOCH with a lower degree of 28. As ducks were not present with all observed wild bird species, they showed a degree of 22. The walktrap algorithm identified three communities (numbered from one to three), including 12, 17, and 4 nodes, respectively (Figure 4). Three species were not grouped with others by the algorithm. The three communities were representative of habitat preference of birds. Community 1 included domestic ducks and wild bird species of either wood or open land that were the most connected to ducks and their most-frequently visiting species. Communities 2 and 3 were composed of wild bird species living preferentially in woods or in open lands, respectively.

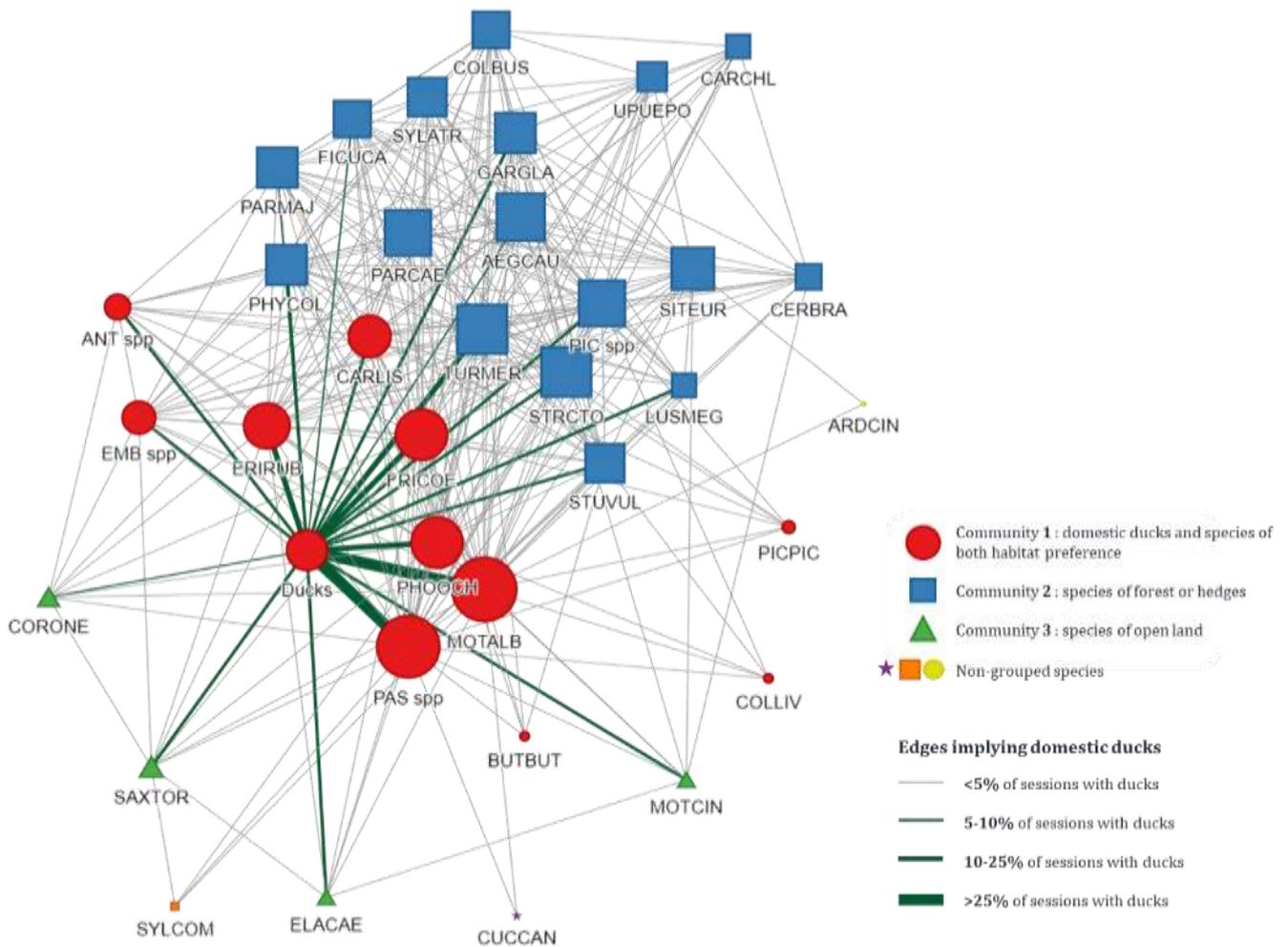


Figure 4. Undirected weighted network based on 87 observation sessions on duck foraging areas, leading to 1761 individual observations of 36 species or groups of species. Nodes are each species (or group), edges are observed interactions (co-occurrence) between two species. Nodes are coloured and shaped by community and sized by degree (number of contact-species), and arranged to show the most connexions as possible. Interactions with ducks are highlighted in green. Edge thickness is relative to their weight, i.e. their relative frequency in the total number of observation sessions.

Species names are coded as follows: Ducks: Domestic ducks; AEGCAU: *Aegithalos caudatus*; ANT spp: *Anthus spp.*; ARDCIN: *Ardea cinerea*; BUTBUT: *Buteo buteo*; CARCHL: *Chloris chloris*; CARLIS: *Carduelis carduelis*; CERBRA: *Certhia brachydactyla*; COLBUS: *Columba palumbus*; COLLIV: *Columba livia*; CORONE: *Corvus corone*; CUCCAN: *Cuculus canorus*; ELACAE: *Elanus caeruleus*; EMB spp: *Emberiza spp.*; ERIRUB: *Erithacus rubecula*; FICUCA: *Ficedula hypoleuca*; FRICOE: *Fringilla coelebs*; GARGLA: *Garrulus glandarius*; LUSMEG: *Luscinia megarhynchos*; MOTALB: *Motacilla alba*; MOTCIN: *Motacilla cinerea*; PARCAE: *Cyanistes caeruleus*; PARMAJ: *Parus major*; PAS spp.: *Passer domesticus* & *P. montanus*; PHOOCH: *Phoenicurus ochruros*; PHYCOL: *Phylloscopus collybita*; PIC spp.: *Picidae*; PICPIC: *Pica pica*; SAXTOR: *Saxicola rubicola*; SITEUR: *Sitta europea*; STRCTO: *Streptopelia decaocto*; STUVUL: *Sturnus vulgaris*; SYLATR: *Sylvia atricapilla*; SYLCOM: *Sylvia communis*; TURMER: *Turdus merula*; UPUEPO: *Upupa epops*.

Influence of environmental factors on wild species abundance

The abundances of MOTALB (present in 84% of observation sessions) and PAS spp (79%) were statistically analysed in relation with environmental factors. Presence of ducks was moderately and significantly associated with season, with more observation sessions without ducks in spring-summer season ($X^2=7.69$, $p=5.55e-03$, $\phi=0.32$). Presence of ducks was also significantly associated with surrounding vegetation, with a weaker association, due to more observation sessions without ducks in wooded-hedged areas ($X^2=4.49$, $p=3.40e-02$, $\phi=0.25$). Results of the general linear mixed-effects model (Table 2) showed that the number of MOTALB was positively and significantly associated with open areas in comparison with wooded-hedged areas (OR=1.82, 95% confidence interval (CI): 1.33-2.48, $p=1.60e-04$). The effect of time of day alone was weak and not significant, but it was stronger and significant in interaction with duck presence, with more abundance of MOTALB on the afternoon with ducks on the area in comparison with the morning or without ducks (OR=2.00, 95% CI: 1.06-3.77, $p=3.26e-02$). Abundance of MOTALB was also positively and significantly associated with the presence of ducks on the area (OR=2.01, 95% CI: 1.27-3.17, $p=2.71e-03$). The fitted model explained 52.3% of data variance according to the trigamma conditional R^2 . As for PAS spp, the general linear mixed-effects model showed that counts were only positively and significantly associated with fall-winter in comparison with spring-summer (OR=2.60, 95% CI: 1.64-4.17, $p=5.64e-05$) (Table 2). The fitted model was much less predictive with 9.8% of explained variance according to the trigamma conditional R^2 .

Table 2. Results of the negative binomial general linear mixed-effects models for White wagtails and Sparrows on duck foraging areas. For each species, counts per session are the response variable, and effects of explanatory environmental variables according to the minimal fitted model are detailed. For both species, the full model from which the AIC is given used the formula $Logit(counts)=Vegetation*Season*Time\ of\ day*Duck\ presence$ with the Month as random effect.

Species	Environmental variables	Cumulative counts	OR	Confidence interval [2.5% - 97.5%]	p-value	Conditionnal R ²	AIC of fitted model (AIC of full model)	
White wagtails (MOTALB)	Vegetation	Wooded	103	reference		1.60e-04 ***	0.523	347.4 (360.0)
		Open	191	1.82	1.33 - 2.48			
	Time of day	Morning	105	reference		8.98e-01		
		Afternoon	189	0.97	0.57 - 1.63			
	Duck presence	Absent	68	reference		2.71e-03 **		
		Present	226	2.01	1.27 - 3.17			
Duck presence :Time of day	Absent or morning	132	reference		3.26e-02 *			
	Present on the afternoon	162	2.00	1.06 - 3.77				
Sparrows (PAS spp)	Season	Spring-Summer	165	reference		5.64e-05 ***	0.098	472.0 (488.7)
		Fall-Winter	309	2.60	1.64 - 4.17			

Discussion

Detailed counts and individual observations of wild birds visiting outdoor foraging areas of a typical free-range duck farm made it possible to characterise the species diversity of the avian commensal population visiting duck facilities, as well as to quantify different types of direct and indirect interactions with duck flocks. This study of wild bird interactions with free-range poultry is to our knowledge the most detailed one after few previous studies ⁴⁸⁻⁵², with the combination of year-long series of data, species-level identification and individual behaviour quantification. The originality of this study lies in the multi-species contact network analysis applied to the context of a wildlife-livestock interface ⁵³, in addition with the focus on a free-range duck farm that represents a specific but least-studied type of poultry production.

The farm studied is not directly connected to any wetland or littoral areas, which makes it theoretically unattractive for wild aquatic birds such as Anseriformes, Charadriiformes or Ardeidae that are considered as main reservoirs for AIV ^{8,9}. Indeed, results showed that the vast majority of visiting wild birds were non-aquatic species (except for one Grey heron, *Ardea cinerea*). Most of them were passerines, which allowed to specifically focus this study on terrestrial non-aquatic avian communities of such farm environments. The observed species richness and diversity on foraging areas is slightly lower than periurban areas of France twenty years ago ⁵⁴, or comparable to most types of agricultural lands in France ²⁹. However, the actual diversity of the farm is certainly greater than what was observed in this study, as farm areas outside duck foraging areas were specifically excluded, and only visual counts were applied. Indeed, the surrounding vegetation (woods, riparian vegetation, hedges) and habitats (various crops, duck premises, barns, old houses and gardens) of the whole farm are attractive for a vast diversity of wild birds throughout the year, as suggested by a study in the Netherlands ⁴⁸ and as seen on visits for other purposes and on nest captures on the study farm (20 to 30 species, H=36.6-54.6, unpublished data). Interestingly, the profile of bird species observed on our study farm was quite different from other studies. Columbidae, Corvidae and Sturnidae were observed on less than 21% of observation sessions, and mostly in small numbers, while they composed a large part of observations in studies on other world regions and were thus identified as important species ^{7,27,49,51,52}. This difference in visiting bird species highlights the importance of studying wild-domestic bird interface in each environmental context of interest. Thus, infectious risk analyses can be focused on species that are the most abundant and in close interaction with domestic birds, such as White wagtails and Sparrows in the context of this study.

Co-occurrence and behaviour analyses together revealed the key role of White wagtails and House and Tree sparrows in the multi-species interaction network surrounding free-range domestic ducks. These three species were by far the most frequent and abundant species either when ducks were present or not, all year long, and with a resulting high number of species in indirect contact (co-occurring in the same area). It appears that White wagtails and Sparrows can play a role as a link (at least by indirect contacts on duck foraging areas) between ducks and other wild birds that may less frequently visit ducks,

thus intensifying the global connection between the wild and domestic compartments of the local interface. The three species, and to a lesser extent other species of the duck-centred community (number 1), seem to intensify local connections between communities of birds that are usually observed in distinct habitats such as woods or open lands. Moreover, White wagtails were observed in co-occurrence with the only aquatic bird (Grey heron) observed during this study on an area with no ducks on it. As White wagtails are very mobile and omnipresent on the farm, it is highly probable that on the same day (or few surrounding days if considering AIV incubation similar to Sparrows¹⁰⁻¹³) the same individuals went in direct or indirect contact with other species of wild or domestic birds of the farm. White wagtails may then help connect domestic ducks and the community of commensal birds of the farm to more distant and less frequent species that may be more susceptible to infections. Such epidemiological connection between White wagtails and European starlings, another commensal bird species of poultry farms, has already been suggested by a previous study in the same region⁵⁵. In addition to their abundance, White wagtails and Sparrows showed bold behaviours towards ducks and their facilities, frequently approaching ducks at a close distance, perching on their drinkers and feeders, flying into their premises, and foraging on trampled grounds rich in duck faeces. The one-meter distance chosen here was an estimation of potential direct airborne transmission via droplets applied to various respiratory infectious agents, including AIV³⁴. It was based on approximate droplet emission distance³⁵ and virus infectivity in droplets³⁶. Although observations of wild birds in close proximity to ducks were overall infrequent, they constituted the only evidence of possible direct infectious transmission between wild birds and ducks, as physical contacts were never observed in this study, and have rarely been observed on poultry farms in other studies^{49,52}. In addition to direct contact occasions, the presence of White wagtails and Sparrows on drinkers, feeders, inside duck premises or on wet trampled ground made indirect transmission of potential infectious agents from and to ducks highly possible. This risk has to be further evaluated for these particular species of wild birds. While Sparrows are commonly observed in most other studies of poultry farms^{7,25,27,52}, and are known for their susceptibility to AIV infection¹⁰⁻¹³, they are sedentary and probably purely commensal hosts that may only transmit infectious agents at a very local scale. White wagtails are rarely considered in epidemiological studies around poultry farms^{6,52,56,57}; however, the species is much more mobile than Sparrows, both on a daily basis⁵⁸ and seasonally, with partial migratory behaviour and winter aggregations in the region of this study⁵⁹. Besides farms, the species is detected in a large diversity of habitats, and it is particularly attracted by wetlands, foraging on open areas along river or lake banks where wild aquatic birds can be present (data from French Breeding Bird Survey⁶⁰). White wagtails are thus excellent candidates as bridge hosts¹⁶ for pathogens shared between domestic ducks and water birds, such as AIV, as suggested in a previous multi-site study⁷. This role on the study farm, which serves as a model of farms in southwest France, needs to be further evaluated through local ecological and epidemiological studies.

Analysis of environmental factors favouring abundance of Sparrows showed a higher concentration of birds during the fall and winter seasons. Either by population increase (young birds of the year from the local breeding population), or by aggregation on foraging areas rather than other environments, this element certainly increases their role in intensifying local connections between communities of birds. This intensification of connections is of particular concern for future epidemiological studies as it happens at a time of year when persistence of infectious agents in the environment is favoured by low temperatures and high humidity ⁶¹⁻⁶³, and when highly pathogenic AIV are regularly at risk of being introduced in poultry farms of the region by migratory water birds ^{19,64}. At the scale of the study farm, Sparrows seemed to have no preference in terms of weather, time of day or surrounding vegetation. This reveals their constant presence under all conditions around duck areas, probably due to their granivore feeding behaviour associated with their sedentary behaviour around farm buildings where they build colony shelters. In contrast, White wagtails were slightly more abundant in the afternoon and consistently more abundant when ducks were present or on areas that were not surrounded by hedges or woods. The species therefore seems to require more specific types of environments than Sparrows, and probably also chooses the best time of day to forage on duck areas when arthropods are more active. Indeed, most of the time they were observed on the ground hunting for arthropods that are numerous around duck manure and litter ⁶⁵. Again, further ecological studies have to be carried out in the region to find out what other sites are visited by White wagtails when they are not observed on the farm. However, duck presence and open-vegetation areas showed a weak positive association that might increase the effect of one variable or the other in the model. Moreover, duck presence showed a moderate positive association with fall-winter season, which also needs to be taken into account in conclusions. Therefore, abundance of White wagtail may be positively influenced by fall-winter season in parallel with duck presence, and abundance of Sparrows may be positively influenced by duck presence in parallel with fall-winter season.

Practices of the studied farm are very likely representative of most regions of southwest France, thus allowing to extrapolate a good part of the conclusions, provided that local bird communities are similar. In particular, the farm has been applying daily preventive measures that are recommended by sanitary authorities for several years: covering feeders and drinkers, repelling wildlife on the farm with electric fences and rodent poisoning, checking for and removing dead domestic ducks every day. However, it should be noted that from January 2021 the presence of ducks in the outdoor areas was disturbed as the farm was under regulatory restrictions due to regional control measures for the HPAI H5N8 epizooty that occurred in the winter of 2020-2021. Consequently, no recent introduction or removal of ducks happened on the farm in January, then preventive culling in February (no observation) led to the absence of ducks during the months which followed in the spring of 2021, allowing vegetation to grow on all foraging areas. These changes in surface use and activity on the farm may have impacted the presence of commensal

birds. This idea seems to be supported by the lowest diversity and evenness indices in March, as abundances were dominated by few species (mostly groups of CARLIS, and few MOTALB and PAS spp) that comply with the cleaning activities that were occurring on most parts of the farm. With growing vegetation and less activity during spring, these changes possibly reverted in favour of less farm-dependent species along with the ascending migratory visitors, making the diversity indices rise in April.

As the aim of this study was to describe commensal birds, the observation protocol had to focus on foraging areas only. If observation biases hid some elusive or hardly identifiable species, these could be considered as occasional or distant visitors rather than truly commensal. It is certain that the most important species targeted in terms of numbers and duck-centred behaviours were certainly not missed by the protocol implemented in this study, although the sanitary disturbances described above might have lowered their numbers in the spring of 2021. However, in order to be more exhaustive regarding bird species that visit the farm, a study at night time could be useful as domestic ducks have access to foraging areas during the night and nocturnal birds (owls and snipes for instance) were detected on some occasions during visits for other purposes. To detect a broader range of species and complete the assessment of targets for future studies, the observation method implemented in this study could then be complemented by other methods like nocturnal cameras ^{49,52} or identification of bird DNA accumulated in environmental samples on domestic duck areas ⁶⁶. These methods could provide large benefits and should be considered in further research.

In a context of declining farmland bird populations in France and Europe ^{28,67}, it is interesting to highlight the presence of particularly threatened species in our study site. According to evaluation of French breeding bird populations ^{67,68}, two of the species observed on foraging areas of the farm are declining steeply and are classified as endangered on the national IUCN Red List: *Emberiza schoeniclus* (-50% 2001-2019 decline), and *Passer montanus* (-60%). Five other species also are declining steeply but continue to be classified as vulnerable on this list: *Anthus pratensis* (-66%), *Chloris chloris* (-50%), *Carduelis carduelis* (-31%), *Dryobates minor* (-31%), and *Emberiza citrinella* (-54%). It therefore appears important to preserve in particular the consequent nesting population of *Passer montanus* thriving on this farm thanks to shelters in old buildings and rich sources of food brought by diverse agricultural activities and natural habitats.

The overwhelming presence of White wagtails and Sparrows observed throughout the year on the farm, and their frequent and close proximity with domestic ducks, raises questions concerning the efficacy of contact-restricting measures. Indeed, the ability of these commensal species to adapt to complex environments driven by human activities makes them virtually impossible to strictly keep away from free-range poultry farms. In addition, in traditional free-range systems such as the one studied here, sustainable measures have to preserve the freedom of domestic ducks as much as possible, but also preserve endangered farmland birds by having as little unwanted impact as possible. Some wildlife-

preventing systems with variable efficacy and costs are being tested on poultry farms and other agricultural facilities^{57,69}: nets, laser⁷⁰, balloons, kites⁷¹, propane canons, and scaring alarm calls⁷². While they may keep the most fearful and larger species away (particularly aquatic birds), the boldest ones might still eventually find a way to access the attractive places on farms where animals live, either by habituation⁷⁰ or by taking advantage of inherent flaws or defects in the system. To avoid habituation, costly strict wildlife-prevention measures should be used for short periods of time and when absolutely needed. Moreover, most contact-restriction measures are aimed at preventing poultry from being infected by wildlife, even though it has been proven to be a minor introduction risk in previous HPAI epizooties^{17,73}. Contact-restriction measures often do not consider the environmental transmission risk from poultry to wildlife, but waste water, feathers, dust and aerosols coming from thousands of infected birds on a farm can represent a massive contamination source for commensal wild birds living in the same environment⁷⁴⁻⁷⁶. After characterising what and how wild-domestic interactions occur and identifying a few species that could represent ecological bridges, it is necessary to assess whether these bridges are epidemiologically functional as well⁷⁷. In a second phase, considered commensal species have to be characterised with regard to their infectious susceptibility and excretion capacity for the pathogen of interest, such as HPAI. Effectively infected commensal wild birds could then spread the infectious agent to other farms, or to a wild maintenance host. Without complete knowledge of the bridge host potential of every commensal species for every infectious agent, and as a precautionary measure, overall biosecurity measures on poultry farms stay useful and need to consist of multiple complementary measures. They should prevent wild birds from coming into contact with poultry or their facilities, but also poultry-contaminated materials (litter, manure, waste water, dust) from being accessible to wild birds and vice versa (natural watercourse or water body, water run-off, litter and feeding materials). It is of first importance to take into account all possible dispersion pathways to limit the risk of spillover and spillback events between wild and domestic birds, in particular for highly transmissible, rapidly evolving and devastating agents such as HPAI.

References

1. Sætre, G.-P. *et al.* Single origin of human commensalism in the house sparrow. *J. Evol. Biol.* **25**, 788–796 (2012).
2. Anderson, T. *Biology of the Ubiquitous House Sparrow: From Genes to Populations*. (Oxford University Press, 2006). doi:10.1093/acprof:oso/9780195304114.001.0001.
3. Johnston, R. F. Synanthropic birds of North America. in *Avian Ecology and Conservation in an Urbanizing World* (eds. Marzluff, J. M., Bowman, R. & Donnelly, R.) 49–67 (Springer US, 2001). doi:10.1007/978-1-4615-1531-9_3.
4. Shaw, L. M., Chamberlain, D., Conway, G. & Toms, M. *Spatial distribution and habitat preferences of the House Sparrow *Passer domesticus* in urbanised landscapes*. (2011).
5. Guetté, A., Gaüzère, P., Devictor, V., Jiguet, F. & Godet, L. Measuring the synanthropy of species and communities to monitor the effects of urbanization on biodiversity. *Ecol. Indic.* **79**, 139–154 (2017).
6. Slusher, M. J. *et al.* Are passerine birds reservoirs for influenza A viruses? *J. Wildl. Dis.* **50**, 792–809 (2014).
7. Veen, J. *et al.* *Ornithological data relevant to the spread of Avian Influenza in Europe (phase 2): further identification and first field assessment of Higher Risk Species*. (2007).
8. Caron, A., Cappelle, J. & Gaidet, N. Challenging the conceptual framework of maintenance hosts for influenza A viruses in wild birds. *J. Appl. Ecol.* **54**, 681–690 (2017).
9. Olsen, B. *et al.* Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science* **312**, 384–388 (2006).
10. Brown, J. D., Stallknecht, D. E., Berghaus, R. D. & Swayne, D. E. Infectious and Lethal Doses of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus for House Sparrows (*Passer Domesticus*) and Rock Pigeons (*Columbia Livia*). *J. Vet. Diagn. Invest.* **21**, 437–445 (2009).
11. Forrest, H. L., Kim, J.-K. & Webster, R. G. Virus Shedding and Potential for Interspecies Waterborne Transmission of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Sparrows and Chickens. *J. Virol.* **84**, 3718–3720 (2010).
12. Nemeth, N. M., Thomas, N. O., Orahod, D. S., Anderson, T. D. & Oesterle, P. T. Shedding and serologic responses following primary and secondary inoculation of house sparrows (*Passer domesticus*) and European starlings (*Sturnus vulgaris*) with low-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol.* **39**, 411–418 (2010).
13. Yamamoto, Y., Nakamura, K., Yamada, M. & Mase, M. Pathogenesis in Eurasian Tree Sparrows Inoculated with H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus and Experimental Virus Transmission from Tree Sparrows to Chickens. *Avian Dis.* **57**, 205–213 (2013).
14. Ellis, J. W. *et al.* Avian influenza A virus susceptibility, infection, transmission, and antibody kinetics in European starlings. *PLoS Pathog.* **17**, e1009879 (2021).
15. Gutiérrez, R. A., Sorn, S., Nicholls, J. M. & Buchy, P. Eurasian Tree Sparrows, Risk for H5N1 Virus Spread and Human Contamination through Buddhist Ritual: An Experimental Approach. *PLOS ONE* **6**, e28609 (2011).
16. Caron, A., Cappelle, J., Cumming, G. S., de Garine-Wichatitsky, M. & Gaidet, N. Bridge hosts, a missing link for disease ecology in multi-host systems. *Vet. Res.* **46**, 1–11 (2015).
17. Guinat, C. *et al.* Duck production systems and highly pathogenic avian influenza H5N8 in France, 2016–2017. *Sci. Rep.* **9**, 1–9 (2019).

18. EFSA *et al.* Scientific report: Avian influenza overview October 2016–August 2017. *EFSA J.* **15**, 101 pp (2017).
19. EFSA *et al.* Scientific report: Avian influenza overview December 2020 – February 2021. *EFSA J.* **19**, 74 pp (2021).
20. Le Bouquin, S. *et al.* L'épisode d'influenza aviaire en France en 2015-2016 – Situation épidémiologique au 30 juin 2016. *Bull. Epidémiologique Santé Anim. Aliment. - DGAL - Anses* 1–7 (2016).
21. EFSA *et al.* Avian influenza overview December 2021 – March 2022. *EFSA J.* **20**, e07289 (2022).
22. DGAL. Arrêté du 8 février 2016 relatif aux mesures de biosécurité applicables dans les exploitations de volailles et d'autres oiseaux captifs dans le cadre de la prévention contre l'influenza aviaire. **AGRG1603907A**, (2016).
23. Koch, G. & Elbers, A. R. W. Outdoor ranging of poultry: a major risk factor for the introduction and development of High-Pathogenicity Avian Influenza. *NJAS - Wagening. J. Life Sci.* **54**, 179–194 (2006).
24. Delpont, M. *et al.* Biosecurity practices on foie gras duck farms, Southwest France. *Prev. Vet. Med.* **158**, 78–88 (2018).
25. Bicout, J. D., Artois, M., Musseau, R., Caparros, O. & Lubac, S. Which wild birds are potentially at risk for contacts between wild avifauna and with poultry? in *9èmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, France* 5pp (World's Poultry Science Association (WPSA), 2011).
26. Gotteland, C., Lubac, S. & Bicout, D. Où trouve-t-on les oiseaux sauvages aux alentours des élevages ? Risque de contact oiseaux sauvages et volailles. *Epidemiol. Sante Anim.* **55**, 103–115 (2009).
27. Lubac, S., Musseau, R., Caparros, O., Artois, M. & Bicout, D. J. Interactions entre l'avifaune sauvage et les élevages de volailles : quel risque épidémiologique vis à vis de l'Influenza aviaire ? *Innov. Agron.* **25**, 299–312 (2012).
28. Burns, F. *et al.* Abundance decline in the avifauna of the European Union reveals cross-continental similarities in biodiversity change. *Ecol. Evol.* **0**, 1–14 (2021).
29. Jeliaskov, A. *et al.* Impacts of agricultural intensification on bird communities: New insights from a multi-level and multi-facet approach of biodiversity. *Agric. Ecosyst. Environ.* **216**, 9–22 (2016).
30. Chiatante, G., Pellitteri-Rosa, D., Torretta, E., Nonnis Marzano, F. & Meriggi, A. Indicators of biodiversity in an intensively cultivated and heavily human modified landscape. *Ecol. Indic.* **130**, 108060 (2021).
31. Jost, L. Entropy and diversity. *Oikos* **113**, 363–375 (2006).
32. Pielou, E. C. The measurement of diversity in different types of biological collections. *J. Theor. Biol.* **13**, 131–144 (1966).
33. R Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. (R Foundation for Statistical Computing, 2019).
34. Bacigalupo, S. A., Dixon, L. K., Gubbins, S., Kucharski, A. J. & Drewe, J. A. Towards a unified generic framework to define and observe contacts between livestock and wildlife: a systematic review. *PeerJ* **8**, e10221 (2020).
35. Xie, X., Li, Y., Chwang, A. T. Y., Ho, P. L. & Seto, W. H. How far droplets can move in indoor environments - revisiting the Wells evaporation-falling curve. *Indoor Air* **17**, 211–225 (2007).

36. Zuo, Z. *et al.* Association of Airborne Virus Infectivity and Survivability with its Carrier Particle Size. *Aerosol Sci. Technol.* **47**, 373–382 (2013).
37. Newman, M. E. J. Modularity and community structure in networks. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **103**, 8577–8582 (2006).
38. Pons, P. & Latapy, M. Computing Communities in Large Networks Using Random Walks. in *Computer and Information Sciences - ISCIS 2005* 284–293 (Springer, 2005). doi:10.1007/11569596_31.
39. Csardi, G. & Nepusz, T. The igraph software package for complex network research. *InterJournal Complex Syst.* **1695**, 1–9 (2006).
40. Ben-Shachar, M. S., Lüdtke, D. & Makowski, D. effectsize: Estimation of Effect Size Indices and Standardized Parameters. *J. Open Source Softw.* **5**, 2815 (2020).
41. Cohen, J. *Statistical Power Analysis for the Behavioral Sciences*. (Routledge, 1988). doi:10.4324/9780203771587.
42. Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. & Walker, S. Fitting Linear Mixed-Effects Models Using lme4. *J. Stat. Softw.* **67**, 1–48 (2015).
43. Bates, D. *et al.* *lme4: Linear Mixed-Effects Models using 'Eigen' and S4*. (2022).
44. Bartoń, K. *MuMIn: Multi-Model Inference*. (2022).
45. Nakagawa, S., Johnson, P. C. D. & Schielzeth, H. The coefficient of determination R² and intra-class correlation coefficient from generalized linear mixed-effects models revisited and expanded. *J. R. Soc. Interface* **14**, 20170213 (2017).
46. Lefcheck, J., Byrnes, J. & Grace, J. *piecewiseSEM: Piecewise Structural Equation Modeling*. (2020).
47. Lefcheck, J. S. piecewiseSEM: Piecewise structural equation modelling in r for ecology, evolution, and systematics. *Methods Ecol. Evol.* **7**, 573–579 (2016).
48. Bestman, M., de Jong, W., Wagenaar, J.-P. & Weerts, T. Presence of avian influenza risk birds in and around poultry free-range areas in relation to range vegetation and openness of surrounding landscape. *Agrofor. Syst.* **92**, 1001–1008 (2018).
49. Scott, A. B. *et al.* Wildlife Presence and Interactions with Chickens on Australian Commercial Chicken Farms Assessed by Camera Traps. *Avian Dis.* **62**, 65–72 (2018).
50. Scherer, A. L., Scherer, J. de F. M., Petry, M. V. & Sander, M. Occurrence and interaction of wild birds at poultry houses in southern Brazil. *Rev. Bras. Ornitol. - Braz. J. Ornithol.* **19**, 74–79 (2011).
51. Burns, T. E. *et al.* Use of observed wild bird activity on poultry farms and a literature review to target species as high priority for avian influenza testing in 2 regions of Canada. *Can. Vet. J.* **53**, 158–166 (2012).
52. Elbers, A. R. W. & Gonzales, J. L. Quantification of visits of wild fauna to a commercial free-range layer farm in the Netherlands located in an avian influenza hot-spot area assessed by video-camera monitoring. *Transbound. Emerg. Dis.* tbed.13382 (2019) doi:10.1111/tbed.13382.
53. Craft, M. E. Infectious disease transmission and contact networks in wildlife and livestock. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **370**, 20140107 (2015).
54. Clergeau, P., Savard, J.-P. L., Mennechez, G. & Falardeau, G. Bird Abundance and Diversity along an Urban-Rural Gradient: A Comparative Study between Two Cities on Different Continents. *The Condor* **100**, 413–425 (1998).

55. Le Gall-Ladevèze, C. *et al.* Detection of a novel enterotropic *Mycoplasma gallisepticum*-like in European starling (*Sturnus vulgaris*) around poultry farms in France. *Transbound. Emerg. Dis.* **0**, 1–12 (2021).
56. Shriner, S. A. & Root, J. J. A Review of Avian Influenza A Virus Associations in Synanthropic Birds. *Viruses* **12**, 1209 (2020).
57. Shriner, S. A. *et al.* Surveillance for highly pathogenic H5 avian influenza virus in synanthropic wildlife associated with poultry farms during an acute outbreak. *Sci. Rep.* **6**, 36237 (2016).
58. Davies, N. B. Food, Flocking and Territorial Behaviour of the Pied Wagtail (*Motacilla alba yarrellii* Gould) in Winter. *J. Anim. Ecol.* **45**, 235–253 (1976).
59. Snow, D. W., Perrins, C. M. & Gillmor, R. *The birds of the western palaeartic. Vol. 2, Passerines.* vol. 2 (Oxford University Press, 1998).
60. Rigal, S. *et al.* Biotic homogenisation in bird communities leads to large-scale changes in species associations. *Oikos* **2022**, e08756 (2022).
61. Dalziel, A. E., Delean, S., Heinrich, S. & Cassey, P. Persistence of Low Pathogenic Influenza A Virus in Water: A Systematic Review and Quantitative Meta-Analysis. *PLOS ONE* **11**, e0161929 (2016).
62. Keeler, S. P., Dalton, M. S., Cressler, A. M., Berghaus, R. D. & Stallknecht, D. E. Abiotic Factors Affecting the Persistence of Avian Influenza Virus in Surface Waters of Waterfowl Habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**, 2910–2917 (2014).
63. Marois, C., Dufour-Gesbert, F. & Kempf, I. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma gallisepticum* in environmental samples. *Avian Pathol.* **31**, 163–168 (2002).
64. Blagodatski, A. *et al.* Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology. *Pathogens* **10**, 630 (2021).
65. Stoffolano, J. G., Jr & Geden, C. J. Succession of Manure Arthropods at a Poultry Farm in Massachusetts, USA, With Observations on *Carcinops pumilio* (Coleoptera: Histeridae) Sex Ratios, Ovarian Condition, And Body Size. *J. Med. Entomol.* **24**, 212–220 (1987).
66. Ushio, M. *et al.* Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Sci. Rep.* **8**, (2018).
67. Fontaine, B. *et al.* *Suivi des oiseaux communs en France 1989-2019 : 30 ans de suivis participatifs - Executive summary of the 2019 common birds monitoring report.* <https://inpn.mnhn.fr/actualites/lire/12721/bilan-des-30-ans-du-suivi-temporel-des-oiseaux-communs-stoc> (2020).
68. UICN France, MNHN, LPO BirdLife France, SEOF & ONCFS. *La Liste rouge des espèces menacées en France - Chapitre Oiseaux de France métropolitaine.* (2016).
69. Seamans, T. & Gosser, A. Bird dispersal techniques. in *Wildlife Damage Management Technical Series* 12pp (USDA, APHIS, WS National Wildlife Research Center, 2016). doi:10.32747/2016.7207730.ws.
70. Elbers, A. R. W. & Gonzales, J. L. Efficacy of an automated laser for reducing wild bird visits to the free range area of a poultry farm. *Sci. Rep.* **11**, 12779 (2021).
71. Conover, M. R. & Perito, J. J. Response of Starlings to Distress Calls and Predator Models Holding Conspecific Prey. *Z. Für Tierpsychol.* **57**, 163–172 (1981).
72. Aubin, T. Synthetic bird calls and their application to scaring methods. *Ibis* **132**, 290–299 (1990).

73. Guinat, C. *et al.* Biosecurity risk factors for highly pathogenic avian influenza (H5N8) virus infection in duck farms, France. *Transbound. Emerg. Dis.* **67**, 2961–2970 (2020).
74. Gaide, N. *et al.* Viral tropism and detection of clade 2.3.4.4b H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in feathers of ducks and geese. *Sci. Rep.* **11**, 5928 (2021).
75. Spekreijse, D., Bouma, A., Koch, G. & Stegeman, A. Quantification of dust-borne transmission of highly pathogenic avian influenza virus between chickens. *Influenza Other Respir. Viruses* **7**, 132–138 (2013).
76. Torremorell, M. *et al.* Investigation into the Airborne Dissemination of H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus During the 2015 Spring Outbreaks in the Midwestern United States. *Avian Dis.* **60**, 637–643 (2016).
77. Caron, A., Grosbois, V., Etter, E., Gaidet, N. & de Garine-Wichatitsky, M. Bridge hosts for avian influenza viruses at the wildlife/domestic interface: An eco-epidemiological framework implemented in southern Africa. *Prev. Vet. Med.* **117**, 590–600 (2014).
78. QGIS Development Team. *QGIS Geographic Information System*. (QGIS Association, 2022).

Acknowledgements

This study was performed in the framework of the “Chaire de Biosécurité Aviaire”, hosted by the National Veterinary College of Toulouse (ENVT) and funded by the Direction Générale de l’Alimentation, Ministère de l’Agriculture et de l’Alimentation, France. This work was financially supported by the FEDER/Région Occitanie Recherche et Sociétés 2018 - AI-TRACK. CG is funded by the European Union’s Horizon 2020 research and innovation programme under the Marie Skłodowska-Curie grant agreement No 842621. The authors express their deepest gratitude to the duck breeders in Gers for their consistently warm welcome.

Data Availability Statement

The datasets generated and analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Author contributions

C.L.G.L., B.V., J.C., J.L.G. and G.L.L. designed the study and supervised field work. P.F. helped in designing the study, performed field work and produced the database. C.L.G.L. performed all analyses and drafted the manuscript. C.G. helped with design and implementation of network analysis, and brought significant modifications to the manuscript. J.C. helped with design and implementation of statistical analysis. J.C. and G.L.L. supervised analyses and discussion of results, and brought significant modifications to the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional Information

Competing Interests Statement: The authors declare no competing interests.

Supplementary information: Supplementary Table S1, Table S2

Supplementary information

Table S1 - Distribution of the 87 observation sessions by month, time of day and presence of duck flock in the area. From January 2021, the presence of ducks in the outdoor areas was disturbed as the farm was under regulatory restrictions due to regional control measures for the highly pathogenic avian influenza H5N8 epizooty. ^a First months of observation consisted of more sessions to optimise the logistic of recording data and distribution of observation times. ^b Due to logistical needs in October and November 2020, the two sessions in absence of ducks were on early and late morning with no session in the afternoon for this type of area. ^c Total number of sessions in presence or recent change of duck flocks, that were grouped as a unique level of explanatory variable in the analysis of wild bird abundances.

Month	Time	Duck flock in the area			Number of sessions by month and time
		Presence	Recent change	Absence	
July 2020	AM	3	1	3	7 ^a
	PM	4	3	1	8 ^a
August 2020	AM	1	2	3	6 ^a
	PM	3	1	2	6 ^a
September 2020	AM	1	1	2	4
	PM	1	2	1	4
October 2020	AM	1	1	2 ^b	4
	PM	2	1	-	3
November 2020	AM	1	1	2 ^b	4
	PM	1	1	-	2
December 2020	AM	1	2	1	4
	PM	1	2	1	4
January 2021	AM	2	-	2	4
	PM	2	-	1	3
March 2021	AM	-	-	4	4
	PM	-	-	4	4
April 2021	AM	-	-	4	4
	PM	-	-	4	4
June 2021	AM	-	-	4	4
	PM	-	-	4	4
Number of sessions by duck flock presence in the area		24	18	45	87
		42^c			

Table S2 – Description of recorded information during observation sessions

	Variable	Levels
General data for the observation session	Observation point	Indication of one of the 11 points, as showed on Figure 1
	Date	Date of observation session
	Time	Starting time of observation session
	Presence of ducks	Absent for more than two weeks, present for more than two weeks, absent for less than two weeks, present for less than two weeks
	Weather	Sun, clouds, rain
Individual bird data	Screening	Rank of screening over the area when the bird is detected
	Species	Identification of species or species group of the bird
	Number	Number of birds of the same species, on the same environment, and with the same behaviour that are present during the same screening
	Behaviour	Perched on tree, perched on roof, perched on fence, perched on feeder, perched on drinker, on wet ground, on dry ground, flying into premises
	Proximity to ducks	Whether or not at least one duck is present at less than one meter
	Comments and details	Possible comments to report any problem, any change of environment during the session (like human presence) or to provide details that might help further data analysis

d. Conclusion

L'observation directe de la fréquentation et des interactions de l'avifaune avec les canards et leurs parcours a mis en évidence une forte variabilité parmi les espèces sauvages des niveaux de proximité avec les canards. Il a en effet été possible de caractériser lesquelles des espèces commensales recensées précédemment étaient effectivement présentes sur les parcours extérieurs des canards, en tout cas pour les plus abondantes et intensément proches durant la journée. La diversité des niches écologiques occupées au fil des saisons par les espèces commensales de l'élevage s'est en effet traduite en des usages variés des habitats naturels du site. L'analyse des abondances, du réseau de contacts, et des comportements propices aux échanges infectieux mettent tous en évidence le rôle central des moineaux domestiques et friquets et bergeronnettes grises. Ces trois espèces sont en effet les plus abondantes et ce tout au long de l'année avec peu d'effets des conditions environnementales, si ce n'est une apparente attraction vis-à-vis de la présence des canards et des zones de végétation ouverte concernant les bergeronnettes. Leur abondance et leur présence fréquente à proximité directe des canards et de leurs zones d'agrégation (boisson, aliment, sortie du bâtiment, intérieur du bâtiment) font de ces espèces les protagonistes les plus probables d'éventuels échanges infectieux à l'interface sauvage-domestique. Elles pourraient constituer également un lien direct entre les canards et d'autres espèces de la communauté sauvage plus distantes sur l'élevage. En outre, les bergeronnettes grises ont une écologie plus mobile que les moineaux sédentaires, avec en particulier un attrait pour les élevages et zones humides (Davies, 1976) qui en feraient des hôtes relais idéaux pour les agents infectieux des canards (Caron et al., 2015). La majorité des autres espèces étaient plus distantes des canards, soit temporellement en visitant les parcours non occupés, soit spatialement en fréquentant la périphérie des parcours occupés. Ceci peut s'expliquer par la densité et la hauteur de la végétation herbacée plus importantes en dehors des zones dégradées par les canards, fournissant un couvert, des perchoirs et une alimentation en graines ou insectes nécessaires à diverses espèces comme les Muscicapidés (rougegorges, rougequeues, tariers) ou Fringillidés (pinsons, verdiers, chardonnerets, linottes) abondants sur l'élevage. Certaines espèces sont aussi essentiellement présentes autour de la végétation ligneuse que constituent les haies et arbres entourant les parcours, comme par exemple les rougegorges, rossignols, mésanges, fauvettes, pics, ou merles. Cependant, le couvert offert par les haies est aussi profitable aux canards domestiques qui s'y reposent fréquemment, ce pourquoi quelques contacts directs (moins d'un mètre de distance) avec des espèces de périphérie ont aussi pu être objectivés : merles, geai ou mésange à longue-queue. Il ressort donc de ces observations d'interactions qu'il est nécessaire de cibler plus particulièrement l'étude épidémiologique sur les moineaux et bergeronnettes grises. Mais étant donnés les contacts occasionnels auxquels peuvent participer les espèces plus distantes mais abondantes, toute opportunité d'obtenir une information supplémentaire sur celles-ci doit être saisie. Toutefois, le protocole d'observation directe impliquait des biais qui ont pu amener certaines espèces farouches à éviter la présence de l'observateur ou qui ont pu amener à manquer un passage bref et en dehors des périodes d'observation. Ainsi, les

groupes d'espèces aquatiques précédemment recensés sur et autour de l'élevage ont pu être sous-observés sur les parcours. Au regard du risque infectieux qu'ils représentent pour les canards de l'élevage, il semble nécessaire de les cibler également dans la mesure du possible lors de l'étude épidémiologique suivante. Une évaluation du statut infectieux des espèces en contact des canards paraît essentielle en complément de l'évaluation de risque que leur écologie implique *a priori*. En effet, les plus téméraires et intensément liées aux parcours des canards (moineaux, bergeronnettes) sont aussi celles qui ont présenté le plus d'habileté à éviter les captures (*Analyse des données de captures-recaptures - p 97*), et donc présenteront probablement le plus de facilité à contourner des mesures d'éloignement préventives. Si on voulait empêcher ces espèces d'entrer en contact avec les canards ou leur environnement et ce à tout moment il serait ainsi nécessaire de mettre en place des mesures très strictes telles que des filets denses et d'appliquer diverses mesures complémentaires comme les cris ou canons effaroucheurs, ou encore des lasers, entre autres (Conover and Perito, 1981; Elbers and Gonzales, 2021; Seamans and Gosser, 2016; Shriner et al., 2016). De telles mesures auraient aussi un impact négatif évident pour l'accès aux ressources de ce site qui semble d'intérêt majeur aux différentes saisons biologiques pour les espèces recensées, et en particulier pour les spécialistes de milieux agricoles en déclin (Burns et al., 2021; Fontaine et al., 2020). En outre, une application intensive et étendue de ces mesures semble contraignante et peu compatible avec le fonctionnement d'un élevage extensif en plein air tel que celui étudié ici, donc leur utilité doit être justifiée par des données infectieuses robustes sur les espèces concernées. Si la réceptivité des espèces aquatiques aux VIA et autres agents infectieux adaptés aux canards d'élevage est connue et importante (Munster et al., 2007; Olsen et al., 2006; Szymańska-Czerwińska et al., 2017; Wille and Holmes, 2020a), ce n'est généralement pas le cas pour l'avifaune terrestre commensale dont la réceptivité reste relativement méconnue et souvent moindre (Caron et al., 2017; Krawiec et al., 2015; Shriner and Root, 2020; Wille and Holmes, 2020a). Il semble donc *a priori* primordial d'éviter les contacts avec les quelques espèces aquatiques mises en évidence aux alentours et sur l'élevage, et celles-ci semblent heureusement plus farouches donc faciles à éloigner par des mesures d'effarouchement en cas de besoin (Elbers and Gonzales, 2021). En revanche, la méconnaissance de l'épidémiologie des agents infectieux dans l'avifaune commensale demande des investigations dans ce contexte, en particulier pour les bergeronnettes grises plus rarement considérées que les moineaux (Forrest et al., 2010; Nemeth et al., 2010; Shriner and Root, 2020; Veen et al., 2007).

B. Étude des agents infectieux à l'interface entre avifaune sauvage et élevages avicoles

Après avoir précisé par recensement et caractérisation des interactions les espèces commensales les plus à même d'être impliquées dans des échanges infectieux à l'interface sauvage-domestique, il convient donc d'évaluer l'efficacité des contacts pour les transmissions infectieuses. Pour ce faire, le profil infectieux de l'avifaune doit être caractérisé et comparé à celui du compartiment domestique. Les espèces à cibler pour optimiser le temps et le coût de l'étude épidémiologique sont alors celles précédemment identifiées comme participant à la majorité des interactions à l'interface : moineaux domestiques et friquets ainsi que bergeronnettes grises en priorité, suivis par les pinsons des arbres, rougegorges familiers, merles noirs et tourterelles turques, ainsi que les hérons garde-bœufs. Afin d'accroître les chances de mettre en évidence des échanges infectieux, l'approche pour cette étude a été de rechercher des marqueurs infectieux des différentes voies de transmission directes et indirectes. Une première étude a étudié la distribution d'un mycoplasme inconnu mais proche d'une espèce pathogène des volailles au sein de différentes populations à l'interface sauvage-domestique autour du Gers. Le potentiel de marqueur de transmissions et de risque pathogène de cette bactérie circulant dans l'avifaune commensale a ainsi été évalué. En deuxième phase sur l'élevage de canards étudié précédemment, des recherches infectieuses ont été faites sur les différents compartiments de l'interface sauvage-domestique. Les agents recherchés devant constituer des marqueurs de transmission, leur sélection a été basée sur les critères suivants évoqués précédemment : (i) spectre d'hôte large comprenant au moins les canards et certains Passériformes avec des prévalences identiques voire supérieures à celles des VIA, (ii) durée de persistance de plusieurs jours à semaines chez l'hôte ou dans l'environnement, et enfin (iii) possibilité technique de les détecter rapidement puis de les typer finement. Des recherches de chlamydia, coronavirus et avulavirus ont donc été réalisées en plus des VIA, et ce sur une diversité de types de prélèvements dans l'avifaune, les canards et l'environnement de l'élevage étudié.

I. Identification et description d'un nouveau mycoplasme circulant dans la communauté aviaire commensale des élevages

a. Introduction

Si l'avifaune commensale des élevages avicoles est fréquemment suspectée de jouer un rôle dans la circulation et la diffusion locales d'agents infectieux vers et entre ces élevages (Veen et al., 2007), ce rôle épidémiologique n'a jamais pu être avéré pour les VIA même autour de foyers d'IAHP (Caron et al., 2017; Shriner et al., 2016; Shriner and Root, 2020). Cependant les études épidémiologiques sur l'avifaune terrestre sont plus difficiles techniquement et donc moins nombreuses et souvent limitées en capacité de détection virale (Caron et al., 2017). Ainsi, seul le lien avec la proximité d'avifaune aquatique est à ce jour mis en évidence pour les échanges infectieux entre compartiments sauvages et domestiques (Karunakaran et al., 1983; Velkers et al., 2020; Yang et al., 2019). Dans le Sud-Ouest de la France dont les

élevages de volailles ont été particulièrement affectés par les épidémies d'IAHP des dernières années, le rôle épidémiologique de l'avifaune commensale a été particulièrement incriminé notamment pour les VIAHP. En effet, la région comporte de nombreux élevages en plein air exposés à l'avifaune, mais relativement peu de proximités connues avec l'avifaune aquatique migratrice en comparaison d'autres bassins de production français comme la Dombes ou la Vendée. L'avifaune terrestre aurait donc pu prendre le relais entre les réservoirs naturels et les élevages dans cette région, voire maintenir et contribuer à la circulation autour des élevages (Van De Wiele et al., 2017). Afin d'investiguer ce rôle localement, des enquêtes épidémiologiques sur l'avifaune commensale à proximité de foyers d'IAHP en élevages du Sud-Ouest ont été réalisées durant l'hiver 2016-2017. Aucun VIA n'a été détecté sur les 324 oiseaux sauvages prélevés (Van De Wiele et al., 2017). Ceux-ci appartenaient aux huit espèces suivantes (par ordre décroissant d'effectif) : Tourterelle turque, Étourneau sansonnet, Pigeon biset (*Columba livia*), Héron garde-bœufs, Vanneau huppé, Pigeon ramier, Corneille noire (*Corvus corone*) et Pie bavarde (*Pica pica*). Dans ce contexte de crise sanitaire, les VIA ont été recherchés en premier lieu pour répondre rapidement et simplement à des questions sur la possibilité d'échanges viraux depuis ou vers les élevages, ou d'une maintenance de circulation virale postérieure à un « spillover » dans le compartiment sauvage commensal. Cependant, les limites de détection de la recherche virale directe ont été précédemment évoquées pour ces espèces non réservoirs moins sensibles à l'infection. *A posteriori*, afin d'investiguer plus largement les possibilités d'échanges infectieux de ces espèces avec les élevages alentours, des recherches directes ont été faites ciblant des agents pathogènes communs en élevages de volailles et plus robustes que les VIA (durée et quantité d'excrétion). En particulier, la recherche par qPCR de *Mycoplasma gallisepticum* a montré une forte proportion d'individus positifs dans la population d'étourneaux sansonnets de cet échantillon, et strictement sur écouvillons cloacaux, ce qui semblait inhabituel pour cette bactérie à tropisme préférentiellement respiratoire. Des investigations supplémentaires pour caractériser la phylogénie, la distribution d'hôtes et la pathogénicité de cette souche étaient alors nécessaires pour déterminer si cet agent infectieux pouvait être un potentiel marqueur d'échanges à l'interface sauvage-domestique. En outre, la circulation d'une souche potentiellement pathogène ou proche génétiquement de souches pathogènes dans l'avifaune commensale autour des élevages pourrait représenter un risque important pour les introductions ou émergences infectieuses.

b. Publications scientifiques

Ces travaux sont présentés et discutés dans l'article scientifique suivant, publié en novembre 2021 dans la revue *Transboundary and Emerging Diseases* (Le Gall-Ladevèze et al., 2021). Ils ont également fait l'objet d'une présentation de poster à la conférence *69th WDA / 14th EWDA - Joint Virtual Conference* du 31 août au 02 septembre 2021 (Le Gall-Ladevèze, 2021b) (Annexe C).

ORIGINAL ARTICLE

Detection of a novel enterotropic *Mycoplasma gallisepticum*-like in European starling (*Sturnus vulgaris*) around poultry farms in France

Chloé Le Gall-Ladevèze | Laurent-Xavier Nouvel | Marie Souvestre |
Guillaume Croville | Marie-Claude Hygonenq | Jean-Luc Guérin | Guillaume Le Loc'h 

IHAP, ENVT, INRAE, Université de Toulouse,
Toulouse, France

Correspondence

Guillaume Le Loc'h, IHAP, ENVT, INRAE, Université de Toulouse, 31076 Toulouse, France.
Email: guillaume.leloch@envt.fr

Funding information

Direction Générale de l'Alimentation, Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation (DGAL); Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à foie gras (CIFOG); FEDER; Région Occitanie Recherche et Sociétés

Abstract

Recent outbreaks of highly pathogenic avian influenza in southwest France have raised questions regarding the role of commensal wild birds in the introduction and dissemination of pathogens between poultry farms. To assess possible infectious contacts at the wild-domestic bird interface, the presence of *Mycoplasma gallisepticum* (MG) was studied in the two sympatric compartments in southwest France. Among various peridomestic wild birds ($n = 385$), standard PCR primers targeting the 16S rRNA of MG showed a high apparent prevalence (up to 45%) in cloacal swabs of European starlings (*Sturnus vulgaris*, $n = 108$), while the MG-specific *mgc2* gene was not detected. No tracheal swab of these birds tested positive, and no clinical sign was observed in positive birds, suggesting commensalism in the digestive tract of starlings. A mycoplasma strain was then isolated from a starling swab and its whole genome was sequenced using both Illumina and Nanopore technologies. Phylogenetic analysis showed that it was closely related to MG and *M. tulyi*, although it was a distinct species. A pair of specific PCR primers targeting the *mgc2*-like gene of this MG-like strain was designed and used to screen again the same avian populations and a wintering urban population of starlings ($n = 50$). Previous PCR results obtained in starlings were confirmed to be mostly due to this strain (20/22 positive pools). In contrast, the strain was not detected in fresh faeces of urban starlings. Furthermore, it was detected in one cloacal pool of white wagtails, suggesting infectious transmissions between synanthropic birds with similar feeding behaviour. As the new Starling mycoplasma was not detected in free-range ducks ($n = 80$) in close contact with positive starlings, nor in backyard ($n = 320$) and free-range commercial ($n = 720$) chickens of the area, it might not infect poultry. However, it could be involved in mycoplasma gene transfer in such multi-species contexts.

KEYWORDS

mycoplasma, *Mycoplasma gallisepticum*, poultry, Sp. Nov, starling, wildlife-livestock interface

1 | INTRODUCTION

In a context of increasing global concerns about animal welfare, free-range livestock farming is on the rise in industrialized countries (Sørensen et al., 2006; Thornton, 2010), including in the poultry production sector (Bessei, 2018). Due to the nature of free-range systems, an increase in free-range farming mechanically leads to an increase in the farmland devoted to production. This leads in turn to larger areas where farm animals and wildlife may come into contact. As livestock spend more time outdoors, free-range farming also increases the probability of contacts between livestock and wildlife. Depending on environmental conditions and the species present on both sides of this interface, micro-organisms can be shared via direct and indirect contacts. This enriched microbiome is composed predominantly of commensal strains that could be considered to be protective flora, but some of these shared opportunistic infectious agents can occasionally be or become pathogenic (Bass et al., 2019; Vayssier-Taussat et al., 2014).

Among the infectious agents that can be shared between species, mycoplasma show a wide variety of strains, the majority of which are commensal and non-pathogenic (Citti & Blanchard, 2013). However, some can cause pathogenicity in their hosts. These include *Mycoplasma gallisepticum* (MG), which is the most frequent mycoplasma pathogen of poultry and causes chronic respiratory syndromes with considerable economic and sanitary impacts (Ferguson-Noel et al., 2020; Levisohn & Kleven, 2000). Because domestic galliformes are its main natural reservoir, the detection of MG in wild birds living in contact with poultry farms is likely an indicator of a spillover from livestock to wildlife. In the eastern United States, such a spillover was suspected to have occurred in house finch (*Haemorrhous mexicanus*), and the species was found to be a secondary maintenance host (Fischer et al., 1997; Luttrell et al., 2001). The spread in commensal wild birds generated fears of possible spillbacks to commercial poultry as the transmission of the bacteria via direct contacts and materials was established (Dhondt et al., 2007; Luttrell et al., 2001; Stallknecht et al., 1998), and because an atypical strain isolated in commercial turkeys was genetically related to house finch strains (Ferguson et al., 2003). Natural infections of wild birds with MG are reported worldwide, and have been described in various taxa (Dhondt et al., 2014; Ferguson-Noel et al., 2020; Ley et al., 2016; Michiels et al., 2016; Sawicka et al., 2020; Sumithra et al., 2013). This wide potential of distribution associated with various transmission modes and consistent environmental survival suggests that the possibility of spillovers and spillbacks of MG between domestic and wild birds is significant.

MG in field samples is conventionally identified using bacterial cultures with immunological or PCR methods, or directly by PCR detection on the original sample. As mycoplasma cultivation is often long and fastidious, PCR methods generally are preferred when rapid results are needed, such as in routine clinical diagnosis or large epidemiological studies. The usual MG DNA sequence targets are 16S rRNA (Lauerman, 1998), defined as a reference target by OIE (OIE, 2019), but other target sequences have been used such as the *mgc2* gene (García et al., 2005). The latter was defined as a more specific target, in contrast with PCR primers for the highly conserved 16S rRNA sequence that might

amplify other MG-like species hosted by birds, such as *Mycoplasma imitans* (García et al., 2005), *Mycoplasma tullyi* (Yavari et al., 2017) and other unidentified species detected in seabirds (Ramírez, 2019).

To assess possible infectious contacts at the wild-domestic bird interface, the presence of MG was studied in the two sympatric compartments in southwest France. The region is of particular interest for studying the wild-domestic bird interface as it is the second largest poultry production area in France, with various species included in the orders Galliformes and Anseriformes and a high density of quality labels and foie gras production units that require poultry to be kept outdoors for several weeks. These conditions offer frequent potential occasions for contacts between wild and domestic compartments, which has led, for example, to investigations into the role of wild birds in the diffusion of highly pathogenic avian influenza viruses during the last epizootics of 2015–2016, 2016–2017 and 2020–2021 (Anses, 2016; Guinat et al., 2017; Plateforme ESA, 2021; Van De Wiele et al., 2017). As MG may rely on the same direct and indirect transmission routes as influenza viruses, with longer expected excretion times in its host, it could be used as a transmission marker between wild and domestic birds in this region. This study aims to investigate this hypothesis and characterize the epidemiology and phylogeny of detected strains of MG and close relatives among several species of commensal wild birds of poultry farms, as well as among free-range commercial and backyard poultry flocks in the same area.

2 | MATERIALS AND METHODS

2.1 | Sampling birds at the wild-domestic interface

2.1.1 | Sampling of wild birds

Samples were taken in two separate campaigns. The first took place between December 2016 and February 2017 in the framework of highly pathogenic avian influenza surveillance in wild birds under the authority of the prefecture and government wildlife services. Captures were performed by lethal shooting of healthy birds living in close proximity to poultry farms in the departments of Gers and Hautes-Pyrénées in southwestern France. Sampled birds consisted of 89 European starlings (*Sturnus vulgaris*) and 29 cattle egrets (*Bubulcus ibis*) (Table 1). Both oropharyngeal and cloacal swabs were taken from each individual. All swabs were stored in microtubes with 300 μ l sterile 1X PBS on ice before being frozen at -80°C in the laboratory.

The second sampling campaign took place from July 2019 to February 2020. It was based on mist-net captures targeting healthy small to medium-sized wild species on a mule duck farm in the department of Gers. Sampled birds consisted of 207 individuals representing 12 species, including 40 birds of five species in the *Fringillidae* family, 92 sparrows (*Passer domesticus* and *Passer montanus*), 53 wagtails (*Motacilla alba* and *Motacilla cinerea*), 19 European starlings and three Charadriiformes (Table 1).

Again, both oropharyngeal and cloacal swabs were taken from each individual. All wild bird captures and manipulations were

TABLE 1 Description of wild and domestic bird groups sampled, and the corresponding number of sample pools analyzed for each group

Group	Species name	Common name	Area	Sampling method	Period	Number of birds sampled	Corresponding number of units analysed	
							Oropharyngeal	Cloacal/faecal
Starlings	<i>Sturnus vulgaris</i>	European starling	Gers and Hautes-Pyrénées	Post-mortem (shot)	Winter 2016–2017	89	20	20
			Duck farm	Live (captured)	Summer 2019–Winter 2020	19	5	4
			City of Toulouse	Faeces under roosts	Autumn 2019	50	–	10
Pelecaniformes	<i>Bubukus ibis</i>	Cattle egret	Gers and Hautes-Pyrénées	Post-mortem (shot)	Winter 2016–2017	29	6	6
			Duck farm	Faeces under roosts	Autumn 2019	60	–	12
Charadriiformes	<i>Gallinago gallinago</i>	Common snipe	Duck farm	Live (captured)	Summer 2019–Winter 2020	2	1	1
	<i>Larus michahellis</i>	Yellow-legged gull				1	1	1
Fringillidae	<i>Chloris chloris</i>	European greenfinch	Duck farm	Live (captured)	Summer 2019–Winter 2020	7	8	8
	<i>Linaria cannabina</i>	Common linnet				2		
	<i>Carduelis carduelis</i>	European goldfinch				6		
	<i>Fringilla coelebs</i>	Common chaffinch				23		
	<i>Serinus serinus</i>	European serin				2		
Wagtails	<i>Motacilla alba</i>	White wagtail	Duck farm	Live (captured)	Summer 2019–Winter 2020	52	14	14
	<i>Motacilla cinerea</i>	Grey wagtail				1		
Sparrows	<i>Passer domesticus</i>	House sparrow	Duck farm	Live (captured)	Summer 2019–Winter 2020	49	11	10
	<i>Passer montanus</i>	Eurasian tree sparrow				43	10	5
Domestic poultry	Backyard chickens		Gers	Live (on farm)	2017	320	64	64
	Free-range commercial chickens		Gers	Post-mortem (slaughtered)	2019	720	144	–
	Free-range commercial mule ducks		Duck farm	Live (on farm)	Summer 2019–Winter 2020	80	16	16

Note: If a sample type was not analysed in some groups, a "–" is figured.

performed with the help of a professional bird-bander, and the protocol was subjected to a mandatory authorization by the Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France. Swabs were stored as previously described.

In parallel with the captures, in October and November 2019, a non-invasive method was used to sample a group of cattle egrets seen foraging during the autumn and winter months in close contact with farmed ducks and other wild species. A previously disinfected plastic surface

was placed under their night roosts, which were located 2 km away from the farm, and 30 fresh faeces were collected using sterile swabs on one morning of each month. Moreover, in December 2019, a population of starlings spending winter nights in the centre of Toulouse city (around 100 km from the duck farm in Gers) was sampled in the same non-invasive way. Fifty fresh faeces were collected using sterile swabs on one morning under roosting trees used by starlings only (Table 1). Swabs were stored as previously described.

TABLE 2 Description of PCR primers used in this study

Primer name	Primer sequence (5'–3')	Primer type	Expected PCR product size (bp)	Target gene	Reference
MG-14F	GAGCTAATCTGTAAAGTTGGTC	Forward	185	16S rRNA	Lauerman (1998)
MG-13R	GCTTCCTTGGCGGTAGCAAC	Reverse			
<i>mgc2</i> -2F	CGCAATTGGTCCTAATCCCAACA	Forward	250	<i>mgc2</i> adhesin	García et al. (2005)
<i>mgc2</i> -2R	TAAACCCACCTCCAGCTTTATTCC	Reverse			
<i>mgc2L</i> -F	GTGCAGGGGGTGGTTAATTCT	Forward	250	<i>mgc2</i> -like adhesin	This study
<i>mgc2L</i> -R	GGTTGGATTGCTGGTTGTGGA	Reverse			

2.1.2 | Sampling of domestic birds

In 2017, in the same context of influenza investigations, 320 apparently healthy chickens were sampled from 64 backyard flocks close to farm outbreaks in the same department of Gers (Table 1). Tracheal and cloacal swabs were collected on five birds in each backyard flock and stored as previously described.

In 2019, 720 commercial free-range chickens aged 84 days and originating from 36 farms were sampled post-mortem in slaughterhouses in Gers (Table 1). Tracheal swabs were collected following the standard sampling for MG diagnosis (Levisohn & Kleven, 2000). Swabs were stored as previously described.

In parallel with the wild bird captures in 2019–2020, mule ducks from the farm in Gers were sampled: tracheal and cloacal swabs from 20 ducks of the same flock, around 10 weeks of age (i.e. after 7–9 weeks of free-ranging life), were collected in April, November, December 2019 and February 2020 (Table 1). Swabs were stored as previously described.

2.2 | Detection and identification of mycoplasma strains

2.2.1 | Nucleic acid extractions

Because the swabs were subjected to screening for several viral and bacterial agents, DNA extractions were performed from a sub-volume of their supernatant using QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands) with spin-columns, following the manufacturer's instructions as it allows both RNA and DNA extractions. For extraction and subsequent analyses, all of the samples were pooled by species or family, sample type and period (five samples in each pool whenever possible). Negative extraction controls were processed alongside each series of extractions. All extracted nucleic acids and remaining PBS with swabs were then stored and frozen at -80°C until further analysis.

2.2.2 | Molecular screening

PCR screenings targeting 16S rRNA, *mgc2* adhesin and *mgc2*-like adhesin (list of primers used in Table 2) were made by real-time PCR

(rtPCR) on LightCycler 96 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland). The LightCycler SYBR Green I Master reaction mix (Roche) was used with the following volumes for each sample analysed: total volume of 20 μl , with 2 μl of DNA sample, 0.4 μl of each 10 μM primer (final concentration of 0.2 μM), 10 μl of SYBR Green I Master and 7.2 μl of PCR-grade water. Negative and positive PCR controls were systematically run along with samples, and consisted, respectively, of 2 μl of water and 2 μl of standard dilutions of plasmid construct, including the specific PCR target sequence. The latter were used for sample quantification, and as controls of detection threshold to take into account manipulation variability between runs. After having tested reaction sensitivity on 10-fold dilutions of the specific control plasmid for *mgc2* and for *mgc2*-like to validate the SYBR Green protocols (Appendix S1), all thermocycling programs were then set on the same conditions, following manufacturer's instructions adapted from Jarquin et al. (2009): pre-incubation step of 5 min at 95°C , 45 amplification cycles of 10 s at 95°C , 15 s at 55°C and 15 s at 72°C , and a melting analysis phase of 10 s at 95°C , 1 min at 65°C then heating to 97°C with continuous acquisition (5 readings per degree Celsius). Positive results for 16S rRNA target were considered as showing a cycle threshold (Ct) under 44 (more than 1 DNA copy/ μl) and a melting temperature peak in a 2°C range around the one of positive controls (84°C), because of the need to increase sensitivity for healthy small birds and decrease specificity for broad strain detection. For *mgc2* and *mgc2*-like, positive results were considered as showing a Ct under 41 (more than 10 DNA copies/ μl) and a melting temperature peak in a 1°C range around the one of positive controls. Confirmation of suspect results of all PCR (i.e. with Ct above 41 or 44, or with a different melting temperature peak from controls) was made by gel electrophoresis of PCR products and Sanger sequencing of the expected-size bands.

2.2.3 | Cultivation and isolation of mycoplasma strains

Mycoplasma were cultured from the most loaded starling cloacal swabs, after thawing of the samples previously stored at -80°C after DNA extractions. Culture was performed in sequential incubations and purifications following standard protocols (Tully, 1995) adapted for contaminated samples. Briefly, swabs were initially enriched by incubation in 1.8 ml SP4 liquid growth medium supplemented with Thallium

acetate (0.1% w/v) for 4 h at 37°C. First, 0.1 dilutions of these broths were plated on agar, but resulted in non-mycoplasmal contamination covering colonies with a typical fried-egg shape. To purify and select the most of the target mycoplasma from the first enrichment broth, two supplementary passages were realized, each one cultured at 37°C for 3 days until the colour of the medium changed (to bright yellow). The entire volume of the resulting enriched broth was then filtered with a 0.45 µm pore size membrane. As no growth resulted on agar plates from the filtrate, it was subjected to a supplementary passage and cultured in a liquid medium at 37°C for 3 days until the colour changed. Plating on agar of 10 µl from this last filtered-enriched broth resulted in one single mycoplasma colony from one of the initial swabs. The identity of the isolated strain of Starling mycoplasma was confirmed by the specifically designed PCR, and then it was enriched and kept frozen for further use.

2.3 | Phylogenetic and epidemiological characterization of the novel Starling mycoplasma

2.3.1 | Whole genome sequencing

Genomic DNA was extracted and purified from a broth culture of Starling mycoplasma, using a standard phenol-chloroform method (Chen & Kuo, 1993). The DNA then was sequenced using two complementary sequencing chemistries: Oxford Nanopore Technologies (ONT, Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK) and Illumina Hi-Seq (Illumina, Inc., San Diego, CA, USA). The ONT library was prepared using the field sequencing kit (SQK-LRK001) and loaded on a flongle flowcell (FLO-FLG001) both from ONT manufacturer, and then the sequencing run was started on a MinION MK1B device for 10 h. Nanopore raw reads were basecalled using Guppy (v2.2.3), and a first assembly was performed using Canu (v1.6) to assess the possibility of constructing a draft genome based on nanopore reads. The DNA was also sequenced by Illumina Hi-Seq (paired-end, 2 × 150 bp), performed at the GATC Biotech facility (Konstanz, Germany). A hybrid assembly combining ONT and Illumina reads was made using Unicycler version 0.3.4 (Wick et al., 2017). The resulting whole genome scaffold was annotated with NCBI prokaryotic genome annotation pipeline (Tatusova et al., 2016). The nucleotide sequence is accessible on GenBank under accession number CP068418.

2.3.2 | Phylogenetic analysis

Genome alignments, synteny and identity compared with reference strain NCTC10115 of MG (accession number LS991952) were determined and visualized using the wgVISTA tool (Frazer et al., 2004).

Phylogenetic analyses were conducted using MEGA version X (Kumar et al., 2018) on the longest available 16S rRNA sequences on GenBank, from strains MG NCTC10115 (accession number LS991952, position 311526–312838), MG R(high) (CP001872, position 334316–335628), MG VA94 7994-1-7P (CP003506, position

330639–331926), *M. imitans* 4229 (NR_025912, position 181–1439), *M. tullyi* 56A97 (CP059674 position 261228–262515), *M. sp* 27635 (FM878638 position 190–1477), *M. pneumoniae* 16–734 (CP039761 position 118406–119688), *M. iowae* NCTC10185 (LR215023 position 141325–142629), *M. stumi* UC/MF (NR_025968 position 179–1426) and *M. synoviae* NCTC10124 (LS991953 position 703362–702069). Reference strain sequences were aligned together with those of the Starling mycoplasma using MUSCLE algorithm, and then compared by a maximum likelihood tree.

2.3.3 | Design of specific qPCR primers and protocol

Specific rtPCR for detection of the Starling mycoplasma was designed to target the domain coding for its *mgc2*-like adhesin. Selection of priming sites was made *in silico* using the Primer BLAST tool from NCBI (Ye et al., 2012), selecting a PCR-product size range of 150–250 bp and excluding matches with the whole mycoplasma reference database (including the close relatives *M. tullyi*, *M. imitans* and MG strains). Among propositions of primer pairs, selection was based on the least self-complementarity of both primers. Selected primers *mgc2L-F/mgc2L-R* (Table 2 and Appendix S2) were then tested *in vitro* to assess the best PCR conditions regarding sensitivity and specificity of amplification with genomic DNA of the new Starling mycoplasma, compared with *Mycoplasma gallisepticum* PG31, *M. gallinaceum* and *M. pullorum* strains. As none of these other strains were amplified with the new primers, and the 55°C annealing temperature leads to a detection threshold of 10 copies/µl (see Appendix S1), the rtPCR protocol was set as described above for 16S and *mgc2* targets. A plasmid construct, including the PCR target sequence of the new mycoplasma, was built with StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) following manufacturer's instructions, and used as a positive PCR control.

2.3.4 | Epidemiological analysis

As screenings were mainly performed on pooled samples, the estimated pooled prevalence and 95% confidence interval were calculated online with EpiTools (Sergeant, 2018) using the "Pooled prevalence for fixed pool size and perfect tests" tool with the method for exact confidence limits assuming a binomial distribution (Method 3 from Cowling et al., 1999).

3 | RESULTS

3.1 | Distribution of MG and close relatives at the wild-domestic bird interface

Detection of MG DNA in wild bird and domestic poultry compartments gave distinct results (Table 3). In the wild compartment sampled in the winter of 2016–2017, 19 out of 20 cloacal pools from starlings

TABLE 3 PCR results and corresponding pooled prevalence estimates (95% confidence intervals [CI] into brackets) for each group of wild and domestic birds sampled

Species	Area	Period	MG 16S rRNA PCR results		Pooled prevalence MG 16S rRNA [95% CI]		MG mgc2 PCR results		Pooled prevalence MG mgc2 [95% CI]		Starling mycoplasma mgc2 LPCR results		Pooled prevalence Starling mycoplasma mgc2 [95% CI]	
			Oroph.	Cloac.	Oroph.	Cloac.	Oroph.	Cloac.	Oroph.	Cloac.	Oroph.	Cloac.	Oroph.	Cloac.
Starlings	Gers and Hautes-Pyrénées	Winter 2016–2017	0/20	19/20	-	0.451 [0.243–0.737]	-	0/19	-	0.316 [0.176–0.497]	-	17/19	-	0.316 [0.176–0.497]
			0/5	3/4	-	0.242 [0.042–0.637]	-	0/3	-	0.242 [0.042–0.637]	-	3/3	-	0.242 [0.042–0.637]
	City of Toulouse	Autumn 2019	-	0/10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Cattle egrets	Gers and Hautes-Pyrénées	Winter 2016–2017	1/6	0/6	0.036 [0.001–0.185]	-	0/1	-	0/1	-	0/1	-	-	-
			-	0/12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Charadriiformes	Duck farm	Summer 2019–Winter 2020	0/2	0/2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fringillidae	Duck farm	Summer 2019–Winter 2020	0/8	0/8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Wagtails	Duck farm	Summer 2019–Winter 2020	0/14	1/14	-	0.015 [0.000–0.079]	-	0/1	-	0.015 [0.000–0.079]	-	1/1	-	0.015 [0.000–0.079]
			0/21	0/15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sparrows	Duck farm	Summer 2019–Winter 2020	0/21	0/15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Backyard chickens	Gers	2017	13/64	9/64	0.044 [0.024–0.075]	0.030 [0.014–0.056]	13/13	4/9	0.044 [0.024–0.075]	0.013 [0.003–0.033]	0/13	0/9	-	-
			0/144	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Free-range chickens	Duck farm	Summer 2019–Winter 2020	0/16	0/16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Note: PCR results are shown as number of positive pools or individuals over number tested. If a sample type was not analysed in some groups, a “-” is figured. Abbreviations: Cloac., cloacal or faecal samples; Oroph., oropharyngeal samples.

(estimated pooled prevalence 45% [95% CI: 24–74], mean Ct 26.4) and 1 out of 6 oropharyngeal pools from cattle egrets (4% [95% CI: 0–19], Ct 43.3) were positive for MG 16S rRNA; however, none of them were positive for the *mgc2* gene. Results from the second sampling campaign in 2019–2020 revealed three out of four cloacal pools from starlings positive for MG 16S rRNA (24% [95% CI: 4–64], mean Ct 27.5), all negative for the *mgc2* gene and no detection of MG 16S rRNA in 12 faecal pools from cattle egrets foraging on the same farm area. In other groups of wild birds sampled on the duck farm in 2019–2020, no Charadriiformes, Fringillidae or sparrows showed positive PCR results for MG 16S rRNA, while 1 out of 14 cloacal pools from wagtails was positive for MG 16S rRNA (1.5% [95% CI: 0–8], Ct 41.1) and negative for the *mgc2* gene. On the sampling campaign in urban starlings in 2019, all faecal pools were negative for MG and close relatives (Table 3).

In domestic poultry, while none of the 144 commercial free-range chicken oropharyngeal pools were found positive for MG 16S rRNA, 13 out of 64 backyard chicken oropharyngeal pools tested positive for both MG 16S rRNA (mean Ct 40.3) and *mgc2* genes, corresponding to an estimated pooled prevalence of MG in backyard chicken oropharynx of 3% [95% CI: 1–6]. Regarding cloacal samples, MG 16S rRNA was detected in 9 out of 64 pools (mean Ct 39.4), followed by *mgc2* confirmation in only 4 out of 9 pools, corresponding to an estimated pooled prevalence of MG in backyard chicken cloaca of 1% [95% CI: 0–3]. Ducks sampled on the farm in 2019–2020 all showed negative PCR results for MG 16S rRNA (Table 3).

3.2 | Characterization and detection of a novel *Mycoplasma* species

As PCR results from wild birds showed a high prevalence for MG 16S rRNA in Eurasian starlings, only cloacal swabs from starlings showing the highest mycoplasma loads on rtPCR were cultured in mycoplasma medium. Due to difficult isolation of mycoplasma from contaminated samples, only one swab resulted in one single colony of the expected strain. This colony and further replicated ones showed a typical fried-egg shape on agar plates, with very similar appearance to MG strains.

Whole genome sequencing from one of these colonies was carried out. Nanopore sequencing produced a total of 18,830 reads with an N50 value of 11.87 Kb. Canu analysis allowed the assembly of a draft genome in one contig of 938,090 bp. The Illumina sequencing produced $2 \times 10,536,376$ reads corresponding to an average of 3400X for coverage depth. Hybrid assembly with Unicycler allowed one 925,667 bp circularized genome to be obtained.

Comparison of this genome to sequenced strains of MG, other close relatives found in domestic and wild birds and other mycoplasma species available in public databases revealed that this Starling mycoplasma isolated from cloaca belonged to a distinct new mycoplasma species. It was close to MG strain NCTC10115 (GenBank accession: LS991952, overall 91.1% identity, 16S rRNA 98.5% identity), *M. tullyi* isolated from a captive Humboldt penguin in UK (GenBank accession: CP059674, overall 91.1% identity, 16S rRNA 98.6% identity) and another unidentified mycoplasma detected in

a wild Kelp Gull in South Africa (GenBank accession: FM878638, 16S rRNA 98.99% identity). However, this new species of Starling mycoplasma was very distinct from *M. sturni*, commonly isolated from the same host, with only 78.4% identity on its 16S rRNA sequence. The phylogenetic tree based on the whole 16S rRNA sequence confirmed these relations (Figure 1). The Starling mycoplasma genome showed highly similar regions with MG strain NCTC10115, such as its 16S rRNA sequence 98.5% identical (Appendix S3), or its 23S rRNA showing 97.5% identity. However, many regions were strongly different from MG homologous ones, in particular genes used for multilocus sequence typing of MG strains, such as *mgc2* sequence showing only 54.7% identity to its homologous one in the Starling mycoplasma (Appendix S2), or the 16S-23S rRNA intergenic region with 88.8% identity and the *rpoB* with 82% identity. Synteny visualization of MG strain NCTC10115 and the Starling mycoplasma genomes shows conserved, repeated or reversed homologous regions (Figure 2).

3.3 | Distribution of the novel *Mycoplasma* sp. at the wild-domestic bird interface

Using the specifically designed rtPCR for the *mgc2*-like gene, previous results from MG screenings were checked for presence of the novel Starling mycoplasma. In wild birds that were positive for MG 16S rRNA, the presence of the Starling mycoplasma DNA was confirmed in 17 out of the 19 cloacal pools of 2016–2017 starlings (32% [95% CI: 18–50], mean Ct 34.1), in the three cloacal pools of 2019–2020 starlings (24% [95% CI: 4–64], mean Ct 39.9) and in the cloacal pool of wagtails (1.5% [95% CI: 0–7.9], Ct 39.1) (Table 3 and Figure 3). Thus, two of MG 16S rRNA positive pools of starlings and one of cattle egrets were left unidentified.

In the domestic compartment, the 13 oropharyngeal pools and 9 cloacal pools of backyard chickens that had been found positive for MG 16S rRNA showed no detection of the Starling mycoplasma (Table 3 and Figure 3). As MG was previously detected in most of these pools, only five cloacal pools were left with no identification.

4 | DISCUSSION

Looking for signs of infective contacts at the wild-domestic bird interface, a search for MG DNA was carried out in various commensal wild bird samples collected around poultry farms in the departments of Gers and Hautes-Pyrénées in southwest France. The widely used PCR test, based on standard MG14F/MG13R primers, was used as the first-line screening tool. As this PCR might be slightly unspecific (detection of MG and close relatives), a second PCR using *mgc2* primers was performed on positive samples in order to increase specificity for MG. Unexpected results were obtained when comparing both PCRs. Indeed, while very few wild birds and backyard chickens carried 16S rRNA of MG, opposite results were obtained for European starlings around poultry farms. These starlings showed a particularly high apparent prevalence of MG 16S rRNA, but no detection of the *mgc2*

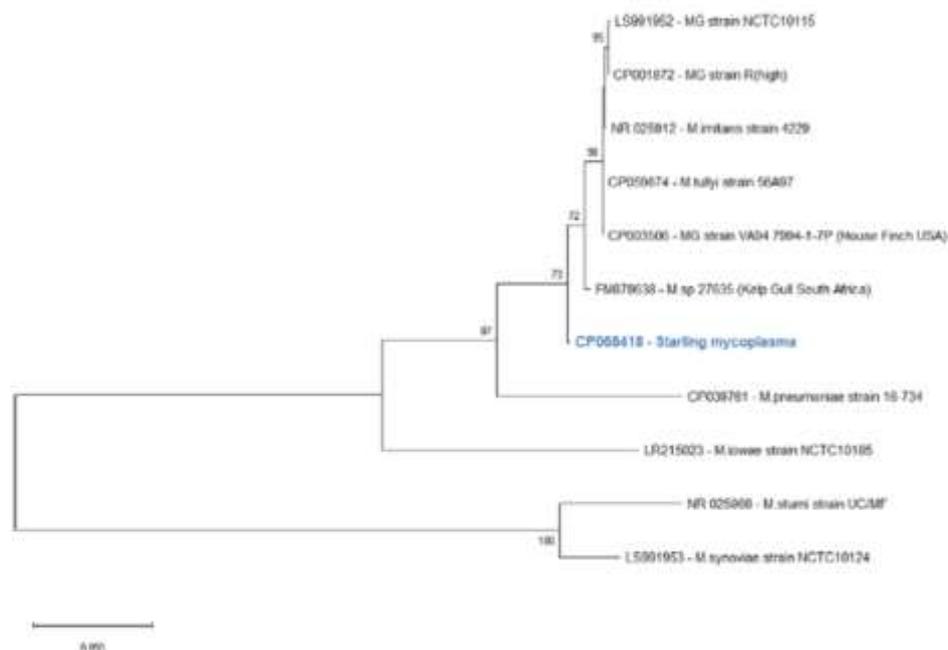


FIGURE 1 Phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of Starling mycoplasma and various mycoplasma reference strains. The new Starling mycoplasma is highlighted in blue. Minimum sequence alignment length is 1248 nt. The maximum likelihood tree was built on a Tamura-Nei Gamma-distributed model, with 300 bootstrap replications. Bootstrap values lower than 70 are not shown

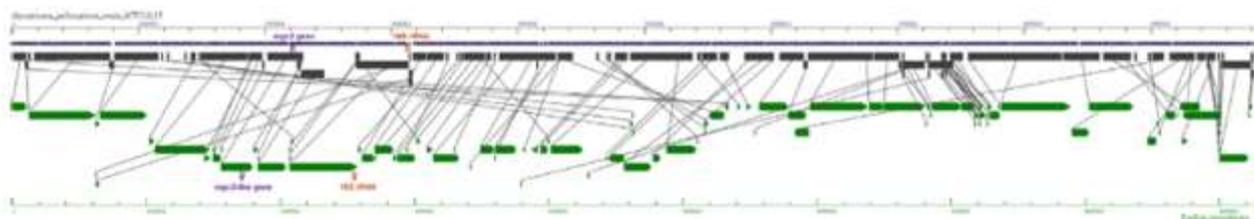


FIGURE 2 Whole genome synteny representation of Starling mycoplasma and *Mycoplasma gallisepticum* strain NCTC10115 (LS991952.1). Loci for *mgc2* or "mgc2-like" adhesin (purple) and for 16S rRNA (orange) are indicated

gene, and a surprising strict cloacal tropism for bacteria usually considered as adapted to the respiratory tract. After isolation from one starling cloacal swab and whole genome sequencing of this atypical mycoplasma strain, comparative phylogeny with close species, such as MG and *M. tullyi*, revealed the identification of a new distinct species of mycoplasma. Screening using a specifically designed rtPCR for this novel mycoplasma confirmed its presence in the previous starling samples, but no DNA was detected in urban starlings of the same region. In the sympatric bird populations of positive starlings, no domestic poultry (chicken or ducks) were found to host the novel mycoplasma, and most of the other commensal wild birds were also found to be uninfected, except for one cloacal pool of white wagtails.

Target species for captures and samplings were selected for their potential literature-based susceptibility to mycoplasma infections (*Fringillidae*, Charadriiformes and starlings), or for their behaviour of high closeness with domestic birds (wagtails, sparrows and cattle egrets). In the United States, natural MG infections in house finches

(*H. mexicanus*) have been detected for decades (Fischer et al., 1997; Luttrell et al., 2001), and it has been shown experimentally (Dhondt et al., 2007) and on field observations (Fischer et al., 1997; Ley et al., 2016) that other species of *Fringillidae* are also, but slightly less, susceptible. However, none of the 40 *Fringillidae* of our study were found to be infected by MG, even though some backyard poultry of the same region were found to be infected. Their role in the epidemiology of these bacteria in the studied area thus seems insignificant, contrary to what is observed in the United States. The other sampled wild species known to be susceptible to MG (Charadriiformes and starlings) did not seem to play a role in its regional epidemiology neither.

In contrast, the new mycoplasma was detected in a large proportion of starlings and also in wagtails. It is then interesting to note the presence of the new mycoplasma in species foraging in the same environment as infected starlings, which overall suggests infective contacts between these peridomestic species, and indicates the occurrence of occasional spillover events of this mycoplasma from its maintenance

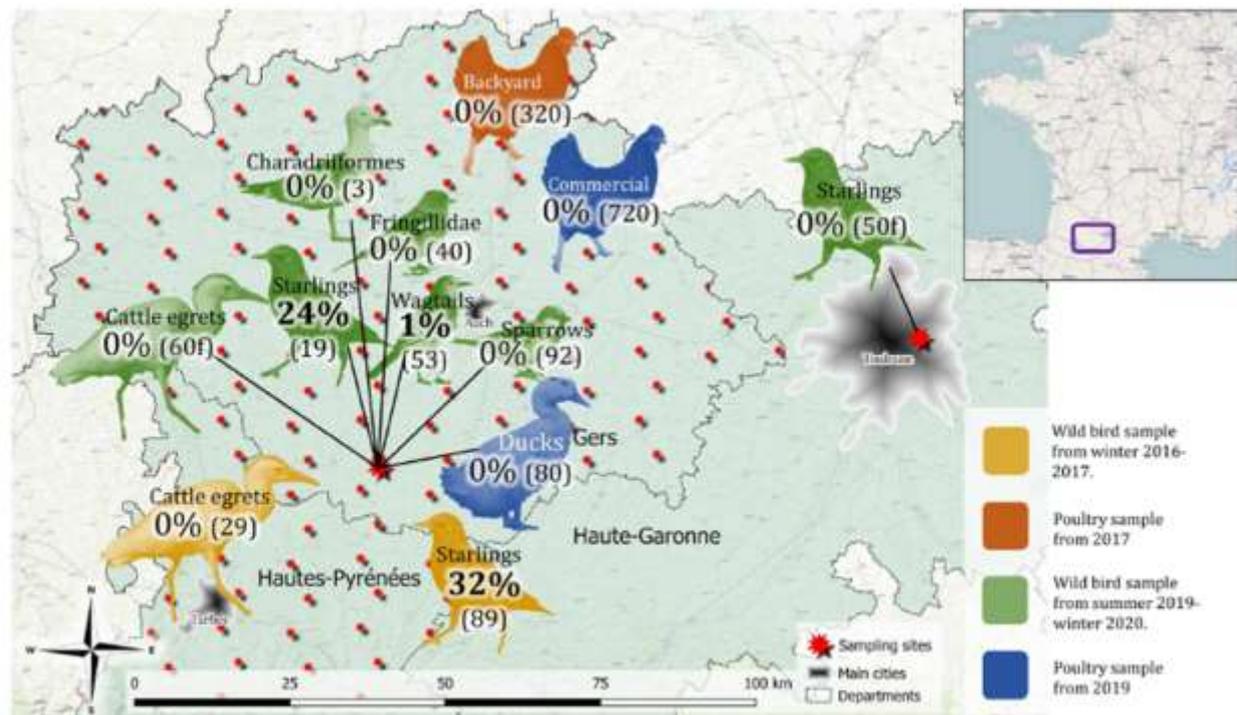


FIGURE 3 Map of Starling mycoplasma distribution in species, space and time. The estimated prevalence is indicated in percentage for each category, with sample size into brackets. A "f" following sample size means that only faeces were collected

population (starlings) to other hosts. With only 1.5% estimated pooled prevalence in white wagtail digestive tracts, infection by the Starling mycoplasma seems to be more sporadic than endemic in this species. This idea is supported by the contrasting very high frequency of infection in sympatric starlings, which were excreting bacteria in their faeces and thus certainly infecting their shared foraging areas. In contrast, outdoor-ranging poultry did not show any contamination, although living in similar close conditions with infected starlings, supporting the idea that ducks and chickens might be less or not susceptible to the new mycoplasma. For the same reasons, cattle egrets, Charadriiformes, *Fringillidae* and sparrows could be less susceptible to the Starling mycoplasma. In consequence, the bacteria may present a restricted natural host range in European starlings, with high prevalence levels in this population, up to 31.6%, and strict cloacal excretion, while very few spillover events occur to exposed sympatric avian species.

In order to compare the distribution of the Starling mycoplasma in different populations of its host, a wintering urban population of starlings was sampled in the same time range and approximately 100 km away from the duck farm in Gers. None of the urban starling faeces collected were found to carry the mycoplasma, suggesting different epidemiological mechanisms. An explanation for the observed lack of detection could be the dilution of local possibly infected starlings into uninfected populations of starlings from eastern and northern Europe gathering during winter (Feare & Douville de Franssu, 1992; Fliege, 1984), a phenomenon that seems more important in urban areas (Peris et al., 1991; Robinson et al., 2005). A second and not exclusive hypothesis could be an absence of communication (i.e. different migration

patterns) between rural and urban starling populations in the region related to different habitats and food availability (Feare & Douville de Franssu, 1992), combined with a restricted range of the Starling mycoplasma to the rural starling population.

As the samplings targeted healthy individuals and no clinical signs were observed during manipulations or in the surroundings of capture fields, the novel Starling mycoplasma does not seem pathogenic to infected starlings, nor to spillover hosts like white wagtails. Moreover, the cloacal tropism of the new mycoplasma seems atypical among other known related species, such as MG in poultry, MG subspecies in house finches, *M. imitans* in various species and *M. sp 27635* in Kelp Gull (GenBank accession: FM878638, Ramirez, 2019), all isolated from respiratory tracts. However, mycoplasma are now known for their ability to horizontally transfer genes within and between species (Citti et al., 2020; Citti et al., 2018), giving the potential for a strain to jump in pathogenicity or infectivity to some host species on occasions of coinfection. The potential evolution of this new species in case of coinfection with closely related pathogenic strains then has to be considered, especially in this context of commensal avifauna in a region with a high density of free-ranging poultry and with both MG and Starling mycoplasma detected in coexisting populations.

Although a spillover of the Starling mycoplasma from wild birds to domestic poultry was not detected in the present study, and without regard to any genomic evolution of the mycoplasma, its circulation at the wildlife–livestock interface increases the chances of such transmission events to occur, with unknown clinical consequences in new hosts. Whether pathogenic or not, infection with the Starling mycoplasma

could also be immunizing against close relatives, such as MG. Further experimental infection studies are needed to assess the pathogenic and immunologic impacts of the infection by this species.

In addition to physiological effects, infection with the Starling mycoplasma in domestic birds could lead to diagnostic issues as highlighted by our results. In the poultry industry, diagnostic tests for MG are mostly made using PCR, the standard primer pair being MG14F/MG13R targeting the 16S rRNA gene (Jarquin et al., 2009; Lauerman, 1998; OIE, 2019). However, a lack of specificity has been described with these primers targeting a least variable region (Kempf, 1998), and alternative more MG-specific primers have been developed to tackle this issue (García et al., 2005; Raviv & Kleven, 2009). Among these new primers, the pair *mgc2*-2F/*mgc2*-2R targeting the adhesin *mgc2* gene seems to be the most reliable for rapid diagnosis thanks to high sensitivity and specificity for MG. While the needs for specificity are often low in indoor poultry production systems, and allow the use of 16S rRNA primers for MG detection, the complex multi-species context at the wild-domestic bird interface of our study pushes specificity needs to higher levels. Indeed, our results tackle a cross-testing issue when using 16S rRNA primers as a detection tool in contexts when atypical strains (pathogenic or non-pathogenic) or coinfections with MG can occur. In consequence, conventional detection with 16S rRNA PCR with no positive confirmation test in some research studies or pathology cases (e.g. Hartup & Kollias, 1999; Mikaelian et al., 2001) might incorrectly lead to a diagnosis of MG when some other closely related strain actually is the cause. Furthermore, occasional MG vaccination failures in domestic poultry could sometimes be due to infection with some atypical MG-like strain incorrectly diagnosed by the standard PCR test.

The present study describes the first complete genome of an MG-like species. These new data can help further phylogenetic studies in this group of poorly studied mycoplasma. In recent years, several other species of mycoplasma have been discovered in wild birds (Lecis et al., 2010; Lierz et al., 2008; Oaks et al., 2004; Sumithra et al., 2013; Yavari et al., 2017) as molecular biology techniques have evolved to ease exploratory research. The strain described in this study is very close to *M. tulyi* isolated from a captive Humboldt penguin (Yavari et al., 2017), and to another unidentified mycoplasma *M. sp* 27635 detected in a Kelp gull from South Africa with only its 16S rRNA sequence published (GenBank accession: FM878638, Ramirez, 2019). Moreover, some samples of our study tested positive for MG 16S rRNA but negative with both *mgc2* or *mgc2*-like primers (2/19 starlings 2017, 1/1 cattle egrets 2017 and 5/9 backyard). This suggests the presence of other – maybe shared – unidentified strains or species of the “mycoplasma” of birds that may cross-test with the standard 16S rRNA PCR, but also contribute in the gene pool transmitted horizontally between coinfecting mycoplasma strains.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was performed in the framework of the “Chaire de Biosécurité Aviaire,” hosted by the National Veterinary College of Toulouse (ENVT) and funded by the Direction Générale de l’Alimentation, Ministère de l’Agriculture et de l’Alimentation, France. This work was

financially supported by the FEDER/Région Occitanie Recherche et Sociétés 2018 - AI-TRACK and by the Comité Interprofessionnel des Palmipèdes à Foie Gras. ONT sequencing was performed in the framework of the FIELD project, in collaboration with the CIBU, Institut Pasteur, Paris, and funded by the France Futur Elevage Carnot Institute.

The authors wish to thank technical helpers without whom the study could not have been possible. In particular, Albert Phouratsamay (DVM) for sample collection on wild birds in the 2017 HPAI epizooty, Emma Hourantier (Master student) for PCR screening analyses on these wild bird samples, Adam Jbenyeni (DVM, PhD student) for helping in collecting poultry samples in Gers abattoirs and Benjamin Voliot (licensed bird-bander for the Centre de Recherche sur la Biologie des Populations d’Oiseaux) for his efficiency in capturing and sampling wild birds on the duck farm. The authors also express their deepest gratitude to the duck breeders in Gers who welcomed us to capture birds around their farm.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors declare no conflicts of interest.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

ETHICAL APPROVAL

The authors confirm that the ethical policies of the journal, as noted on the journal’s author guidelines page, have been adhered to.

For sampling on live wild birds on the duck farm, CRBPO (Centre de Recherches sur la Biologie des Populations d’Oiseaux, Muséum National d’Histoire Naturelle of Paris) ethical review committee approval was received under the project authorization number 1035, and their guidelines for capturing and sampling wild birds were followed with the help of a professional bird-bander and following good veterinary practices. Live domestic poultry were handled and sampled under breeders’ authorization and following good veterinary practices.

ORCID

Guillaume LeLoch  <https://orcid.org/0000-0001-9621-8474>

REFERENCES

- Anses. (2016). Avis relatif au « risque de maintien de l’infection à Influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) H5 par l’avifaune non migratrice, dans la zone réglementée du Sud-Ouest de la France » (No. 2016-SA-0059). Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail.
- Bass, D., Stentiford, G. D., Wang, H.-C., Koskella, B., & Tyler, C. R. (2019). The pathobiome in animal and plant diseases. *Trends in Ecology & Evolution*, 34(11), 996–1008. <http://doi.org/10.1016/j.tree.2019.07.012>
- Bessei, W. (2018). Impact of animal welfare on worldwide poultry production. *World’s Poultry Science Journal*, 74(2), 211–224. <http://doi.org/10.1017/S0043933918000028>
- Chen, W., & Kuo, T. (1993). A simple and rapid method for the preparation of gram-negative bacterial genomic DNA. *Nucleic Acids Research*, 21(9), 2260.

- Citti, C., Baranowski, E., Dordet-Frisoni, E., Faucher, M., & Nouvel, L.-X. (2020). Genomic Islands in mycoplasmas. *Genes*, 11(8), 836. <http://doi.org/10.3390/genes11080836>
- Citti, C., & Blanchard, A. (2013). Mycoplasmas and their host: Emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends in Microbiology*, 21(4), 196–203. <http://doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.003>
- Citti, C., Dordet-Frisoni, E., Nouvel, L. X., Kuo, C., & Baranowski, E. (2018). Horizontal gene transfers in mycoplasmas (Mollicutes). *Current Issues in Molecular Biology*, 29, 3–22. <http://doi.org/10.21775/cimb.029.003>
- Cowling, D. W., Gardner, I. A., & Johnson, W. O. (1999). Comparison of methods for estimation of individual-level prevalence based on pooled samples. *Preventive Veterinary Medicine*, 39(3), 211–225. [http://doi.org/10.1016/S0167-5877\(98\)00131-7](http://doi.org/10.1016/S0167-5877(98)00131-7)
- Dhondt, A. A., DeCoste, J. C., Ley, D. H., & Hochachka, W. M. (2014). Diverse wild bird host range of *Mycoplasma gallisepticum* in Eastern North America. *PLoS One*, 9(7), e103553. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0103553>
- Dhondt, K. V., Dhondt, A. A., & Ley, D. H. (2007). Effects of route of inoculation on *Mycoplasma gallisepticum* infection in captive house finches. *Avian Pathology*, 36(6), 475–479. <http://doi.org/10.1080/03079450701642016>
- Feare, C. J., & Douville de Franssu, P. (1992). The Starling in Europe: Multiple approaches to a problem species. Proceedings of the 15th Vertebrate Pest Conference.
- Ferguson, N. M., Hermes, D., Leiting, V. A., & Kleven, S. H. (2003). Characterization of a naturally occurring infection of a *Mycoplasma gallisepticum* house finch-like strain in turkey breeders. *Avian Diseases*, 47(3), 523–530. <http://doi.org/10.1637/6059>
- Ferguson-Noel, N., Armour, N. K., Noormohammadi, A. H., El-Gazzar, M., & Bradbury, J. M. (2020). Mycoplasmosis. In (D. E. Swayne, Ed.) *Diseases of poultry* (14th edn, pp. 907–965). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781119371199.ch21>
- Fischer, J. R., Stallknecht, D. E., Luttrell, M. P., Dhondt, A. A., & Converse, K. A. (1997). Mycoplasmal conjunctivitis in wild songbirds: The spread of a new contagious disease in a mobile host population. *Emerging Infectious Diseases*, 3(1), 69–72. <http://doi.org/10.3201/eid0301.970110>
- Fliege, G. (1984). Das Zugverhalten des Stars (*Sturnus vulgaris*) in Europa: Eine Analyse der Ringfunde. *Journal für Ornithologie*, 125(4), 393–446. <http://doi.org/10.1007/BF01640135>
- Frazer, K. A., Pachter, L., Pollakov, A., Rubin, E. M., & Dubchak, I. (2004). VISTA: Computational tools for comparative genomics. *Nucleic Acids Research*, 32, W273–W279. <http://doi.org/10.1093/nar/gkh458>
- García, M., Ikuta, N., Levisohn, S., & Kleven, S. H. (2005). Evaluation and comparison of various PCR methods for detection of *Mycoplasma gallisepticum* infection in chickens. *Avian Diseases*, 49(1), 125–132. <http://doi.org/10.1637/7261-0812204R1>
- Guinat, C., Nicolas, G., Vergne, T., Bronner, A., Durand, B., Courcoul, A., Gilbert, M., Guérin, J.-L., & Paul, M. (2017). Dynamique de propagation du virus influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) sous-type H5 (clade 2.3.4.4) chez les volailles domestiques en France 2016–2017. *Bulletin Épidémiologique Santé Animale et Alimentation - DGAL - Anses*, 79, 18–21.
- Hartup, B. K., & Kollias, G. V. (1999). Field investigation of *Mycoplasma gallisepticum* infections in house finch (*Carpodacus mexicanus*) eggs and nestlings. *Avian Diseases*, 43(3), 572–576. <http://doi.org/10.2307/1592658>
- Jarquin, R., Schultz, J., Hanning, I., & Ricke, S. C. (2009). Development of a real-time polymerase chain reaction assay for the simultaneous detection of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* under industry conditions. *Avian Diseases*, 53, 73–77. <http://doi.org/10.1637/8445-080808-Reg.1>
- Kempf, I. (1998). DNA amplification methods for diagnosis and epidemiological investigations of avian mycoplasmosis. *Avian Pathology*, 27, 7–14. <http://doi.org/10.1080/03079459808419268>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Niyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <http://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Lauerman, L. H. (1998). *Mycoplasma* PCR assays. In *Nucleic acid amplification assays for diagnosis of animal diseases* (pp. 41–48). American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians.
- Lecis, R., Chessa, B., Cacciotto, C., Addis, M. F., Coradduzza, E., Berlinguer, F., Muzzeddu, M., Lierz, M., Carcangiu, L., Pittau, M., & Alberti, A. (2010). Identification and characterization of novel *Mycoplasma* spp. belonging to the hominis group from griffon vultures. *Research in Veterinary Science*, 89(1), 58–64. <http://doi.org/10.1016/j.rvsc.2009.12.016>
- Levisohn, S., & Kleven, S. H. (2000). Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*). *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 19(2), 425–442. PMID: 10935272
- Ley, D. H., Hawley, D. M., Geary, S. J., & Dhondt, A. A. (2016). House finch (*Haemorrhous mexicanus*) conjunctivitis, and *Mycoplasma* spp. isolated from North American wild birds, 1994–2015. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(3), 669–673. <http://doi.org/10.7589/2015-09-244>
- Lierz, M., Hagen, N., Hemadéz-Divers, S. J., & Hafez, H. M. (2008). Occurrence of mycoplasmas in free-ranging birds of prey in Germany. *Journal of Wildlife Diseases*, 44(4), 845–850. <http://doi.org/10.7589/0090-3558-44.4.845>
- Luttrell, M. P., Stallknecht, D. E., Kleven, S. H., Kavanaugh, D. M., Corn, J. L., & Fischer, J. R. (2001). *Mycoplasma gallisepticum* in house finches (*Carpodacus mexicanus*) and other wild birds associated with poultry production facilities. *Avian Diseases*, 45(2), 321. <http://doi.org/10.2307/1592971>
- Michiels, T., Welby, S., Vanrobaeys, M., Quinet, C., Rouffaer, L., Lens, L., Martel, A., & Butaye, P. (2016). Prevalence of *Mycoplasma gallisepticum* and *Mycoplasma synoviae* in commercial poultry, racing pigeons and wild birds in Belgium. *Avian Pathology*, 45(2), 244–252. <http://doi.org/10.1080/03079457.2016.1145354>
- Mikaëlian, I., Ley, D. H., Claveau, R., Lemieux, M., & Bérubé, J.-P. (2001). Mycoplasmosis in evening and pine grosbeaks with conjunctivitis in Quebec. *Journal of Wildlife Diseases*, 37(4), 826–830. <http://doi.org/10.7589/0090-3558-37.4.826>
- Oaks, J. L., Donahoe, S. L., Rurangirwa, F. R., Rideout, B. A., Gilbert, M., & Virani, M. Z. (2004). Identification of a novel *Mycoplasma* species from an oriental white-backed vulture (*Gyps bengalensis*). *Journal of Clinical Microbiology*, 42(12), 5909–5912. <http://doi.org/10.1128/JCM.42.12.5909-5912.2004>
- OIE. (2019). Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*). In *Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals* (pp. 844–859).
- Peris, S., Motis, A., Martínez-Vilalta, A., & Ferrer, X. (1991). Winterquartiere und Winterbestand des Stars (*Sturnus vulgaris*) in Spanien während der letzten 30 Jahre—Number and distribution of wintering Starlings (*Sturnus vulgaris*) in Spain for the last 30 years. *Journal of Ornithology*, 132(4), 445–449. <http://doi.org/10.1007/BF01640385>
- Plateforme ESA. (2021). BHVSI-SA: semaine du 03 au 09/05/2021 (pp. 5–16). Plateforme ESA. Retrieved from Plateforme ESA website: <https://www.plateforme-esa.fr/>
- Ramírez, A. S. (2019). Characterization of *Mycoplasma gallisepticum*-like strains isolated from sea birds: Implications for MG diagnostics. Oral communication presented at the International Symposium on Avian Mycoplasmosis and Infectious Coryza (ISMC 2019), Leusden, Netherlands.
- Raviv, Z., & Kleven, S. H. (2009). The development of diagnostic real-time Taqman PCRs for the four pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Diseases*, 53, 103–107. <http://doi.org/10.1637/8469-091508-Reg.1>
- Robinson, R. A., Sriwardena, G. M., & Crick, H. Q. P. (2005). Status and population trends of Starling *Sturnus vulgaris* in Great Britain. *Bird Study*, 52(3), 252–260. <http://doi.org/10.1080/000636505009461398>
- Sawicka, A., Durkalec, M., Tomczyk, G., & Kurska, O. (2020). Occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds: A systematic review and

- meta-analysis. *PLoS One*, 15(4), e0231545. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0231545>
- Sergeant, E. S. G. (2018). EpiTools epidemiological calculators. Ausvet Pty Ltd. Retrieved from <http://epitools.ausvet.com.au>
- Sørensen, J. T., Edwards, S., Noordhuizen, J., & Gunnarsson, S. (2006). Animal production systems in the industrialised world. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, 25(2), 493–503.
- Stallknecht, D. E., Luttrell, M. P., Fischer, J. R., & Kleven, S. H. (1998). Potential for transmission of the finch strain of *Mycoplasma gallisepticum* between house finches and chickens. *Avian Diseases*, 42(2), 352. <http://doi.org/10.2307/1592485>
- Sumithra, T. G., Chaturvedi, V. K., Susan, C., Siju, S. J., Rai, A. K., Harish, C., & Sunita, S. C. (2013). Mycoplasmosis in wildlife: A review. *European Journal of Wildlife Research*, 59(6), 769–781. <http://doi.org/10.1007/s10344-013-0769-9>
- Tatusova, T., DiCuccio, M., Badretdin, A., Chetvernin, V., Nawrocki, E. P., Zaslavsky, L., Lomsadze, A., Pruitt, K. D., Borodovsky, M., & Ostell, J. (2016). NCBI prokaryotic genome annotation pipeline. *Nucleic Acids Research*, 44(14), 6614–6624. <http://doi.org/10.1093/nar/gkw569>
- Thornton, P. K. (2010). Livestock production: Recent trends, future prospects. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), 2853–2867. <http://doi.org/10.1098/rstb.2010.0134>
- Tully, J. G. (1995). Culture medium formulation for primary isolation and maintenance of mollicutes. In (S. Razin & J. G. Tully Eds.), *Molecular and diagnostic procedures in mycoplasmaology* (pp. 33–39). San Diego, CA: Academic Press. <http://doi.org/10.1016/B978-012583805-4/50005-4>
- Van De Wiele, A., Humeau, A., Bronner, A., Guillemain, M., Le Loc'h, G., Guérin, J.-L., Guérin, J.-L., Cauchard, J., Mercier, A., & Calavas, D. (2017). Épisode H5N8 d'influenza aviaire en France en 2016–2017: Quel rôle pour la faune sauvage? *Bulletin Épidémiologique Santé Animale et Alimentation - DGAL - Anses*, 79, 27–31.
- Vayssier-Taussat, M., Albina, E., Citti, C., Cosson, J.-F., Jacques, M.-A., Lebrun, M.-H., Loir, Y. L., Ogliastra, M., Petit, M., Roumagnac, P., & Candresse, T. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: New concepts in the light of meta-omics. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4, 1–7. <http://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00029>
- Wick, R. R., Judd, L. M., Gorrie, C. L., & Holt, K. E. (2017). Unicycler: Resolving bacterial genome assemblies from short and long sequencing reads. *PLoS Computational Biology*, 13(6), e1005595. <http://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1005595>
- Yavari, C. A., Ramirez, A. S., Nicholas, R. A. J., Radford, A. D., Darby, A. C., & Bradbury, J. M. (2017). *Mycoplasma tullyi* sp. nov., isolated from penguins of the genus *Spheniscus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(10), 3692–3698. <http://doi.org/10.1099/ijsem.0002052>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics*, 13, 134. <http://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>

SUPPORTING INFORMATION

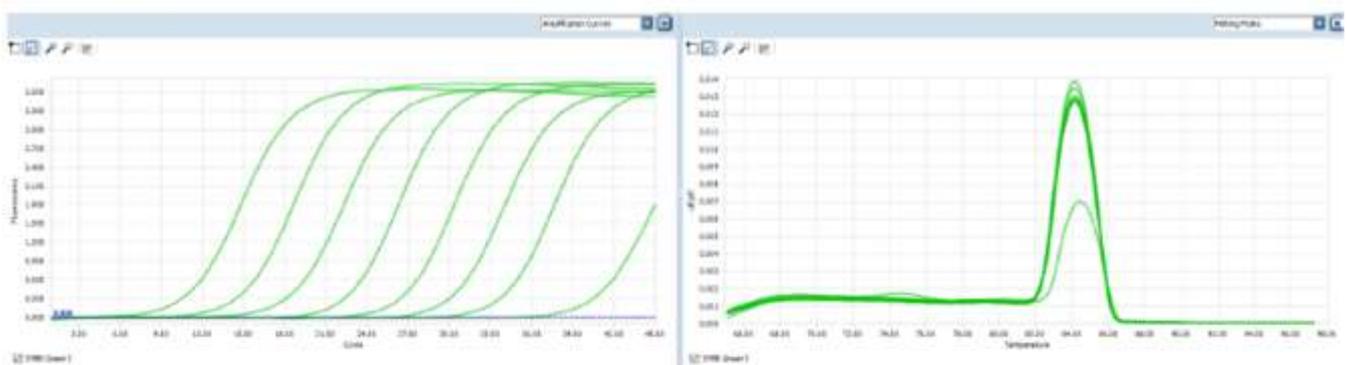
Additional supporting information may be found in the online version of the article at the publisher's website.

How to cite this article: Le Gall-Ladevèze, C., Nouvel, L.-X., Souvestre, M., Croville, G., Hygonenq, M.-C., Guérin, J.-L., & Le Loc'h, G. (2021). Detection of a novel enterotropic *Mycoplasma gallisepticum*-like in European starling (*Sturnus vulgaris*) around poultry farms in France. *Transboundary and Emerging Diseases*, 1–12. <https://doi.org/10.1111/tbed.14382>

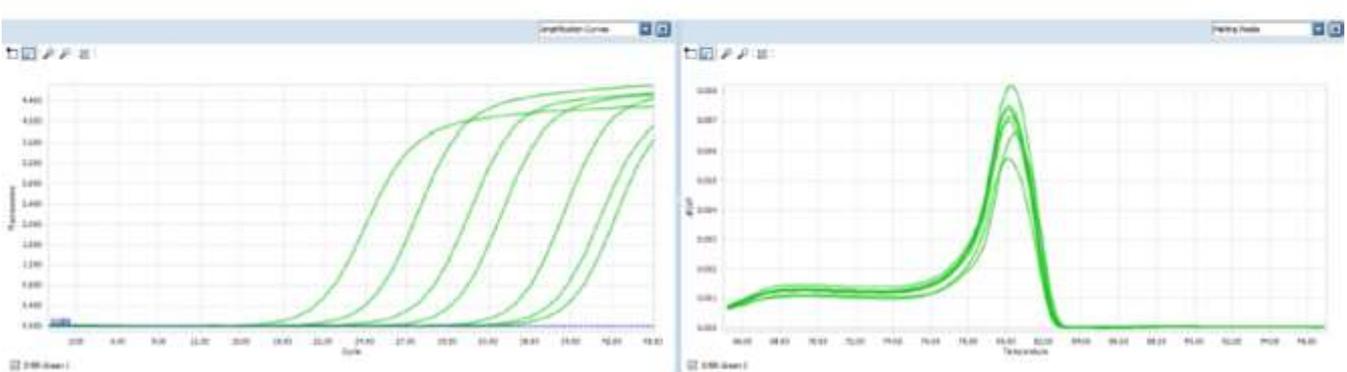
Appendix S1 – Profiles of SYBR Green rtPCR results for validation runs on **(A)** *mgc2* target sequence (*mgc2-2-F/mgc2-2-R* (García et al., 2005)) and **(B)** “*mgc2*-like” target sequence (*mgc2L-F/mgc2L-R* (this study)). Thermocycling programs were the same for both primer pairs: pre-incubation step of 5min at 95°C, 45 amplification cycles of 10s at 95°C, 15s at 55°C and 15s at 72°C, and a melting analysis phase of 10s at 95°C, 1min at 65°C then heating to 97°C with continuous acquisition (5 readings per degree Celsius).

Curves are fluorescence signals from serial ten-fold dilutions (10 to 10⁸ copies/μL for **A**, 10² to 10⁸ copies/μL for **B**) of control plasmid with the specific insert for each primer pair. On the left amplification curves, on the right melting peaks.

A

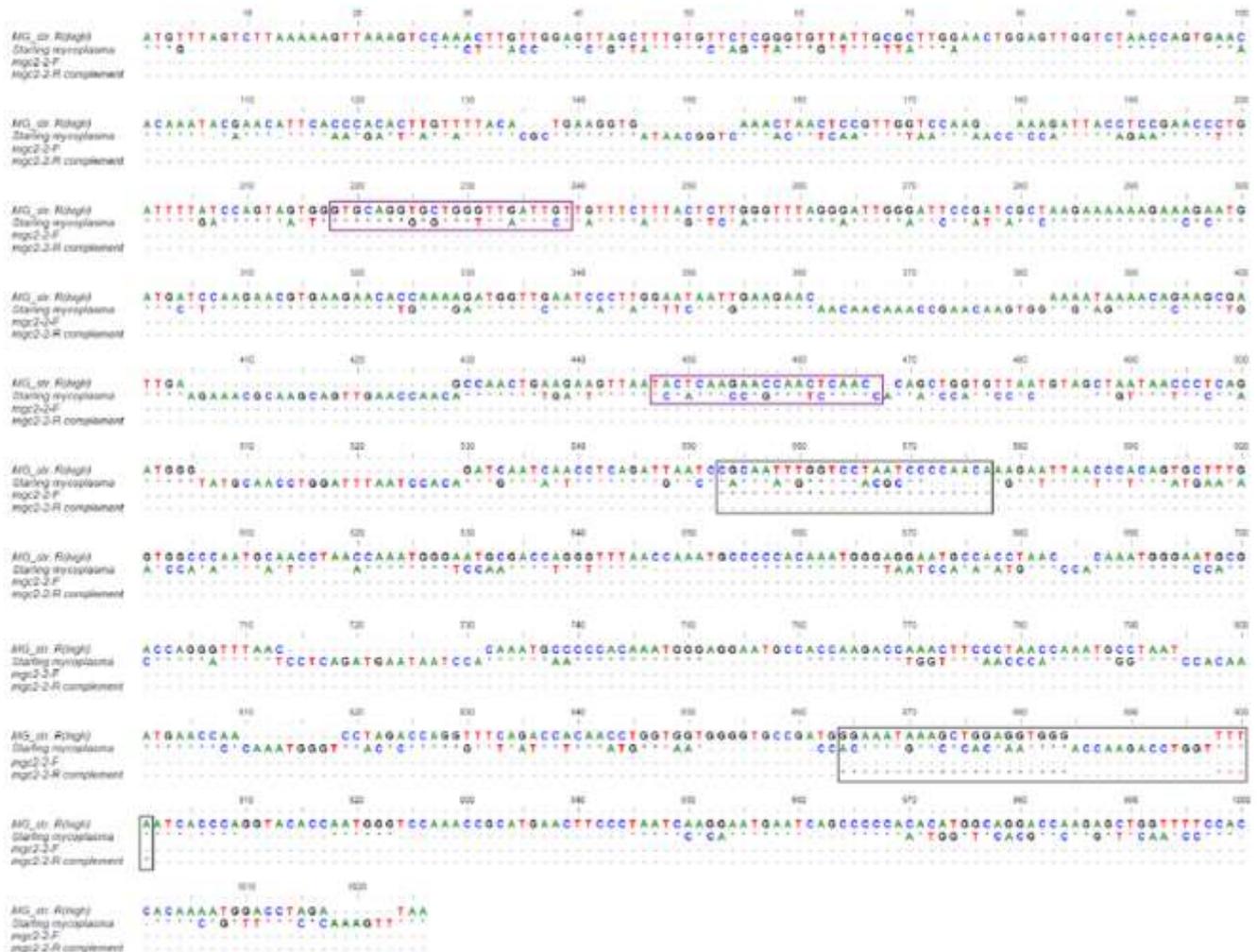


B



Appendix S2 – *mgc2* adhesin sequence of MG strain R(high) aligned with its homologous sequence

“*mgc2*-like” on Starling mycoplasma genome. Binding sites of conventional diagnostic primers for MG specific confirmation *mgc2*-2-F/*mgc2*-2-R (García et al., 2005) are framed in black. Binding sites of specifically designed primers for Starling Mycoplasma detection are framed in bold purple.



Appendix S3 – 16S rRNA sequences alignment of Starling mycoplasma and MG strain R(high). Binding

sites of conventional diagnostic primers for MG detection MG14F/MG13R (Lauerman, 1998) are

framed in black.



c. Conclusion

Cette première étude microbiologique et épidémiologique a évalué la diffusion d'un mycoplasme inconnu et apparemment non pathogène à l'interface sauvage-domestique autour du Gers. Cette nouvelle espèce de bactérie est proche d'une espèce pathogène répandue chez les volailles galliformes, et sa prévalence d'excrétion fécale élevée chez les étourneaux sansonnets commensaux des élevages de la région suggère une pression infectieuse importante dans l'environnement des volailles. Connaissant la capacité d'échanges de gènes horizontaux de certains mycoplasmes (Citti et al., 2020, 2018), des coinfections avec son proche parent MG (détecté dans les volailles de basses-cours de la région) pourraient éventuellement mener à des changements de pathogénicité ou de tropisme de l'une ou l'autre espèce. Bien qu'aucune détection de ce mycoplasme n'ait été obtenue dans les élevages commerciaux ou familiaux de la région étudiée, suggérant une relative spécificité d'hôte, un individu de bergeronnette grise sympatrique des étourneaux a présenté une légère excrétion fécale également. Ce résultat laisse supposer que des échanges infectieux sont au moins possibles entre espèces de l'avifaune commensale des élevages. Il est donc aussi très probable que certains agents infectieux moins spécifiques d'hôtes puissent de la même manière être échangés avec les volailles élevées en plein air exposées à l'avifaune. La recherche de MG et des espèces apparentées parmi les nombreuses espèces aviaires domestiques et sauvages étudiées a en outre révélé la présence d'autres souches non identifiées mais distinctes de MG et du nouveau mycoplasme, chez les étourneaux, hérons garde-bœufs et volailles de basse-cour. Les circulations infectieuses à l'interface avifaune-élevages menant à d'éventuels transferts de gènes ainsi qu'à de possibles faux positifs pour la détection MG par les protocoles courants pourraient donc aussi impliquer d'autres souches de mycoplasmes. Cependant, parmi les nombreuses espèces aviaires étudiées le tropisme d'hôte du nouveau mycoplasme décrit semble centré sur les étourneaux, ce qui n'en fait pas un très bon marqueur de transmissions à l'interface avifaune-élevages dans le contexte général de notre étude.

II. Étude épidémiologique longitudinale de différents agents infectieux aviaires dans les compartiments sauvage et domestique autour d'un élevage avicole plein air

a. Introduction

Dans la suite de l'étude de l'interface sauvage-domestique sur l'élevage de canards du Gers, l'efficacité des interactions et contacts objectivés pour former de potentielles voies de transmission infectieuses devait être vérifiée par l'étude comparée des portages infectieux (Caron et al., 2015, 2014). Les études ornithologiques par recensement des populations et caractérisation des interactions ont permis d'identifier quelques espèces d'intérêt épidémiologique particulier qui devaient donc être *a priori* ciblées pour les prélèvements biologiques. Cependant, les prélèvements de passereaux étant réalisés sur des individus capturés par la méthode de filets japonais présentée précédemment, toutes les espèces incidemment capturées par cette méthode peu sélective mais fastidieuse (FAO, 2007; Whitman et al., 1997) ont pu être prélevées. Il était en effet important d'optimiser le temps investi pour les captures et la disponibilité d'un grand nombre d'individus d'espèces variées pour collecter des prélèvements qui permettraient d'évaluer plus largement le profil infectieux de la communauté d'avifaune commensale de l'élevage. Afin de cibler les hérons garde-bœufs difficilement capturables mais grégaires, la méthode choisie pour un moindre temps et un moindre coût supplémentaires a été la collecte de fèces fraîches en zone de repos (Coombe et al., 2021; Torrontegi et al., 2019). Ce profil infectieux du compartiment sauvage a été ensuite comparé à celui des canards de l'élevage, ainsi qu'à l'environnement des parcours, afin d'identifier d'éventuelles similitudes de souches microbiologiques entre ces compartiments suggérant l'existence d'échanges infectieux directs ou par l'environnement. L'épidémiologie des VIA étant la motivation initiale de cette étude, ceux-ci ont été recherchés en priorité, par détection directe (RT-qPCR) pour évaluer l'excrétion ou le portage et ainsi la capacité de transmission. Les infections à VIA ont aussi été recherchées dans l'avifaune par détection indirecte (sérologie) afin de cibler une fenêtre temporelle d'infection plus large pour ces virus brièvement excrétés chez ces espèces non réservoirs. Pour augmenter les chances de détecter les éventuelles transmissions, la recherche a été ciblée en complément sur d'autres agents infectieux plus robustes que les VIA en termes de durée, de charge excrétée et de prévalence. En plus de cette recherche multi-ciblée d'agents infectieux, les chances de détection ont été optimisées par l'usage de divers types de prélèvements complémentaires, à la fois chez les hôtes sauvages (écouvillons cloacaux et oropharyngés, fèces, sérum) et chez les canards domestiques (écouvillons cloacaux et oropharyngés), ainsi que dans l'environnement des parcours constituant la zone d'interface directe (eaux et boues de surface, chiffonnettes).

b. Matériel et méthodes

Prélèvements biologiques sur l'avifaune commensale

Les prélèvements ciblés sur les espèces commensales de l'élevage se sont déroulés de juillet 2019 à mars 2021, en 11 sessions de 3 jours en moyenne. Les oiseaux ont été capturés par la méthode de filets japonais décrite précédemment, positionnés le long des haies et bâtiments (ciblant les moineaux, pinsons, rougegorges, merles), ainsi qu'en milieu ouvert (ciblant les bergeronnettes grises) (Figure 29b). Les tourterelles turques étaient aussi partiellement ciblées par ces filets, mais leur activité plus en hauteur dans les grands arbres a obligé à tester d'autres techniques de capture : agrainage (grains de maïs et tournesol le long des filets) pour qu'elles s'approchent des filets et système de cage en V agrainée (Figure 34).



Figure 34 - Illustration de la cage en V utilisée pour cibler les tourterelles turques.

La cage est positionnée en milieu ouvert à la vue des oiseaux, le sol est couvert de grains de maïs et tournesol. Les oiseaux attirés par ces grains pourront entrer par l'ouverture du toit en V, et seront piégés dedans au moment de ressortir. En phase de test le temps que les oiseaux s'y habituent la porte était maintenue ouverte pour ne pas les piéger.

Ce système de cage ayant montré une efficacité nulle sur les quelques mois d'utilisation, et les tourterelles n'étant pas prioritaires dans les espèces cibles, il a été décidé de se concentrer uniquement sur les captures au filet par la suite (Figure 35). Les oiseaux étaient ainsi capturés en continu du lever au coucher du soleil, et durant les trois jours de sessions, hors météo pluvieuse ou venteuse (risques de mortalité ou blessure). Les filets étaient relevés toutes les 30 min, et les individus capturés ramenés dans des sacs individuels en tissu opaque à la station de travail, disposée en position centrale selon les emplacements des filets. À la station, les oiseaux étaient identifiés et mesurés, et ils étaient marqués individuellement par une bague métallique du MNHN (Figure 35) permettant de ne pas prélever deux fois un individu recapturé au cours d'une même session, et permettant une traçabilité du statut infectieux des individus lors de recaptures successives. Ensuite, des prélèvements d'écouvillons oropharyngés et cloacaux étaient réalisés, ainsi qu'un prélèvement sanguin de 100 μ L sur les individus d'au moins 11 g en bon état physiologique (soit moins de 10% du volume sanguin) (Figure 35). Ce volume minimal était nécessaire pour obtenir au moins 20 μ L de sérum pour réaliser les tests sérologiques ultérieurs. Les petites espèces (typiquement les pouillots, roitelets, mésanges à longue-queue) ou celles montrant des signes importants

de stress à la manipulation (pinsons) n'ont donc pas eu de prélèvements sanguins. Les prélèvements cloacaux ont aussi été parfois remplacés pour les espèces trop petites ou en période de reproduction (protubérance cloacale, œuf proche du cloaque) par une méthode alternative de collecte de fientes. Les oiseaux étaient alors laissés 10 min au calme dans un sac en papier dont le fond était couvert d'une surface en plastique à usage unique ainsi que d'une grille évitant l'étalement des fientes au fond (Figure 35). Les individus prélevés étaient ensuite immédiatement relâchés, ou bien après un repos en sac en tissu de 5 à 10 min si du sang avait été prélevé pour surveiller leur rétablissement et assurer un relâcher en bonne santé.

En complément de l'avifaune capturée, et pour obtenir des prélèvements des hérons garde-bœufs non ciblés par les captures aux filets, une méthode alternative de collecte de fèces a été mise en place. En effet, un groupe de plusieurs centaines d'individus était observé régulièrement mais brièvement sur l'élevage au lever du jour en hiver (variablement selon les conditions climatiques entre octobre et février). L'observation de leur provenance le matin et le soir ainsi que les discussions avec les exploitants de l'élevage ont permis d'identifier le dortoir où le groupe se rassemblait durant les mois d'hiver, sur un îlot d'étang privé à 2 km de l'élevage. À chaque visite suivante et si le dortoir était occupé, une bâche propre a donc été disposée au sol sur l'îlot, sur laquelle les fientes fraîches individualisées étaient collectées le lendemain matin à l'aide d'écouvillons (Figure 35).



Figure 35 - Illustration des méthodes de prélèvement sur l'avifaune commensale de l'élevage d'étude.

Chaque écouvillon, qu'il soit oropharyngé, cloacal ou de fiente, était immédiatement repris dans 300 µL de tampon phosphaté stérile (PBS 1X) en microtube, puis mis sur glace (froid positif en glacière puis réfrigérateur). Ils étaient conservés ainsi au plus trois jours jusqu'à arriver au laboratoire, où ils étaient traités immédiatement ou bien conservés à -80 °C avant traitement au plus quelques semaines plus tard. Les prélèvements sanguins étaient immédiatement versés en microtube stérile sec, et laissés entre 15 et 25 °C stables et verticaux le temps de coaguler 3 à 4 heures. Les tubes de sang coagulé étaient ensuite conservés sur glace jusqu'à la séparation des sérums au laboratoire, au plus trois jours après. Les sérums transférés étaient ensuite conservés à -20 °C jusqu'à leur analyse quelques jours à quelques mois plus tard.

Prélèvements de l'environnement des parcours

En complément des prélèvements issus de l'avifaune, des prélèvements environnementaux sur l'ensemble des parcours extérieurs occupés par des canards ont été réalisés à la fin de chaque session de captures. L'accès aux parcours se faisait en respectant les protocoles de biosécurité de l'élevage, et une paire de gants à usage unique était utilisée pour chaque parcours différent. Sur chacun d'eux, un mélange de 50 mL d'eau provenant des flaques (accessibles aux canards) et de trois abreuvoirs étaient collectés à l'aide d'un tube en plastique stérile, et une chiffonnette (compresse stérile humidifiée) était frottée sur l'ensemble des surfaces sèches peu souillées comme les toits des mangeoires (utilisées pour distribuer le grit), ou les bordures des abreuvoirs (Figure 36). Celle-ci était ensuite placée en pot stérile avec 20 mL de PBS 1X. Les prélèvements environnementaux étaient conservés sur glace jusqu'à leur utilisation au laboratoire. Un prétraitement leur était alors appliqué afin d'extraire une première fraction des particules minérales et organiques pouvant affecter mécaniquement et chimiquement la conservation des acides nucléiques et inhiber les réactions de PCR. Cette étape permettait aussi de concentrer les ARN et ADN d'intérêt dans des volumes restreints à quelques centaines de microlitres. Ainsi, les chiffonnettes reprises une nuit au froid positif sous agitation douce dans leur PBS étaient pressées avec des gants stériles dans leur pot individuel afin d'en extraire un maximum de liquide chargé en matière organique. Ces liquides de chiffonnettes et les prélèvements d'eaux bien homogénéisés ont ensuite été soumis à une étape de séparation chimique des acides nucléiques et des particules solides par saturation des surnageants d'eaux ou de chiffonnettes en sels phosphatés : NaHPO_4 et Na_2HPO_4 à 1,97 g/L et 14,7 g/L respectivement (Taberlet et al., 2012). Les liquides ont alors été homogénéisés au froid positif durant 15 à 30 min, avant d'être centrifugés (4 000 rpm pendant 5 min) pour séparer les particules solides des molécules d'ADN et ARN en suspension dans le surnageant. Ces surnageants saturés en sels ont alors été filtrés à l'aide de filtres stériles à membrane en PES de pores de 0,22 µm, par aspiration sous vide (Figure 36). La membrane ainsi concentrée en matériel biologique a ensuite été coupée en deux de façon stérile, et chaque demi-membrane placée dans un tube à billes en céramique avec 1 mL de PBS pour être broyée (Figure 36). Après une brève centrifugation (3 000 rpm pendant 1 min), 500µL de surnageant de broyat

a été extrait pour être traité et analysé. La mise au point de cette méthode de prétraitement pour s'adapter aux types de prélèvements étudiés est développée plus loin dans un paragraphe spécifique (*Détection moléculaire des espèces sauvages dans l'environnement extérieur d'un élevage avicole plein air - p 213*).



Figure 36 - Illustration des méthodes de collecte et prétraitement des prélèvements environnementaux sur l'élevage d'étude.

Prélèvements des canards mulards de l'élevage

Enfin, les canards domestiques de l'élevage ont été prélevés en complément de l'avifaune et de l'environnement. Les lots en fin de croissance prêts à partir en engraissement devant être soumis à des prélèvements pour autocontrôle libératoire des VIAFP (DGAL, 2021a, 2018), les écouvillons cloacaux et trachéaux sur 20 individus par lot ont été parfois dupliqués par le vétérinaire sanitaire afin de nous en faire parvenir. Ceux-ci étaient conservés secs à -20°C quelques semaines avant d'être récupérés puis reconditionnés au laboratoire comme ceux de l'avifaune en PBS 1X.

c. Publications scientifiques

La suite et les détails des méthodes de traitement et d'analyses microbiologiques, les méthodes d'analyses épidémiologiques, ainsi que les résultats de ces travaux sont présentés et discutés dans l'article scientifique suivant, prévu pour être soumis dans les semaines à venir à la revue *Science of the Total Environment*.

Les premiers résultats ont également fait l'objet de communications en conférences :

- une présentation de poster en ligne à la conférence *18th Ecology and Evolution of Infectious Diseases (online) meeting* du 14 au 17 juin 2021 (Le Gall-Ladevèze, 2021c) (Annexe D).
- une présentation orale associée à un article aux *14èmes Journées de la Recherche Avicole et palmipèdes à foie Gras*, les 09 & 10 mars 2022 à Tours (Le Gall-Ladevèze, 2022) (Annexe E).

Surveillance of common viral and bacterial agents to assess transmission routes of Avian Influenza Viruses at the wild-domestic interface on a free-range duck farm

Chloé Le Gall-Ladevèze¹, Benjamin Vollot², Laëtitia Lèbre¹, Rachid Aaziz³, Karine Laroucau³, Jean-Luc Guérin¹, Julien Cappelle^{4,5}, Guillaume Le Loc'h¹

1. IHAP, ENVT, INRAE, Université de Toulouse, Toulouse, France
2. Independent researcher, Aigues-Vives, France
3. Bacterial Zoonoses Unit, Animal Health Laboratory, University Paris-Est, Anses, Maisons-Alfort, France
4. ASTRE, CIRAD, INRAE, Université de Montpellier, Montpellier, France
5. CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France

Abstract

Recent outbreaks of highly pathogenic avian influenza in Europe have questioned the epidemiological role of commensal wild birds around free-range poultry farms. The aim of this study was to assess prevalence and dynamics of avian influenza viruses and other common infectious agents in commensal wild birds, and to evaluate possible transmission events at the wild-domestic interface. For this purpose, a longitudinal surveillance study was implemented around a free-range duck farm in southwest France. From 2019 through 2021, commensal wild birds were captured and sampled for blood and oral and cloacal swabs on the farm. In addition, fresh feces from flocks of cattle egrets visiting the farm were collected. In parallel, domestic ducks were sampled by tracheal and cloacal swabs, and environmental samples were collected in outdoor foraging areas of the duck farm. Shedding of avian influenza viruses, avulaviruses, coronaviruses and chlamydia were tested by broad spectrum PCR, and immunity against avian influenza and Newcastle disease (avulavirus) were tested by ELISA serology. Over 1936 swabs and 910 sera, 25 wild birds were found seropositive for avian influenza (2.75%) and 9 by PCR (0.46%), with no significant temporal trend. Beside, ducks and their environment showed conjointly frequent influenza infection (39% of tested flocks), mostly identified as H6 subtype, while positive wild birds were all negative for this subtype. As expected, prevalence values were lower for avulaviruses, with four seropositive wild birds (0.44%), and no molecular detection in wild birds, ducks and their environment. No detection of coronaviruses was obtained in wild birds, while ducks and their environment were repeatedly found infected with Duck coronavirus 2714 (29% of flocks). Finally, nine wild birds were found to shed chlamydia (0.46%), with four identified as avian *Chlamydia abortus*, while ducks and their

environment were often found infected with classical duck strain of *C. psittaci* (47% of flocks). In the end, detections and identifications of infectious agents in wild birds seemed unrelated to those of domestic ducks despite heavy excretion loads from these flocks in the environment. This study overall suggests a very low transmissibility of avian infectious agents at the wild-domestic interface in this context, and highlights the limited contribution of commensal wild birds in comparison with free-range poultry to the global microbiological pressure on avian communities.

1. Introduction

The past decades have seen increasing emergence, re-emergence and spread of animal pathogenic infectious agents, mainly viruses and bacteria (Cleaveland et al., 2007; K. E. Jones et al., 2008; Morens & Fauci, 2020). These changes in diseases ecology can be attributed to human activities, particularly agricultural practices and environment modifications that favour contacts between hosts, especially wildlife and livestock (Cleaveland et al., 2001; Engering et al., 2013; B. A. Jones et al., 2013; Morand, 2020; Plowright et al., 2008). Among emerging agents, Avian Influenza viruses (AIV) present zoonotic and highly pathogenic strains (HPAIV) with broad capacities of mutation and reassortment enabling shifts in host range and pathogenicity (Swayne, 2008). Natural reservoirs of AIV are water birds (Anseriformes, Charadriiformes) (Munster & Fouchier, 2009), including numerous long-distance migrants that can host and spread viral strains between continents (Gaidet et al., 2010; Mine et al., 2019; Munster et al., 2007; The Global Consortium for H5N8 and Related Influenza Viruses, 2016).

Southwest France, in particular its duck production sector, was deeply affected by three highly pathogenic avian influenza (HPAI) epizooty in the last years (EFSA et al., 2017, 2021; Le Bouquin et al., 2016). The region is rich in free-range farms breeding Anseriformes (ducks and geese) and Galliformes (chicken, guinea fowls, quails). This type of production has been showed to be a risk factor for HPAI introduction in some contexts, probably mainly due to increased exposure to wild birds (Bergervoet et al., 2019; Bouwstra et al., 2017; Central Veterinary Institute, Wageningen University et al., 2017; Koch & Elbers, 2006; Velkers et al., 2020). As few contacts with wild waterfowl are recorded in poultry farms of the region, the role of commensal birds in HPAIV transmissions was investigated around farm outbreaks in southwest France (Anses, 2016; Van De Wiele et al., 2017). Indeed, the susceptibility of non-aquatic commensal birds for AIV and other pathogenic agents of poultry has been evidenced (Brown et al., 2009; Burt et al., 2018; Dhondt et al., 2008; Ley et al., 2016; Nemeth et al., 2010). They could then play a role in the epidemiology of AIV or other avian infectious agents, if not as reservoirs (Caron et al., 2017; Slusher et al., 2014) as local maintenance population or as bridge hosts between farms and wetlands (Caron et al., 2015).

Beside AIV, other infectious agents follow similar transmission routes and can be shared by the same interactions at the wild-domestic interface. As the focus of this study was free-range ducks, viral and bacterial agents that are commonly hosted by wild or domestic ducks were studied in parallel with AIV. The host range of these infectious agents had also to include both ducks and terrestrial commensal birds. Among viruses sharing epidemiological and ecological similarities with AIV (Ramírez-Martínez et al., 2018; Wille et al., 2015), viruses of the Avulavirinae sub-family (including Newcastle disease virus) present various genotypes that are detected in a very broad range of bird species and at the wild-domestic interface (Cardenas Garcia et al., 2013; Dimitrov et al., 2016; Hirschinger et al., 2020; Karamendin et al., 2020; Kim et al., 2012). Similarly, viruses of the Orthocoronavirinae sub-family belonging to the Gammacoronavirus (including Infectious bronchitis virus) and Deltacoronavirus genera can also infect a wide diversity of birds and can be found at the wild-domestic interface (Cavanagh, 2005; Pauly et al., 2019; Rahman et al., 2021; Wille & Holmes, 2020; Woo et al., 2012). In addition with the two viral taxa, bacteria of the genus *Chlamydia* are similarly broadly distributed in species and geography, with high asymptomatic prevalence values of *Chlamydia psittaci* in wild and domestic ducks (Kaleta & Taday, 2003; Krawiec et al., 2015; Soon et al., 2021; Vorimore et al., 2015).

The aim of this study was to assess temporal prevalence variations and evaluate possible transmission events of infectious agents that can circulate at the wild-domestic interface on a duck farm in southwest France: AIV, avulaviruses, coronaviruses and chlamydia. The longitudinal surveillance study focused on commensal wild birds, duck flocks and the environment of their outdoor foraging areas. To improve detection of transmission routes followed by infectious agents at the wild-domestic interface, multiple types of samples were collected from each compartment of the interface.

2. Methods

2.1. Study site

The study was implemented on a typical duck farm in the department of Gers, southwest France. The surroundings of the farm are an undulating landscape of small mixed crop and stock farms with woods on hills. Although not a wetland area, many artificial water dams of various sizes are dispersed in the surroundings for agricultural use. The farm breeds mule ducks under the 'Canard à Foie Gras du Sud-Ouest' label, which requires at least 14 weeks of unlimited outdoor access. The farm is composed of two small 0.5 ha outdoor foraging areas for ducklings (one day to one month of age), and eight large 1.5 ha foraging areas for growing ducks (one month to 14-16 weeks of age). Like an increasing number of poultry farms in the region, an agroforestry program is implemented on the farm, so trees for wood are planted on all outdoor foraging areas, and hedges of fruit trees are planted around some of the areas.

2.2. Sample collection

2.2.1. Sampling of wild birds

From July 2019 to March 2021, 11 sessions of 3 days of mist-net captures targeting small to medium-sized wild species were performed around outdoor areas of the farm. Each captured bird was banded with a coded metal ring of the Muséum National d'Histoire Naturelle (MNHN), Paris, France for individual identification. A quick visual clinical examination was performed, and swabs (oropharyngeal and cloacal) were collected, in addition with 100µL of blood for healthy birds above 11g (i.e. less than 10% of their blood volume). Captures and manipulations were performed following good veterinary practices with the help of a professional bird-bander, and the protocol was subjected to a mandatory authorization by the MNHN. Swabs were stored in microtubes with 300µL of sterile 1% phosphate-buffered saline (PBS) and kept at +4°C before being frozen at -80°C when received at the laboratory (at most 3 days after sampling). Blood was stored in sterile microtubes 1-3h at +20°C into an isolated box, then kept at +4°C before serum was extracted when received at the laboratory (at most 3 days later).

Cattle egrets (*Bubulcus ibis*) which were observed on the farm (around 200 birds) in winter were sampled on five occasions during the winters 2019-2020 and 2020-2021 on their resting site located 2km away on a small pond. During the day, when they were away for foraging, a large disinfected plastic surface was installed under their roosts and on the following morning individual fresh feces produced during the night were collected using sterile swabs. Those were stored in the same way as previously described for cloacal swabs.

2.2.2. Sampling of duck flocks

As part of French regulatory AIV surveillance, 20 ducks of each flock at 10 weeks of age were randomly selected for swab samplings (tracheal and cloacal) by the sanitary veterinarian of the farm (DGAL, 2016). On five occasions between April 2019 and July 2020, duplicates of these dry swabs were collected and directly sent frozen to -20°C to the laboratory. On reception, they were stored in microtubes with 300µL of sterile 1X PBS and frozen at -80°C.

2.2.3. Sampling of environment

At the occasion of wild bird captures, from October 2019 to December 2020, environmental samples were collected on duck outdoor foraging areas, in the presence of ducks. For each area, 50mL of surface water were sampled in a sterile tube by sampling several water puddles of the whole surface of the area (40mL) and 10mL from 2 to 3 open-air drinkers. In addition, dry horizontal surfaces apparently free from duck feces and where wild birds can be seen perching or walking, were sampled using sterile wipes of gauze moistened with sterile 1X PBS. Most of the time, these surfaces were metallic roofs of feeders, completed when possible (i.e. when not too covered by duck feces) by the concrete border of the duck house. After sampling, wipes were rolled into sterile plastic tubes with 20mL sterile 1X PBS. On each time

environmental samples were collected, negative controls containing only sampling material and PBS were produced. Environmental samples were stored at +4°C in the field, then frozen to -80°C in the laboratory.

2.3. Infectious agent detection and identification

2.3.1. Environmental samples preparation

Wipes into PBS were shaken at 45 movements per min (mpm) overnight at 6°C to dissolve solid organic particles. They were then firmly squeezed to extract the most liquid as possible. Water samples were gently centrifuged to separate larger soil particles at 1,500 rotations per min (rpm) for 2 min.

In order to separate extracellular DNA from particles of soil and organic matter that may inhibit PCR reactions, supernatant of water samples (50mL), as well as 20mL volumes of wipes' supernatants were mixed with saturated phosphate salts (Taberlet et al., 2012). NaH_2PO_4 and Na_2HPO_4 were added in each sample to 1.97g/L and 14.7g/L concentrations, respectively, then shaken at 65mpm for 15-30min at 6°C. Tubes were then centrifuged at 4,000rpm for 5min at 4°C to separate particles from suspended genetic material. Whole volumes of supernatant were then filtered using individual sterile 0.22µm PES vacuum filters (Corning, New York, USA). Each filter membrane was detached from its frame, cut in halves in sterile conditions to be folded into 2mL multi-size ceramic bead tubes (CKMix50-R from Bertin Corp., Rockville, Maryland, USA) with 1mL sterile 1X PBS. Bead tubes were vortexed with a Precellys@24 instrument (Bertin Corp., Rockville, Maryland, USA) for 3 sessions of 30s at 5,500mpm to grind filter membranes and separate genetic materials. They were then centrifuged for 1min at 3,000rpm.

2.3.2. Nucleic acid extractions

Both RNA and DNA extractions from swabs were performed from 150 µL of their supernatant using NucleoMag Pathogen kit (Macherey-Nagel, Dueren, Germany) on a KingFisher Flex robot (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA), following the manufacturer's instructions. For extraction and subsequent analyses, all of the samples were pooled by species or family, sample type (oral, tracheal or cloacal), and time of sampling (5 samples in each pool whenever possible, or from 1 to 6 samples). Nucleic acid extractions from environmental samples followed the same protocol, and were performed from pools of samples of the same time and outdoor area (water and wipes). Negative extraction controls were processed alongside each series of extractions. All extracted nucleic acids were then stored at -80°C until analyses.

2.3.3. Optimization of broad range real-time PCR protocols

To screen swabs, feces and environmental samples for avulaviruses, coronaviruses and chlamydia, broad range one-step RT-qPCR and qPCR were adapted for primer pairs that were previously described in the

literature (Chamings et al., 2018; Ehricht et al., 2006; Tong et al., 2008). To be able to differentiate a wide diversity of strains, protocols were optimized for SYBR Green technology on a LightCycler 96 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland). Optimization process for the three groups of infectious agents are detailed in Appendix 1.

2.3.4. Molecular screening and identification of infectious agents

AIV

One-step RT-qPCR for AIV targeted M gene following a SYBR Green protocol with M52C/M253R primers (Croville et al., 2018). Reactions were processed on duplicate samples as detailed in Appendix 1 Table S1. For each RT-qPCR run, quantification and sensitivity were assessed by ten-fold dilutions of a plasmid construct including the target sequence, from 10 to 10⁴ sequence copies/μL. Because low viral loads were expected on healthy small birds or environmental samples, positive results were considered as showing cycle threshold (Ct) values under 37 cycles (around 10 RNA copies/μL) and a visible melting temperature peak on a 1°C range around positive controls (84.5°C). Other results with a visible fluorescence over 37 cycles or a melting temperature outside of this range were considered suspect. When a pool of swabs was positive, corresponding individual samples were analyzed following the same protocol to obtain individual status.

Positive and suspect samples for the M gene RT-qPCR were submitted to a conventional one-step RT-PCR using Bm-HA-1/Bm-NS-890R primers targeting the whole hemagglutinin (HA) sequence of AIV (Hoffmann et al., 2001), as detailed in Appendix 1 Table S1 (Identification run 1). Products were observed on an agarose gel electrophoresis, and size of bands compared to those of positive controls. If expected-size bands (1800bp) appeared, they were excised and purified using a QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands) following manufacturer's instruction, then sequenced by Sanger technology for typing of the HA sequence. Because expected viral loads were very low, if no band appeared the gel was excised on the expected size and purified, to be submitted to a second run of semi-nested PCR as detailed in Appendix 1 Table S1 (Identification run 2). Products were then observed on an agarose gel electrophoresis, and expected-size bands excised and purified for Sanger sequencing of the HA sequence. Resulting sequences were visualized using BioEdit version 7.0.5.3 (Hall,2011) compared to all AIV database using BLAST online tool (Altschul et al., 1990).

If after the two HA identification runs no amplification or no sequence was obtained, a H6 specific one-step RT-qPCR was ran to check at least for this subtype, because it was identified by Sanger sequencing in duck samples. The primer pair designed and used was H6-928/H6-1251, and the protocol as detailed in Appendix 1 Table S1 (Identification run 3). Positive samples were considered as showing a Ct below 37 cycles and melting temperature peak in a 1°C range from positive plasmid control (82.5°C).

In duck flocks sampled for regulatory AIV surveillance, the standard process of identification was followed by departmental laboratory and National Reference Laboratory (NRL) for AIV at Anses, Ploufragan, France (DGAL, 2016). M gene positive flocks were submitted to a specific RT-qPCR for both H5 and H7 subtypes. Then positive samples for this second test were sequenced for precise HA and NA subtype identification.

Avulaviruses

The adapted one-step RT-qPCR protocol targeting all avulaviruses with AVU-RUB-F1/AVU-RUB-R primers (Tong et al., 2008) was applied to all samples in duplicate as detailed in Appendix 1 Table S1. On each run, quantification and sensitivity were assessed by a plasmid range from 10 to 10⁴ copies/μL. Because the primers showed a high self-complementarity on RT-qPCR runs that interfered with amplification curves (no Ct above 23), positive results were considered as showing in priority a visible melting temperature peak on a 1°C range around positive controls (82°C for NDV class II, 84°C for NDV class I). Other results with a visible fluorescence and a melting temperature outside of this range were considered suspect. When a pool of swabs was positive, corresponding individual samples were analyzed following the same protocol to obtain individual status.

Positive and suspect samples for L gene were confirmed by a second run of semi-nested conventional PCR with primers AVU-RUB-F2/AVU-RUB-R (Tong et al., 2008), as detailed in Appendix 1 Table S1. Products were then observed on an agarose gel electrophoresis, and size of bands compared to those of positive controls. If expected-size bands (200bp) appeared, they were excised and purified as described above, then sequenced by Sanger technology for typing of the variable L gene sequence. Resulting sequences were compared to all Avulaviruses database using BLAST online tool (Altschul et al., 1990).

Coronaviruses

The adapted one-step RT-qPCR protocol targeting all coronaviruses with AC-CoV-F/AC-CoV-R primers (Chamings et al., 2018) was applied to all samples in duplicate as detailed in Appendix 1 Table S1. On each run, quantification and sensitivity were assessed by a plasmid range from 10 to 10⁴ copies/μL. Because low viral loads were expected on healthy small birds or environmental samples, positive results were considered as showing Ct values under 37 cycles (around 10 RNA copies/μL) and a visible melting temperature peak on a 2°C range around positive controls (80-82°C for SARS-CoV-2 plasmid, 81.5°C for vaccinal IBV) to cover a broad range of possible strains. Other results with a visible fluorescence over 37 cycles or a melting temperature outside of this range were considered suspect. When a pool of swabs was positive, corresponding individual samples were analyzed following the same protocol to obtain individual status.

Positive and suspect samples for the polymerase gene were confirmed by a second run of semi-nested conventional PCR with the same primers, as detailed in Appendix 1 Table S1. Products were then

observed on an agarose gel electrophoresis, and size of bands compared to those of positive controls. If expected-size bands (600bp) appeared, they were excised and purified as described above, then sequenced by Sanger technology for typing of the variable polymerase sequence. Resulting sequences were compared to all Coronaviruses database using BLAST online tool (Altschul et al., 1990).

Chlamydia

The adapted qPCR protocol targeting all chlamydia with Ch23S-F/Ch23S-R primers (Ehrlich et al., 2006) was applied to all samples in duplicate as detailed in Appendix 1 Table S1. On each run, quantification and sensitivity of each run were assessed by a plasmid range from 10 to 10³ copies/μL. Samples were tested in duplicate. Because low bacterial loads were expected on healthy small birds or environmental samples, positive results were considered as showing Ct values under 40 cycles (around 1 DNA copy/μL) and a visible melting temperature peak on a 2°C range around positive controls (81°C) to cover a broad range of possible strains. Other results with a visible fluorescence over 40 cycles or a melting temperature outside of this range were considered suspect. When a pool of swabs was positive, corresponding individual samples were analyzed following the same protocol to obtain individual status.

Positive and suspect products from the qPCR were confirmed on an agarose gel electrophoresis, and size of bands compared to those of positive controls. If expected-size bands (180bp) appeared, specific qPCR for *C. psittaci* and *C. abortus* were conducted on positive samples in the NRL for chlamydia at Anses, Maisons-Alfort, France. Samples identified as *C. psittaci* were then subjected to a high resolution melting (HRM) qPCR for broad genotyping, doubled with Sanger sequencing of their *ompA* gene. Samples identified as *C. abortus* were genotyped on their plasmid sequence and by multi-locus sequence typing (MLST) on seven targets, as described in previous studies (Szymańska-Czerwińska et al., 2017).

2.3.5. Serologies for AIV and NDV

For serum preparation, blood tubes were centrifuged at 5,000rpm for 5min at +4°C to separate serum from cell clot. ELISA serologies for AIV and NDV were performed on 10μL of sera using respectively ID Screen® Influenza A Antibody Competition Multi-species (FLUACA) kit and ID Screen® Newcastle Disease Competition (NDVC) kit (Innovative Diagnostics, Grabels, France) following manufacturer's instructions. Samples were considered positive when the competition percentage was below 50% for FLUACA or 70% for NDVC, that is when suspect or positive according to manufacturer, because those kits are not initially optimized for wild birds (Pérez-Ramírez et al., 2010). After the two serological screenings, if enough serum remained from AIV seropositive samples, they were tested for H5 subtype with the ID Screen® Influenza H5 Antibody Competition (FLUACH5) kit (Innovative Diagnostics, Grabels, France). For this specific ELISA, sera were diluted in distilled water to 0.35 to normalize all dilutions with the lowest remaining serum volume. Samples were considered positive when the competition percentage was below 60% (positive or suspect according to manufacturer).

2.4. Epidemiological and statistical analysis

Because some pools from wild birds could not have a positive individual linked to them, and as all positive individuals were the only ones of their pool, all positive pools were approximated to one positive individual. An individual wild bird was then considered positive when either the cloacal or oropharyngeal swab was positive. For duck flocks and environmental samples, as the number of samples was irrespective of the size of the flock (20 ducks, or 50mL of water and a wipe), results were analyzed considering flocks as units instead of individuals. A duck flock was then considered positive when either one cloacal or oropharyngeal swab, or the environmental sample was positive.

Observed prevalence values were corrected for estimated sensitivity (Se) and specificity (Sp) of diagnostic tests used. Influenza A ELISA kit was characterized following manufacturer's documentation as well as a previous publication on various species of wild birds (Pérez-Ramírez et al., 2010). Its Se was then estimated to be 0.9 and its Sp 0.9 in the wild birds sampled for the present study. As no manufacturer's documentation was available for NDV ELISA kit, its characteristics were extracted from a publication on various wild birds (Hirschinger et al., 2021). Its Se was then estimated to be 1 and Sp 0.97. For qPCR and RT-qPCR tests, as they were made most of the time on both oropharyngeal and cloacal swabs of the same individual bird (increasing Se), with a strict confirmation of results, and with a low detection threshold on duplicates, it was considered that they reached 0.99 for Se and 1 for Sp. Estimation of true PCR prevalence and confidence intervals were calculated for each time of sampling using Epitools "Estimated true prevalence" online tool (Sergeant, 2018), following methods from Rogan & Gladen (1978) and Reiczigel et al. (2010) respectively. For serological prevalence, only a Wilson confidence interval on apparent prevalence was calculated following methods from Brown et al. (2001), as the estimation of true prevalence was not adapted to low numbers. Resulting prevalence values were numerically compared using R software version 4.0.5 (R Core Team, 2019), and differences between groups of wild birds and between times of sampling were statistically evaluated using chi-square tests with a p-value for significance lower than 0.05.

3. Results

3.1. Sample collection

3.1.1. Sampling of wild birds

Between July 2019 and March 2021, 11 capture sessions on the farm lasted in general 3 consecutive days and resulted in collecting an average of 157 birds by session, with a median of 184, a minimum of 10 (due to a shorter visit of 24h) and a maximum of 256 (Table 1). In total, 1731 wild birds were captured and swabbed by oropharyngeal and cloacal routes. Blood was collected on 910 of them. Captured birds represented 62 species of 24 families and 10 orders (Table 2).

In addition to live-bird swabs, a total of 205 cattle egret feces were collected under night roosts. These samplings were distributed on five occasions: October and November 2019, December 2020 and twice in February 2021 (Table 1). An average of 41 feces were collected on each time point, with a median of 30, a minimum of 25 and a maximum of 70.

3.1.2. Sampling of duck flocks

On ten occasions between April 2019 and July 2020, a total of 240 ducks from 12 flocks were swabbed by tracheal and cloacal routes (Table 1).

3.1.3. Sampling of environment

Environmental samples on duck outdoor areas were collected on seven occasions simultaneously with wild bird captures, between October 2019 and December 2020 (Table 1). A total of 22 areas were sampled, corresponding to 16 different flocks from which 5 were also sampled by swabs.

Table 1 - Distribution of sampling and positive results by time and type of sample. Stars next to some duck flocks indicate that only results of regulatory AIV surveillance were available. Flocks are identified by letters, and figured in bold when sampled several times either by swabs or environmental samples.

Year	Month	Week	Swabs from wild birds	Positive ones	Feces from cattle egrets	Positive ones	Blood from wild birds	Positive ones	Duck flocks sampled	Duck areas sampled	Identification of flocks sampled	Positive ones
2019	April	17							1		A	
	June	23							1 *		B	
		24							2 *		C; D	2 AIV
	July	30	184	1 AIV 1 chlamydia								
	August	35	256	2 AIV 2 chlamydia			121	2 AIV				
	September	37							1 *		E	
		39							1 *		F	
	October	43	240	1 AIV 3 chlamydia	30		142	4 AIV		4	G; H; I; J	1 coronavirus (H)
	November	45							1		G	1 coronavirus
48			184	2 AIV	30		75		2	K; L		
December	52							1		K	1 AIV 1 chlamydia 1 coronavirus	
2020	January	5	225	2 AIV			112	1 AIV		2	M; N	2 AIV 2 chlamydia
	February	8							2		M; N	2 AIV 1 chlamydia (M)
		9		141	2 chlamydia			88	1 AIV 1 NDV		4	M; N; O; P
	May	19							1 *		Q	
		22		168				140	4 AIV		2	Q; R
	July	28							1		S	
	November	46		225	1 chlamydia			147	6 AIV		4	T; U; V; W
December	51		47		70		40	3 AIV 2 NDV		4	T; U; V; W	3 AIV (T; V; W) 4 chlamydia
2021	February	6			25							
		9		51		50	1 AIV	40	3 AIV			
	March	12		10				5				

Table 2 - Description of sampled wild birds by taxonomic group. Passeriformes groups established from Oliveros et al. (2019). All samples are from captured birds, except feces from roosting cattle egrets *Bubulcus ibis* as precised by “(+ 205 feces)” on the corresponding line.

Order	Family	Group code	Species in the group (by decreasing numbers)	Number of swabs (for PCR)	Number of sera (for ELISA)	
Passeriformes	Sylviidae; Acrocephalidae; Alaudidae	SYL	<i>Sylvia atricapilla</i> ; <i>Sylvia borin</i> ; <i>Sylvia communis</i> ; <i>Acrocephalus scirpaceus</i> ; <i>Hippolais polyglotta</i> ; <i>Lullula arborea</i>	169	76	
	Aegithalidae; Phylloscopidae	AEG	<i>Phylloscopus collybita</i> ; <i>Aegithalos caudatus</i> ; <i>Phylloscopus trochilus</i>	142	0	
	Certhiidae; Sittidae; Troglodytidae	CER	<i>Certhia brachydactyla</i> ; <i>Sitta europea</i> ; <i>Troglodytes troglodytes</i>	37	7	
	Corvidae; Oriolidae	COR	<i>Garrulus glandarius</i> ; <i>Oriolus oriolus</i> ; <i>Pica pica</i>	6	3	
	Emberizidae	EMB	<i>Emberiza cirulus</i> ; <i>Emberiza schoeniclus</i>	19	9	
	Fringillidae	FRI	<i>Fringilla coelebs</i> ; <i>Carduelis carduelis</i> ; <i>Chloris chloris</i> ; <i>Coccothraustes coccothraustes</i> ; <i>Fringilla montifringilla</i> ; <i>Linaria cannabina</i> ; <i>Serinus serinus</i>	186	45	
	Hirundinidae	HIR	<i>Hirundo rustica</i> ; <i>Delichon urbicum</i>	3	1	
	Motacillidae		ANT	<i>Anthus pratensis</i> ; <i>Anthus spinoletta</i> ; <i>Anthus trivialis</i>	33	22
			MOT	<i>Motacilla alba</i> ; <i>Motacilla cinerea</i>	91	58
	Muscicapidae	MUS	<i>Erithacus rubecula</i> ; <i>Ficedula hypoleuca</i> ; <i>Phoenicurus ochruros</i> ; <i>Luscinia megarhynchos</i> ; <i>Phoenicurus phoenicurus</i> ; <i>Saxicola rubicola</i> ; <i>Muscicapa striata</i>	289	159	
	Paridae	PAR	<i>Cyanistes caeruleus</i> ; <i>Parus major</i> ; <i>Periparus ater</i>	133	37	
	Passeridae		PASD	<i>Passer domesticus</i>	199	173
			PASM	<i>Passer montanus</i>	206	156
	Prunellidae	PRU	<i>Prunella modularis</i>	35	30	
	Regulidae	REG	<i>Regulus ignicapilla</i> ; <i>Regulus regulus</i>	9	0	
Sturnidae	STU	<i>Sturnus vulgaris</i>	19	11		
Turdidae	TUR	<i>Turdus merula</i> ; <i>Turdus philomelos</i> ; <i>Turdus iliacus</i>	117	100		
Pelecaniformes	Ardeidae	BUB	<i>Bubulcus ibis</i>	1 (+ 205 feces)	1	
Accipitriformes	Accipitridae	ACC	<i>Accipiter nisus</i>	4	4	
Bucerotiformes	Upupidae	UPU	<i>Upupa epops</i>	1	1	
Charadriiformes	Scolopacidae	CHA	<i>Gallinago gallinago</i> ; <i>Larus michahellis</i>	4	3	
Columbiformes	Columbidae	STR	<i>Streptopelia decaocto</i>	2	0	
Coraciiformes	Alcedinidae	ALC	<i>Alcedo atthis</i>	3	1	
Galliformes	Phasianidae	GAL	<i>Phasianus colchicus</i>	1	0	
Piciformes	Picidae	PIC	<i>Picus viridis</i> ; <i>Dendrocopos major</i> ; <i>Jynx torquilla</i>	21	12	
Strigiformes	Strigidae	STRI	<i>Asio otus</i>	1	1	

3.2. Molecular detection and identification of infectious agents

3.2.1. AIV

Overall, M gene were detected in 9 individual (or pooled) wild birds in a total of 1936 individual samples (0.46%) (Table 3). One was from cattle egret feces in February 2021, the eight others were from swabs of captured passerines (Table 1). Those consisted of two *Sylvia atricapilla* oropharynx (in July 2019 and January 2020), two *Passer domesticus* oropharynx (in August and November 2019), one *Motacilla alba* cloaca (in October 2019), one *Anthus sp.* cloaca (in November 2019), one *Fringilla sp.* oropharynx (in January 2020), and one *Muscicapidae* cloaca (in August 2019) (Table 1 and Appendix 2). Viral loads in positive wild bird samples (individuals or pools) resulted in mean Ct values of 34.5. Sequencing and identification of the HA gene from samples of captured passerines was attempted with no success, and all were also negative on the specific H6 RT-qPCR (Appendix 2). The positive cattle egret feces resulted in a 1085bp H5 sequence with no pattern of high pathogenicity (no polybasic sequence in the cleavage site) and the highest identity of 98.14% with the strain A/mallard/Saskatchewan/17/1981(H5N2) (accession number CY178647) on GenBank database. ELISA serologies for AIV from 910 captured passerines detected 24 individuals with antibodies, one being positive on two consecutive months. Infected birds were five *Sylvia atricapilla* (one in August 2019, two in October 2019, and two in May 2020), five *Motacilla alba* (one in October 2019, three in December 2020, and one in February 2021), three *Turdus philomelos* (in October 2019, and May and November 2020), three *Prunella modularis* (two in November 2020 and one in February 2021), two *Passer montanus* (same individual in January and February 2020), two *Luscinia megarhynchos* (in August 2019 and May 2020), two *Erithacus rubecula* (in November 2020), then one *Ficedula hypoleuca* (August 2019), one *Passer domesticus* (November 2020) and one *Accipiter nisus* (February 2021) (Table 1 and Appendix 2). Antibody levels resulted in competition percentages between 9.37 and 49.24 (mean of 31.96), and none of them was positive for H5-specific antibodies.

In duck swabs and environment combined, 9 flocks in 23 were detected positive for M gene RT-qPCR (39.1%) (Table 3). Two were detected from unknown type of swabs for regulatory surveillance in June 2019 and were identified by the NRL as H7N3 (low pathogenic). The other seven positive flocks had more complete data: cloacal swabs from one flock in December 2019, environment then swabs (cloacal and unknown type) and environment again from two flocks in January to February 2020 (weeks 5 to 9), and environment from one flock in November (week 46) then three other flocks in December 2020 (week 51) (Table 1 and Appendix 2). In the end, swabs were positive for five flocks (two in June 2019, one in December 2019, and two in February 2020) and environment for six flocks (two then one in January-February 2020, one in November 2020 and three in December 2020), with two flocks showing positive results in both types of sample (Table 1). Viral loads from all duck samples resulted in lower Ct values

than in wild birds, and slightly higher in environmental samples compared to swabs (respective mean Ct of 33.3 and 32.9). H6 subtype was identified either by sequencing or specific RT-qPCR in all seven M gene positive flocks (Appendix 2). The closest H6 sequence in GenBank database for all duck flock sequences (two from swabs and two from environment) was from the strain A/mallard duck/Georgia/7/2015(H6N1) (accession number MF694213) isolated in central Eurasia, with over 98% identity on 610 to 670bp. One positive swab from one of the two flocks in January-February 2020 also resulted in a different HA sequence (554bp and poor quality) identified as H11 with 91.3% identity to the strain A/Anas platyrhynchos/Belgium/195_7/2018(H11N9) (accession number MT406953) from north-western Europe.

3.2.2. Avulaviruses

None of the samples from the 1936 wild birds and the 17 duck flocks (swabs or environment) were positive for avulaviruses RT-qPCR (Table 1 and Table 3). On the 910 blood samples from wild birds, 4 were seropositive on NDV ELISA, with competition percentages between 41.4% and 69.6% (mean of 58%) (Appendix 2). Two samples were from the same individual, a *Turdus merula* (in January and February 2020), the two others were one *Anthus pratensis* and one *Motacilla alba* (both in December 2020) (Table 1 and Appendix 2).

3.2.3. Coronaviruses

Among the 1936 wild birds' swabs, none was positive for the coronaviruses RT-qPCR (Table 3). However, 5 of the 17 duck flocks were detected positive (29.4%) (Table 3): environment from one in October 2019 (week 43), cloacal swabs from one in November 2019 (week 45), cloacal swabs from one in December 2019 (week 52), then environment from two in November 2020 (week 46) (Table 1 and Appendix 2). In the end, swabs were positive for two flocks (cloacal ones only, in November and December 2019), and environment was positive for three flocks (in October 2019 and November 2020), with no flock showing both types of positive sample (Table 1). Mean Ct values were 35.7 in swabs and 37.3 in the environment. All swabs and the environmental sample from October 2019 were successfully sequenced on 550-600bp of the coronavirus polymerase gene and all were similar and identified as duck coronavirus 2714 (gammacoronavirus), with 94-95% identity to strains from wild anatidae (for instance GenBank accession number MK204411) and duck coronavirus isolate DK/GD/27/2014 (accession number NC_048214).

3.2.4. Chlamydia

Nine wild birds in 1936 showed positive results (individual or pool) for the chlamydia qPCR (0.46%) (Table 3). Three were from the superfamily *Aegithaloidea*, all on oropharyngeal samples (in August 2019, February 2020 and November 2020) and one on cloaca in addition (in August 2019); two were from birds

of the *Sylviida* parvorder cloaca (in August 2019) and oropharynx (in October 2019); two were from *Motacilla alba* cloaca and oropharynx (both in October 2019); one was from *Passer montanus* oropharynx (in July 2019); and one was from *Fringilla coelebs* cloaca (in February 2020) (Table 1 and Appendix 2). Bacterial loads in these samples resulted in Ct values between 27 and 40 (mean of 36) (Appendix 2). Identifications by MLST sequencing at the NRL were successful on four birds, which were showed to carry two different strains of avian *Chlamydia abortus*: one in two individuals of *Phylloscopus collybita* from August 2019 and November 2020, and another one in a *Sylvia communis* from August 2019 and in a *Fringilla coelebs* from February 2020 (Appendix 3). In domestic ducks, 8 out of 17 flocks were detected positive by qPCR (47.1%) (Table 3): oropharyngeal and cloacal swabs from one flock in December 2019 (week 52), environment then cloacal swabs from one flock in January-February 2020 (weeks 5 and 8), environment from another flock in January 2020 (week 5), environment from one flock in February 2020 (week 9), and environment from two then four flocks in November-December 2020 (weeks 46 and 51) (Table 1 and Appendix 2). In the end, oropharyngeal or cloacal swabs were positive for two flocks (in December 2019 and February 2020), and environment was positive for seven flocks (in January, February and November-December 2020), with one flock showing positive results in both types of sample (Table 1). Bacterial loads in environmental samples and swabs were similar with mean Ct values of 34 and 33.8 respectively. All positive swabs were successfully identified at the NRL as *C. psittaci* strains of duck genotype (strain GR9 of genotype C) (Appendix 3). Positive environmental samples from January, February and December 2020 were also all identified as the same strain of *C. psittaci*. In addition, *C. abortus* of unidentified strains were detected in three flocks during November-December 2020, with one of them being also positive for *C. psittaci* (Appendix 2).

Table 3 – Overall observed prevalence percentage for each group of species sampled. Groups are as defined in Table 2. The Wilson 95% confidence interval (CI) is given between brackets. Duck prevalence is calculated at the flock level, i.e. duck swabs or outdoor area of the same flock. Sample size of duck flocks is larger for AIV screening because of regulatory testing, as precised between brackets.

Group of species	Sample size PCR (birds or flocks)	PCR positive birds or flocks				Prevalence percentage (Wilson 95% CI)				Sample size ELISA (birds)	ELISA positive birds		Prevalence percentage (Wilson 95% CI)	
		AIV	Avu	CoV	Chlam	AIV	Avulaviruses (Avu)	Coronaviruses (CoV)	Chlamydia (Chlam)		AIV	Avu	AIV	Avu
MUS	289	1	0	0	0	0.35 (0 - 2)	0.00 (0 - 1)	0.00 (0 - 1)	0.00 (0 - 1)	159	5	0	3.14 (1 - 7)	0.00 (0 - 2)
BUB	206	1	0	0	0	0.49 (0 - 3)	0.00 (0 - 2)	0.00 (0 - 2)	0.00 (0 - 2)	1	0	0	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)
PASM	206	0	0	0	1	0.00 (0 - 2)	0.00 (0 - 2)	0.00 (0 - 2)	0.49 (0 - 3)	156	2	0	1.28 (0 - 5)	0.00 (0 - 2)
PASD	199	2	0	0	0	1.01 (0 - 4)	0.00 (0 - 2)	0.00 (0 - 2)	0.00 (0 - 2)	173	1	0	0.58 (0 - 3)	0.00 (0 - 2)
FRI	186	1	0	0	1	0.54 (0 - 3)	0.00 (0 - 2)	0.00 (0 - 2)	0.54 (0 - 3)	45	0	0	0.0 (0 - 8)	0.0 (0 - 8)
SYL	169	2	0	0	2	1.18 (0 - 4)	0.00 (0 - 2)	0.00 (0 - 2)	1.18 (0 - 4)	76	5	0	6.6 (3 - 14)	0.0 (0 - 5)
AEG	142	0	0	0	3	0.00 (0 - 3)	0.00 (0 - 3)	0.00 (0 - 3)	2.11 (1 - 6)	0	-	-	-	-
PAR	133	0	0	0	0	0.00 (0 - 3)	0.00 (0 - 3)	0.00 (0 - 3)	0.00 (0 - 3)	37	0	0	0.0 (0 - 9)	0.0 (0 - 9)
TUR	117	0	0	0	0	0.00 (0 - 3)	0.00 (0 - 3)	0.00 (0 - 3)	0.00 (0 - 3)	100	3	2	3.0 (1 - 8)	2.00 (1 - 7)
MOT	91	1	0	0	2	1.1 (0 - 6)	0.0 (0 - 4)	0.0 (0 - 4)	2.2 (1 - 8)	58	5	1	8.6 (4 - 19)	1.7 (0 - 9)
CER	37	0	0	0	0	0.0 (0 - 9)	0.0 (0 - 9)	0.0 (0 - 9)	0.0 (0 - 9)	7	0	0	0 (0 - 35)	0 (0 - 35)
PRU	35	0	0	0	0	0.0 (0 - 10)	0.0 (0 - 10)	0.0 (0 - 10)	0.0 (0 - 10)	30	3	0	10.0 (3 - 26)	0.0 (0 - 11)
ANT	33	1	0	0	0	3.0 (1 - 15)	0.0 (0 - 10)	0.0 (0 - 10)	0.0 (0 - 10)	22	0	1	0.0 (0 - 15)	4.5 (1 - 22)
PIC	21	0	0	0	0	0.0 (0 - 15)	0.0 (0 - 15)	0.0 (0 - 15)	0.0 (0 - 15)	12	0	0	0 (0 - 24)	0 (0 - 24)
EMB	19	0	0	0	0	0 (0 - 17)	0 (0 - 17)	0 (0 - 17)	0 (0 - 17)	9	0	0	0 (0 - 30)	0 (0 - 30)
STU	19	0	0	0	0	0 (0 - 17)	0 (0 - 17)	0 (0 - 17)	0 (0 - 17)	11	0	0	0 (0 - 26)	0 (0 - 26)
REG	9	0	0	0	0	0 (0 - 30)	0 (0 - 30)	0 (0 - 30)	0 (0 - 30)	0	-	-	-	-
COR	6	0	0	0	0	0 (0 - 39)	0 (0 - 39)	0 (0 - 39)	0 (0 - 39)	3	0	0	0 (0 - 56)	0 (0 - 56)
ACC	4	0	0	0	0	0 (0 - 49)	0 (0 - 49)	0 (0 - 49)	0 (0 - 49)	4	1	0	25 (5 - 70)	0 (0 - 49)
CHA	4	0	0	0	0	0 (0 - 49)	0 (0 - 49)	0 (0 - 49)	0 (0 - 49)	3	0	0	0 (0 - 56)	0 (0 - 56)
ALC	3	0	0	0	0	0 (0 - 56)	0 (0 - 56)	0 (0 - 56)	0 (0 - 56)	1	0	0	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)
HIR	3	0	0	0	0	0 (0 - 56)	0 (0 - 56)	0 (0 - 56)	0 (0 - 56)	1	0	0	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)
STR	2	0	0	0	0	0 (0 - 66)	0 (0 - 66)	0 (0 - 66)	0 (0 - 66)	0	-	-	-	-

Group of species	Sample size PCR (birds or flocks)	PCR positive birds or flocks				Prevalence percentage (Wilson 95% CI)				Sample size ELISA (birds)	ELISA positive birds		Prevalence percentage (Wilson 95% CI)	
		AIV	Avu	CoV	Chlam	AIV	Avulaviruses (Avu)	Coronaviruses (CoV)	Chlamydia (Chlam)		AIV	Avu	AIV	Avu
		GAL	1	0	0	0	0	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)		0 (0 - 79)	0 (0 - 79)	0	-
STRI	1	0	0	0	0	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)	1	0	0	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)
UPU	1	0	0	0	0	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)	1	0	0	0 (0 - 79)	0 (0 - 79)
All wild birds	1936	9	0	0	9	0.46 (0.2 - 0.9)	0.00 (0.0 - 0.2)	0.00 (0.0 - 0.2)	0.46 (0.2 - 0.9)	910	25	4	2.75 (1.9 - 4.0)	0.44 (0.2 - 1.1)
Duck flocks	17 (23 AIV)	9	0	5	8	39 (22 - 59)	0 (0 - 18)	29 (13 - 53)	47 (26 - 69)	-	-	-	-	-

3.3. Epidemiological and statistical analysis

Over the whole time of study, AIV were detected in 0.46% (95% CI: 0.2-0.9) of wild birds (Table 3). AIV were detected in seven groups of wild bird species, and intra-group prevalence values ranged from 0.35% (95% CI: 0-2) in Muscicapidae family, up to 3.0% (95% CI: 1-15) in *Anthus* genus (Table 3). As for serology in wild birds, overall 2.75% (95% CI: 1.9-4.0) of wild birds were seropositive for AIV. AIV antibodies were detected in eight groups of species with seroprevalence values that ranged from 0.58% (95% CI: 0-3) in *Passer domesticus*, up to 25% in *Accipiter nisus* (95% CI: 5-70) (Table 3). Considering all wild bird species along time, apparent prevalence values of AIV in swabs and feces were up to a maximum of 1.0% (95% CI: 0.17-5.40) in February 2021, which corresponded to corrected prevalence values up to a maximum of 1.0% (95% CI: 0.05-5.45) (Figure 1). Seroprevalence for AIV was up to a maximum of 7.5% (95% CI: 4.92-12.36) both in December 2020 and February 2021 (Figure 1). No Avulavirus (Figure 2) or coronavirus were detected in wild birds, which corresponded to overall 95% CI of 0.0-0.2% (Table 3). Overall, 0.44% (95% CI: 0.2-1.1) of wild birds were seropositive for NDV (Table 3). Antibodies for NDV were detected in three groups, with seroprevalence values between 1.7% (95% CI: 0-9) in *Motacilla* genus and 4.5% (95% CI: 1-22) in *Anthus* genus (Table 3). Seroprevalences for NDV were up to a maximum of 5% (95% CI: 1.38-16.5) in December 2020 (Figure 2). Overall, chlamydia were detected in 0.46% (95% CI: 0.2-0.9) of wild birds (Table 3). Chlamydia were detected in five groups with prevalence values ranging from 0.49% (95% CI: 0-3) in *Passer montanus*, to 2.2% (95% CI: 1-8) in *Motacilla* genus (Table 3). Considering all wild bird species along time, apparent prevalence values of chlamydia in swabs and feces were up to a maximum of 1.4% (95% CI: 0.63-7.91) in February 2020, which corresponded to corrected prevalence values up to a maximum of 2.3% (95% CI: 0.63-7.99) (Figure 4). Overall, positive wild birds by PCR or ELISA for any infectious agent belonged to 12 species groups out of the 26 groups in total. In all 12 groups, only the genus *Motacilla* was found positive for both AIV (1.1%, 95% CI: 0-6), chlamydia (2.2%, 95% CI: 1-8), AIV antibodies (8.6%, 95% CI: 4-19) and NDV antibodies (1.7%, 95% CI: 0-9) (Table 3).

Overall, AIV were detected in 39% (95% CI: 22-59) of duck flocks (Table 3). No avulavirus were detected (95% CI: 0-18%), but 29% (95% CI: 13-53) were detected to carry coronaviruses, and 47% (95% CI: 26-69) to carry chlamydia (Table 3). Through time, environmental samples (that were collected simultaneously on all areas contrary to swabs only on older flocks) showed up to 100% (2 in 2) positive flocks for AIV in January 2020 (Figure 1). They also showed up to 50% (2 in 4) positive flocks for coronaviruses in November 2020 (Figure 3) and 100% (2 in 2, and 4 in 4) for chlamydia in February and December 2020 respectively (Figure 4).

Chi-squared tests calculated on prevalence values over time in wild birds or duck flocks showed no significant differences (p-values over 0.05), except for NDV seroprevalence ($X^2=23.5$, $p=5.2e-$

3) which was higher in December 2020 (5%, 95% CI: 1.4-16.5) compared to other times of sampling Chi-squared tests calculated on prevalence values by groups of species showed significant differences between wild birds and duck flocks on PCR prevalence values of AIV ($X^2=379.5$, $p<10^{-10}$), coronaviruses ($X^2=570.9$, $p<10^{-10}$) and chlamydia ($X^2=435.5$, $p<10^{-10}$), duck flocks showing higher prevalence values compared to any wild bird group and those alone showing no significant difference between them. Seroprevalence values were statistically similar between wild bird groups for NDV, but they showed slightly significant differences in some groups for AIV ($X^2=33.7$, $p=0.038$) with *Passer domesticus* presenting significantly lower seroprevalence (0.58%, 95% CI: 0-3) compared to *Accipiter nisus* (25%, 95% CI: 5-70), *Prunella modularis* (10.0%, 95% CI: 3-26), *Motacilla* genus (8.6%, 95% CI: 4-19), or *Sylviida* parvorder (6.6%, 95% CI: 3-14).

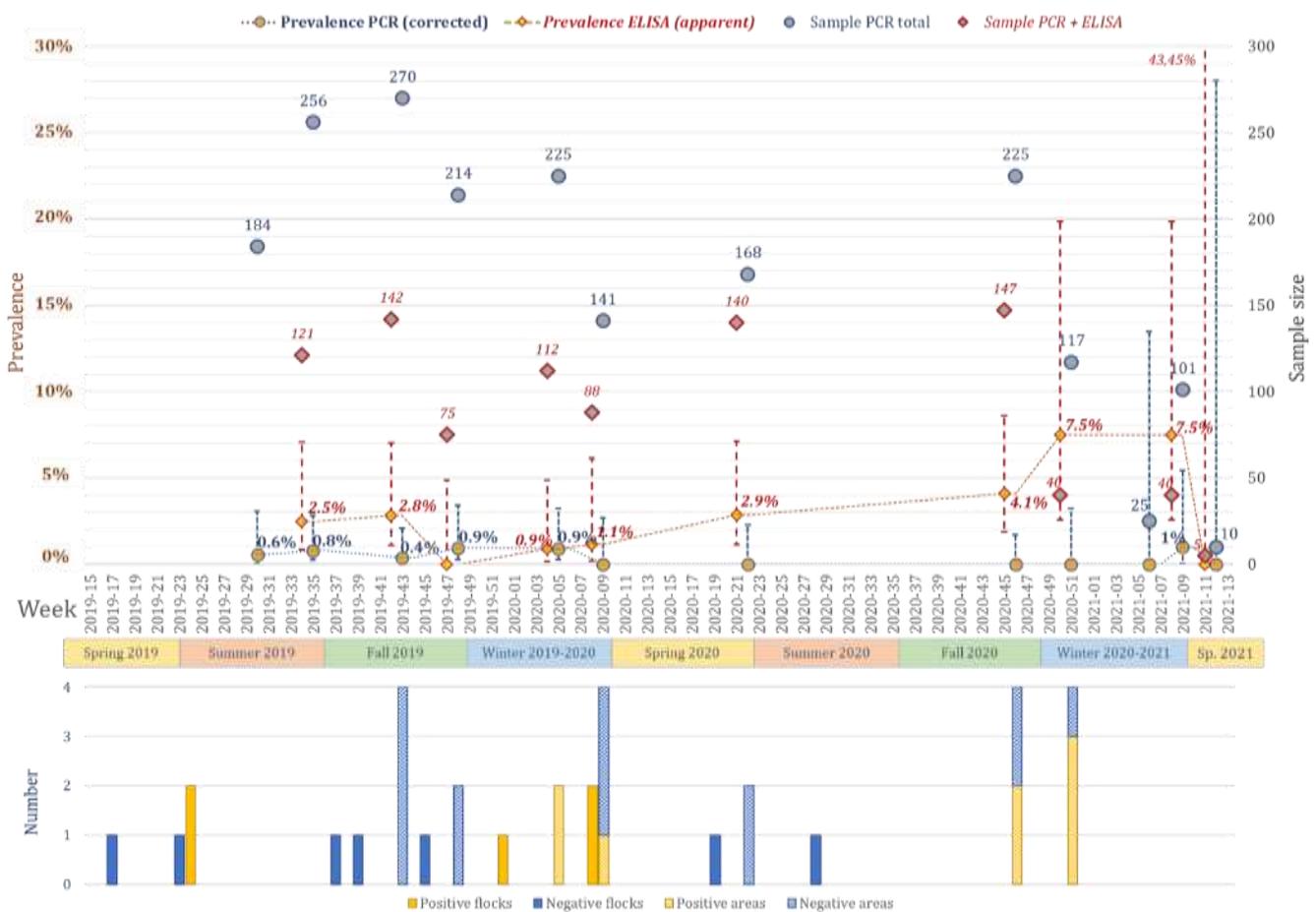


Figure 1 – Evolution of Avian influenza virus detections in wild birds (above) and duck flocks (below) along time. PCR prevalence is showed as corrected prevalence with test characteristics, and ELISA prevalence is showed as apparent prevalence. Error bars figure 95% confidence intervals of prevalence.

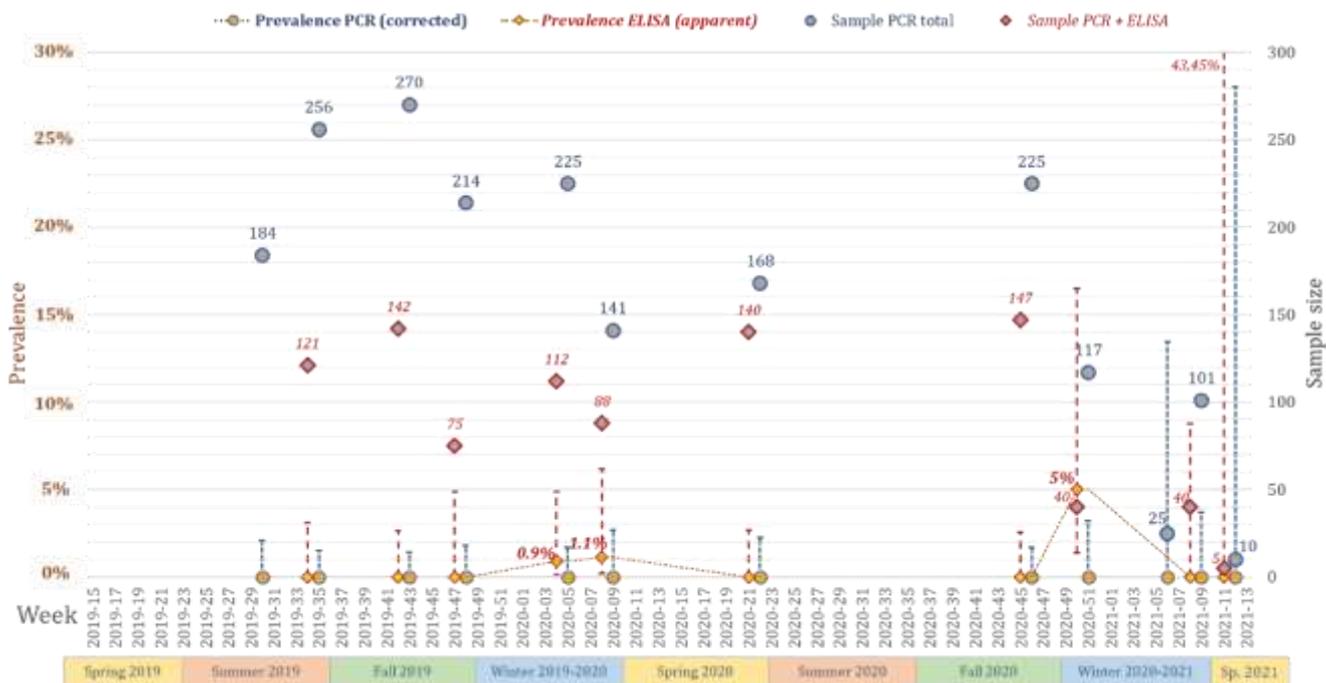


Figure 2 – Evolution of Avulavirus and NDV detections in wild birds along time (duck flocks were all negative). PCR prevalence is showed as corrected prevalence with test characteristics, and ELISA prevalence is showed as apparent prevalence. Error bars figure 95% confidence intervals of prevalence.

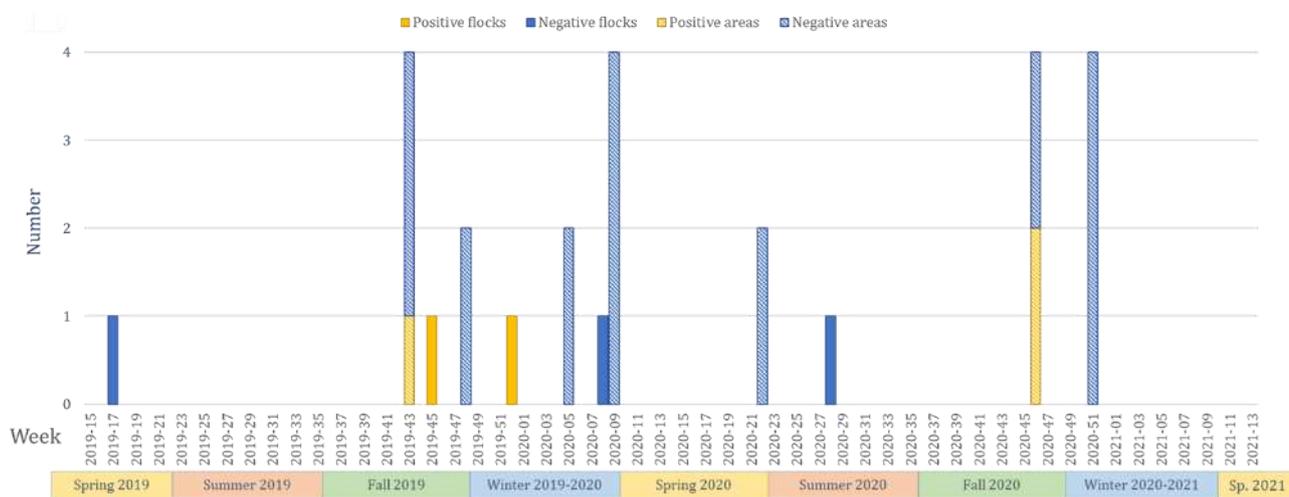


Figure 3 – Evolution of Coronavirus detections in duck flocks along time (wild birds were all negative).

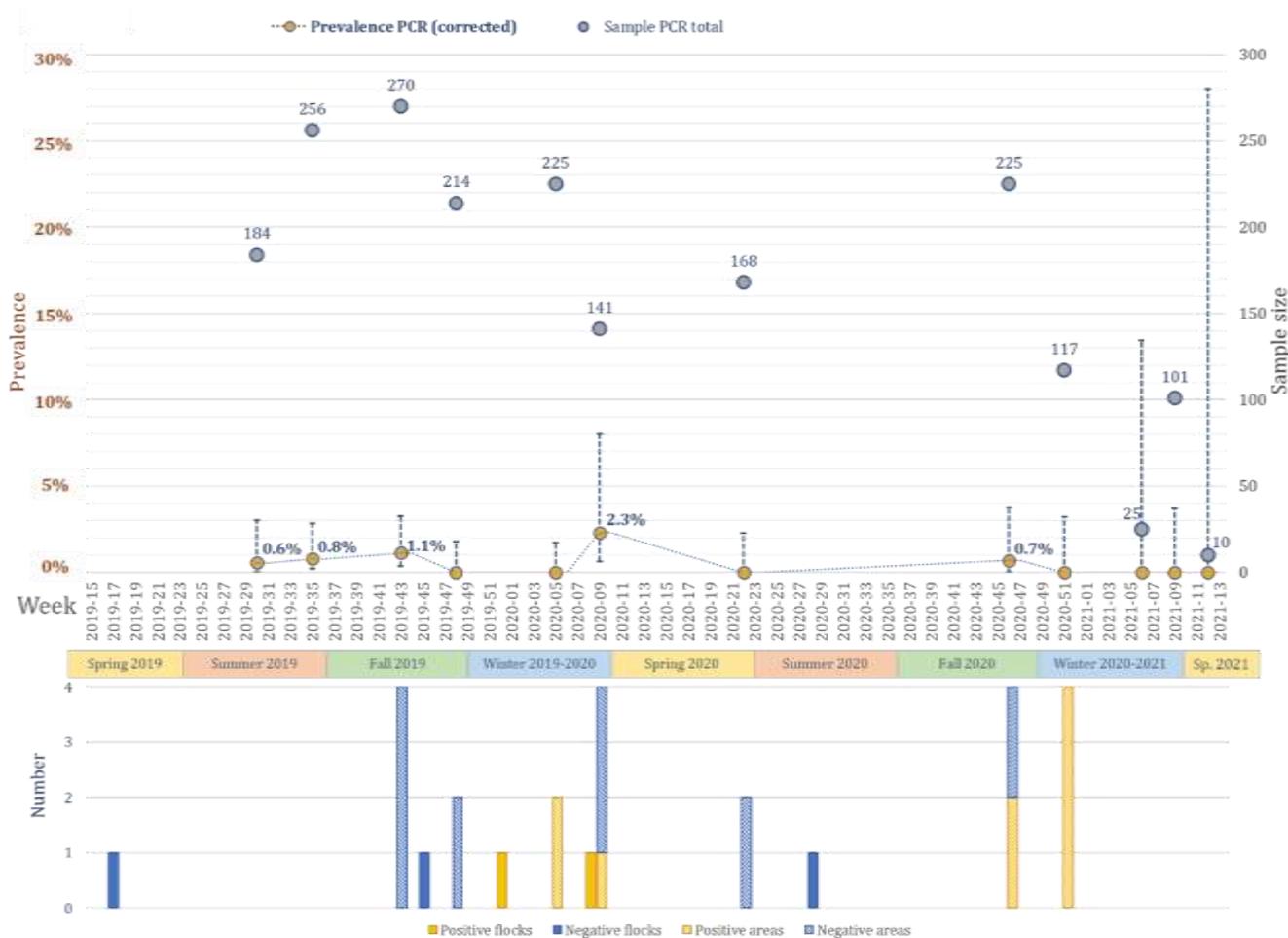


Figure 4 – Evolution of Chlamydiaceae detections in wild birds (above) and duck flocks (below) along time. PCR prevalence is showed as corrected prevalence with test characteristics. Error bars figure 95% confidence intervals of prevalence.

4. Discussion

The present surveillance study brings original knowledge on various levels. It is firstly based on longitudinal data over more than a year on a very local scale, with mostly individualized results, which helps to better understand infection dynamics in studied populations. Other but few studies implemented comparable methods, for instance in domestic duck flocks for chlamydia (Hulin et al., 2016; Vorimore et al., 2015), in wild swans for AIV (Hill et al., 2019), or in various peridomestic birds for NDV (Hirschinger et al., 2021). Secondly, the present study is located on a poultry farm and looks at all compartments of the epidemiological interface, that is domestic ducks, wild birds and their shared environment. To our knowledge, the triad is never studied in a real-life setting, where at most two compartments are investigated (i.e. Germeraad et al., 2020; Hirschinger et al., 2020; Shriner et al., 2016), but it has been studied in experimental conditions (Ellis et al., 2021; Forrest et al., 2010). Thirdly, the present study enlightens the asymptomatic epidemiology of a

least-studied population and context, that is commensal birds of a free-range duck farm in Europe. Indeed, most longitudinal studies in wild birds focus on natural settings or on waterfowl hosts (Arenas et al., 1990; J. D. Brown et al., 2010; Hill et al., 2019; Lewis et al., 2013; Napp et al., 2017; Onuma et al., 2017; Torrontegi et al., 2019). Very few focus on commensal birds around farms that are not closely related to coasts or wetlands (Guimarães et al., 2016; Hirschinger et al., 2020; Shriner et al., 2016).

Observed prevalence levels in domestic ducks and wild birds during the time of this study were globally consistent with results from other teams on similar species in a non-epidemic context. Indeed, AIV were often detected by molecular tests at very low or even negative prevalence levels in passerines and other non-aquatic birds (Caron et al., 2017; Hirschinger et al., 2020; Slusher et al., 2014), while antibodies most of the time show slightly higher prevalence levels (Arenas et al., 1990; Hirschinger et al., 2020; Pérez-Ramírez et al., 2010; Slusher et al., 2014) but are also sometimes negative (Brown et al., 2010). Prevalence results which were almost completely negative for NDV and avulaviruses were also expected, because France commercial poultry is free of NDV (Huneau-Salaün et al., 2020), and Passeriformes mainly sampled in this study are not commonly found positive in comparison with Anseriformes and Columbiformes (Hirschinger et al., 2020; Napp et al., 2017; Pedersen et al., 2016). As for coronaviruses, the gamma genus is widely distributed in waterfowl (Anseriformes and Charadriiformes mostly) with various strains (de Sales Lima et al., 2015; Wille & Holmes, 2020), which correlates with observed results on duck flocks in this study. In contrast, Passeriformes are generally least infected and rather with strains of the delta genus (Wille & Holmes, 2020; Woo et al., 2009). Finally, chlamydia detections were consistent with previous studies in free-range ducks from France that showed common infection by *Chlamydia psittaci* of flocks with high intra-flock levels of prevalence (Hulin et al., 2016; Vorimore et al., 2015). In wild birds, *C. psittaci* are more widely found in waterfowl or Columbiformes than in passerines as we observed in the present study (Krawiec et al., 2015; Szymańska-Czerwińska et al., 2017), and avian *C. abortus* may be present in relatively high prevalence levels in both waterfowl and passerines (Szymańska-Czerwińska et al., 2017). As *C. abortus* was also detected at one time in the environment of ducks but never in their swabs, it is interesting then not to have detected transmissions of chlamydia between ducks and commensal birds in this study. However, this fact has to be considered with the limitation that not all detected strains were successfully identified and that not all flocks were sampled by both swabs and environment.

Temporal patterns of AIV in wild birds and duck flocks did not show statistically significant variations. However, the absence of significance was certainly due to the relatively small size of samples at each time, and to the small numbers of positive birds or flocks. However, as the

duration of capture samplings was limited to 3 days to avoid disturbance on wild birds (protected species) and sample degradation, only an increase in frequency of captures could have improved sample size for wild birds. Moreover, the evaluation of sensitivity carried out for each time of wild bird sampling gave good confidence that no epidemic trend was missed, with a detectable threshold of population prevalence generally below 3% for molecular testing and 8% for serological testing (Appendix 4). It appears also that slight trends in AIV detections were not correlated between ducks and wild birds, even with serological testing that allows longer detection times than viral testing (few weeks rather than few days) in these poorly susceptible species (J. D. Brown et al., 2010; Criado et al., 2021; Ellis et al., 2021; Forrest et al., 2010; Hill et al., 2019). These non-matching prevalence patterns add to differences in identifications of AIV strains between wild and domestic birds. No AIV from wild birds could be identified precisely by isolation and sequencing, which is an ongoing issue in terrestrial wild bird studies due to low quantities of biological material available on small and healthy birds (Caron et al., 2017; Munster et al., 2007). However, at least H6 subtype was excluded by specific RT-qPCR. As this subtype was the most frequently identified in ducks and their environment, its transmission to wild birds does not seem to be important (lower than estimated detection thresholds in wild birds). With low levels of viral and serological prevalence detected in commensal birds sampled on the studied duck farm, their role as maintenance hosts for AIV seems excluded as evidenced before (Caron et al., 2017). But sporadic transmissions to wild birds of poultry strains of AIV are still not excluded by our study design (limited sample by species and time, limited detection sensitivity of tests), even more for highly pathogenic ones that could be more infectious to non-reservoir hosts in a similar context (Forrest et al., 2010; Nemeth et al., 2010). Such sporadic transmissions could be sufficient for mobile commensal birds to spread AIV from one farm to another or to any other susceptible population by individual movements during the few days of excretion. Our study then comforts the conceptual role of bridge hosts that commensal wild birds play for AIV (Caron et al., 2015).

Our study added evidence to technical difficulties in characterizing AIV circulation in terrestrial birds. Using captures that target healthy individuals of mostly small species, detection of AIV result in very low prevalence and very low viral loads in samples. This makes their direct detection from swabs difficult even around acute farm outbreaks (Shriner et al., 2016; Van De Wiele et al., 2017). In addition, low viral loads in small material quantities of samples lead to frequent issues in confirmation and identification when detection was possible (Munster et al., 2007). So as to improve sensitivity of AIV surveillance studies, alternative and complementary methods can be used, such as sampling of various materials (Blagodatski et al., 2021; Coombe et al., 2021), or serological testing (Brown et al., 2010). However, results still rarely allow to assess transmission pathway and direction at the wild-domestic interface (Germeraad et al., 2020; Karunakaran et al., 1983; Shriner et al., 2016; Verhagen et al., 2015). To tackle these issues in characterizing AIV

transmissions at the interface between domestic ducks and commensal birds, the study of the three other infectious agents was also considered as a way to complete lack of evidence on infectious transmission routes. To our knowledge, the simultaneous study of other agents as transmission markers for AIV is innovative at the wild-domestic interface. The choice of such markers was made following few main requirements. They had firstly to be present in at least one side of the interface, and with detectable prevalence levels in duration of excretion and infectious load considering possibilities of sampling size. Secondly, they had to be able to cross species barrier at least between populations studied. Thirdly, as transmissions were to be evidenced, they had to be rapidly detectable with existing screening methods, then precisely identifiable at the strain level. In addition, surveillance of infectious agents with possible pathogenicity would bring results of sanitary interest beside comparative transmission of AIV. Among infectious agents of veterinary interest in poultry, some present the cited characteristics in the context of a duck farm. Some viruses have been showed by metagenomics to share epidemiological and ecological similarities with AIV in wild ducks, such as the Avulavirinae and Orthocoronavirinae sub-families (Ramírez-Martínez et al., 2018; Wille et al., 2015). In the first taxa, Newcastle disease virus (NDV) can infect broad range of hosts and have important economic impacts (Dimitrov et al., 2016). More widely, viruses of the Avulavirinae sub-family present various genotypes that are detected in a very broad range of bird species (Cardenas Garcia et al., 2013; Dimitrov et al., 2016; Hirschinger et al., 2020; Karamendin et al., 2020; Kim et al., 2012), which makes this group an interesting transmission marker at the wild-domestic bird interface. As a second marker, the Orthocoronavirinae sub-family can also infect wide diversity of birds and present a worldwide distribution (Rahman et al., 2021; Wille & Holmes, 2020). In particular, two of its genera are known to infect birds: Gammacoronaviruses (including infectious bronchitis virus, duck coronavirus 2714 and various other strains) and Deltacoronaviruses (Cavanagh, 2005; Domańska-Blicharz et al., 2021; Wille & Holmes, 2020; Woo et al., 2012). Wild and domestic ducks are asymptomatic carriers of coronaviruses and are involved in possible cross-species transmissions, which makes those viruses interesting to study at the wild-domestic interface (Liu et al., 2005; Miłek & Blicharz-Domańska, 2018; Pauly et al., 2019; Zhuang et al., 2015). In addition to avulaviruses and coronaviruses, bacteria of the Chlamydiaceae family are broadly distributed in species and geography (Kaleta & Taday, 2003; Krawiec et al., 2015; Soon et al., 2021), with high asymptomatic prevalence of *C. psittaci* in wild and domestic ducks (Soon et al., 2021; Vorimore et al., 2015). In our study, although avulaviruses were not detected in ducks or wild birds by RT-qPCR, and coronaviruses were not detected in wild birds, chlamydia showed similar prevalence patterns to AIV. Strain identifications were more successful and complete for chlamydia than for AIV, which suggests that this bacterial taxon is a good choice as a transmission marker at the studied wild-domestic interface. However, similarly to AIV, chlamydia strain identifications were

inconsistent between the two compartments. Indeed, only one classical duck strain GR9 of *Chlamydia psittaci* was identified in duck swabs, while commensal birds hosted avian *C. abortus* of various strains.

Regarding screening for AIV and chlamydia, both cloacal and oropharyngeal swabs gave positive results, which showed that both respiratory and digestive tracts are involved in the replication and have to be considered in the diagnostic process. As wild bird samplings are often constrained in numbers, it seems essential to sample both tracts when possible to optimize the human and financial efforts invested for captures. This point was underlined before in AIV surveillance studies (Caron et al., 2017; Gaidet et al., 2012; Lewis et al., 2013). Beside samples on captured wild birds, the present study relied on fecal sampling of cattle egrets. This approach was promoted and used by other researchers for surveillance studies (Coombe et al., 2021; Lee et al., 2010; Torrontegi et al., 2019), and it seems a valuable method for wildlife surveillance regarding the least field effort and regulatory constraints it requires compared to the amount of additional data it brings. However, if the suspected species from which a fecal sample originates can be confirmed by molecular techniques (Lee et al., 2010), this sampling method does not allow individual identification and follow up of birds infected. On the same idea of alternative least-effort sampling to complete and increase sample sizes, environmental water and wipes were collected on the farm on outdoor areas where ducks were present. The nature of these samples seemed to allow a good estimation of infectious shedding at the scale of each flock, as molecular detection and identification were most of the time similar in swabs and environment from flocks with both types of samplings a few weeks apart. In particular, water from puddles on trampled grounds close to duck houses and drinkers may have helped these detections, as showed for low pathogenic AIV in a study on free-range layers (Germeraad et al., 2020). Moreover, these samples bring a picture of the possibility of infectious transmission from indirect contacts between ducks and commensal birds landing on outdoor areas. As duck flocks represent a concentration of thousands of large birds that live for several weeks on these areas, duck infectious agents are certainly widely dominant as was observed in this study. It seems then that microbiological contamination produced by free-range ducks in the environment is important, which would very likely expose wild birds to infectious agents of ducks. This suggests that free-range poultry are certainly major participants in microbiological pressure on avian communities, at least on a local scale.

Taking into account all infectious agents studied, it seems that general contamination of duck flocks and of their outdoor environment at one time (for instance with AIV and chlamydia during winter 2019-2020 and fall 2020) did not have a significant impact on the infection of commensal wild birds repeatedly observed in contact with those two compartments. This impact was at least not visible in healthy birds that were captured in this study, and sick or dead birds were never

observed on the study site. All these observations comfort the “bridge host” concept brought earlier by several researchers for AIV (Caron et al., 2015; Ellis et al., 2021; Forrest et al., 2010), and suggest the extension of this concept to other infectious agents transmitted by the same routes. Indeed, commensal birds from the duck farm were sporadically found infected and seemed poorly susceptible to duck infectious agents and conversely, at least to the four that were studied here. This might be due to the consequent taxonomical distance that separates ducks (order Anseriformes) and Passeriformes that constituted the most part of the sampled species. Moreover, it should be noted that no chlamydia, no coronavirus and only one AIV were detected in the large number of cattle egrets (order Pelecaniformes) and few snipes (order Charadriiformes) that were sampled in this study. Those groups are closer relatives to ducks and are also commonly considered as reservoirs for AIV, coronaviruses and *C. psittaci* (El-Jakee et al., 2014; Kaleta & Taday, 2003; Olsen et al., 2006; Wille & Holmes, 2020). These species were also observed in large numbers (tens of snipes, to hundreds of cattle egrets) on outdoor areas of the farm on some occasions, and sometimes in close proximity with contaminated flocks and surfaces. Results from these species then add to the conclusion of a null or anecdotal transmission of infectious agents circulating endemically at the interface between commensal birds and domestic ducks, at least in the studied context.

Acknowledgements

This study was performed in the framework of the “Chaire de Biosécurité Aviaire”, hosted by the National Veterinary College of Toulouse (ENVT) and funded by the Direction Générale de l’Alimentation, Ministère de l’Agriculture et de l’Alimentation, France. This work was financially supported by the FEDER/Région Occitanie Recherche et Sociétés 2018 - AI-TRACK. Chlamydiaceae were identified thanks to collaboration with the Bacterial Zoonosis Unit at the Laboratory for Animal Health of Anses Maisons-Alfort, France. The authors also express their deepest gratitude to the duck breeders in Gers, for their warm welcome at any time, and to the veterinarians of the farm who kindly collected samples on ducks for us.

References

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Anses. (2016). *Avis relatif au « risque de maintien de l’infection à Influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) H5 par l’avifaune non migratrice, dans la zone réglementée du Sud-Ouest de la France »* (Saisine n° 2016-SA-0059). Agence nationale de sécurité sanitaire de l’alimentation, de l’environnement et du travail.
- Arenas, A., Carranza, J., Perea, A., Miranda, A., Maldonado, A., & Hermoso, M. (1990). Type a influenza viruses in birds in southern Spain: Serological survey by enzyme-linked

- immunosorbent assay and haemagglutination inhibition tests. *Avian Pathology*, 19(3), 539–546. <https://doi.org/10.1080/03079459008418706>
- Bergervoet, S. A., Pritz-Verschuren, S. B. E., Gonzales, J. L., Bossers, A., Poen, M. J., Dutta, J., Khan, Z., Kriti, D., van Bakel, H., Bouwstra, R., Fouchier, R. A. M., & Beerens, N. (2019). Circulation of low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses in wild birds and poultry in the Netherlands, 2006–2016. *Scientific Reports*, 9(1), 13681. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50170-8>
- Blagodatski, A., Trutneva, K., Glazova, O., Mityaeva, O., Shevkova, L., Kegeles, E., Onyanov, N., Fede, K., Maznina, A., Khavina, E., Yeo, S.-J., Park, H., & Volchkov, P. (2021). Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology. *Pathogens*, 10, 630. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050630>
- Bouwstra, R., Gonzales, J. L., Wit, S. de, Stahl, J., Fouchier, R. A. M., & Elbers, A. R. W. (2017). Risk for Low Pathogenicity Avian Influenza Virus on Poultry Farms, the Netherlands, 2007–2013. *Emerging Infectious Diseases Journal*, 23(9). <https://doi.org/10.3201/eid2309.170276>
- Brown, J. D., Luttrell, M. P., Berghaus, R. D., Kistler, W., Keeler, S. P., Howey, A., Wilcox, B., Hall, J., Niles, L., Dey, A., Knutsen, G., Fritz, K., & Stallknecht, D. E. (2010). Prevalence of antibodies to type A influenza virus in wild avian species using two serologic assays. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(3), 896–911. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.3.896>
- Brown, J. D., Stallknecht, D. E., Berghaus, R. D., & Swayne, D. E. (2009). Infectious and Lethal Doses of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus for House Sparrows (*Passer Domesticus*) and Rock Pigeons (*Columbia Livia*). *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 21(4), 437–445. <https://doi.org/10.1177/104063870902100404>
- Brown, L. D., Cai, T. T., & DasGupta, A. (2001). Interval Estimation for a Binomial Proportion. *Statistical Science*, 16(2), 101–117.
- Burt, S. A., Röring, R. E., & Heijne, M. (2018). Chlamydia psittaci and C. avium in feral pigeon (*Columba livia domestica*) droppings in two cities in the Netherlands. *Veterinary Quarterly*, 38(1), 63–66. <https://doi.org/10.1080/01652176.2018.1482028>
- Cardenas Garcia, S., Navarro Lopez, R., Morales, R., Olvera, M. A., Marquez, M. A., Merino, R., Miller, P. J., & Afonso, C. L. (2013). Molecular Epidemiology of Newcastle Disease in Mexico and the Potential Spillover of Viruses from Poultry into Wild Bird Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), 4985–4992. <https://doi.org/10.1128/AEM.00993-13>
- Caron, A., Cappelle, J., Cumming, G. S., de Garine-Wichatitsky, M., & Gaidet, N. (2015). Bridge hosts, a missing link for disease ecology in multi-host systems. *Veterinary Research*, 46(83), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0217-9>
- Caron, A., Cappelle, J., & Gaidet, N. (2017). Challenging the conceptual framework of maintenance hosts for influenza A viruses in wild birds. *Journal of Applied Ecology*, 54(3), 681–690. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12839>
- Cavanagh, D. (2005). Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathology*, 34(6), 439–448. <https://doi.org/10.1080/03079450500367682>
- Central Veterinary Institute, Wageningen University, Gonzales, J. L., Elbers, A. R. W., & Beerens, N. (2017). Risk factors of primary introduction of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza virus into European poultry holdings, considering at least material contaminated by wild birds and contact with wild birds. *EFSA Supporting Publications*, 14(10), 24 pp. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1282>
- Chamings, A., Nelson, T. M., Vibin, J., Wille, M., Klaassen, M., & Alexandersen, S. (2018). Detection and characterisation of coronaviruses in migratory and non-migratory Australian wild birds. *Scientific Reports*, 8(5980), 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24407-x>

- Cleaveland, S., Haydon, D. T., & Taylor, L. (2007). Overviews of Pathogen Emergence: Which Pathogens Emerge, When and Why? In J. E. Childs, J. S. Mackenzie, & J. A. Richt (Eds.), *Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission* (Vol. 315, pp. 85–111). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-70962-6_5
- Cleaveland, S., Laurenson, M. K., & Taylor, L. H. (2001). Diseases of humans and their domestic mammals: Pathogen characteristics, host range and the risk of emergence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 356(1411), 991–999. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0889>
- Coombe, M., Iwasawa, S., Byers, K. A., Prystajek, N., Hsiao, W., Patrick, D. M., & Himswoth, C. G. (2021). A systematic review and narrative synthesis of the use of environmental samples for the surveillance of avian influenza viruses in wild waterbirds. *Journal of Wildlife Diseases*, 57(1), 1–18. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00082>
- Criado, M. F., Moresco, K. A., Stallknecht, D. E., & Swayne, D. E. (2021). Low-pathogenicity influenza viruses replicate differently in laughing gulls and mallards. *Influenza and Other Respiratory Viruses*, 0, 1–6. <https://doi.org/10.1111/irv.12878>
- Croville, G., Foret, C., Heuillard, P., Senet, A., Delpont, M., Mouahid, M., Ducatez, M. F., Kichou, F., & Guerin, J.-L. (2018). Disclosing respiratory co-infections: A broad-range panel assay for avian respiratory pathogens on a nanofluidic PCR platform. *Avian Pathology*, 47(3), 253–260. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1430891>
- de Sales Lima, F. E., Gil, P., Pedrono, M., Minet, C., Kwiatek, O., Campos, F. S., Spilki, F. R., Roehe, P. M., Franco, A. C., Maminiana, O. F., Albina, E., & de Almeida, R. S. (2015). Diverse gammacoronaviruses detected in wild birds from Madagascar. *European Journal of Wildlife Research*, 61(4), 635–639. <https://doi.org/10.1007/s10344-015-0931-7>
- DGAL. (2016). *Arrêté du 8 février 2016 relatif aux mesures de biosécurité applicables dans les exploitations de volailles et d'autres oiseaux captifs dans le cadre de la prévention contre l'influenza aviaire*. AGRG1603907A. <https://www.legifrance.gouv.fr/loda/id/JORFTEXT000032000273/>
- Dhondt, A. A., Dhondt, K. V., & McCleery, B. V. (2008). Comparative infectiousness of three passerine bird species after experimental inoculation with *Mycoplasma gallisepticum*. *Avian Pathology*, 37(6), 635–640. <https://doi.org/10.1080/03079450802499100>
- Dimitrov, K. M., Ramey, A. M., Qiu, X., Bahl, J., & Afonso, C. L. (2016). Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infection, Genetics and Evolution*, 39, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.008>
- Domańska-Blicharz, K., Miłek-Krupa, J., & Pikuła, A. (2021). Diversity of Coronaviruses in Wild Representatives of the Aves Class in Poland. *Viruses*, 13(8), 1497. <https://doi.org/10.3390/v13081497>
- EFSA, ECDC, EURL, Adlhoch, C., Fusaro, A., Gonzales, J. L., Kuiken, T., Marangon, S., Niqueux, É., Staubach, C., Terregino, C., Guajardo, I. M., Lima, E., & Baldinelli, F. (2021). Scientific report: Avian influenza overview December 2020 – February 2021. *EFSA Journal*, 19(3), 74 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6497>
- EFSA, ECDC, EURL, Brown, I., Mulatti, P., Smietanka, K., Staubach, C., Willeberg, P., Adlhoch, C., Candiani, D., Fabris, C., Zancanaro, G., Morgado, J., & Verdonck, F. (2017). Scientific report: Avian influenza overview October 2016–August 2017. *EFSA Journal*, 15(10), 101 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5018>

- Ehricht, R., Slickers, P., Goellner, S., Hotzel, H., & Sachse, K. (2006). Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Molecular and Cellular Probes*, 20(1), 60–63. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.09.003>
- El-Jakee, J. K., Osman, K. M., Ezzeldeen, N. A., Ali, H. A., & Mostafa, E. R. (2014). Chlamydia species in free-living Cattle Egret (*Bubulcus ibis*) and Hoopoe (*Upupa epops*) in Egypt. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 2(1), 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.ijvsm.2013.12.002>
- Ellis, J. W., Root, J. J., McCurdy, L. M., Bentler, K. T., Barrett, N. L., VanDalen, K. K., Dirsmith, K. L., & Shriner, S. A. (2021). Avian influenza A virus susceptibility, infection, transmission, and antibody kinetics in European starlings. *PLoS Pathogens*, 17(8), e1009879. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009879>
- Engering, A., Hogerwerf, L., & Slingenbergh, J. (2013). Pathogen–host–environment interplay and disease emergence. *Emerging Microbes & Infections*, 2(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.5>
- Forrest, H. L., Kim, J.-K., & Webster, R. G. (2010). Virus Shedding and Potential for Interspecies Waterborne Transmission of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Sparrows and Chickens. *Journal of Virology*, 84(7), 3718–3720. <https://doi.org/10.1128/JVI.02017-09>
- Gaidet, N., Cappelle, J., Takekawa, J. Y., Prosser, D. J., Iverson, S. A., Douglas, D. C., Perry, W. M., Mundkur, T., & Newman, S. H. (2010). Potential spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 by wildfowl: Dispersal ranges and rates determined from large-scale satellite telemetry: Potential dispersal of H5N1 HPAI virus by wildfowl. *Journal of Applied Ecology*, 47(5), 1147–1157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01845.x>
- Gaidet, N., Caron, A., Cappelle, J., Cumming, G. S., Balança, G., Hammoumi, S., Cattoli, G., Abolnik, C., Servan de Almeida, R., Gil, P., Fereidouni, S. R., Grosbois, V., Tran, A., Mundava, J., Fofana, B., Ould El Mamy, A. B., Ndlovu, M., Mondain-Monval, J. Y., Triplet, P., ... Dodman, T. (2012). Understanding the ecological drivers of avian influenza virus infection in wildfowl: A continental-scale study across Africa. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1731), 1131–1141. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1417>
- Germeraad, E. A., Elbers, A. R. W., de Bruijn, N. D., Heutink, R., van Voorst, W., Hakze-van der Honing, R., Bergervoet, S. A., Engelsma, M. Y., van der Poel, W. H. M., & Beerens, N. (2020). Detection of Low Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H10N7 in Poultry and Environmental Water Samples During a Clinical Outbreak in Commercial Free-Range Layers, Netherlands 2017. *Frontiers in Veterinary Science*, 7, 237. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00237>
- Guimarães, M., Hurtado, R., Bello, C., Vanstreels, R., & Ferreira, A. (2016). Surveillance for Newcastle Disease Virus, Avian Influenza Virus and Mycoplasma Gallisepticum in Wild Birds Near Commercial Poultry Farms Surrounded by Atlantic Rainforest Remnants, Southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, 18(3), 387–394. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2015-0164>
- Hall, T. (2011). BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bulletin of Biosciences*, 2(1), 60–61.
- Hill, S. C., Hansen, R., Watson, S., Coward, V., Russell, C., Cooper, J., Essen, S., Everest, H., Parag, K. V., Fiddaman, S., Reid, S., Lewis, N., Brookes, S. M., Smith, A. L., Sheldon, B., Perrins, C. M., Brown, I. H., & Pybus, O. G. (2019). Comparative micro-epidemiology of pathogenic avian influenza virus outbreaks in a wild bird population. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1775), 20180259. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0259>

- Hirschinger, J., Marescot, L., Hingrat, Y., Guerin, J. L., Le Loc'h, G., & Vergne, T. (2021). Newcastle disease virus transmission dynamics in wild peridomestic birds in the United Arab Emirates. *Scientific Reports*, *11*(1), 3491. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79184-3>
- Hirschinger, J., Munoz, M. C., Hingrat, Y., Vergne, T., Guerin, J.-L., & Le Loc'h, G. (2020). Exposure to and Circulation of Avian Influenza and Newcastle Disease Viruses in Peridomestic Wild Birds in the United Arab Emirates. *Journal of Wildlife Diseases*, *56*(2), 437. <https://doi.org/10.7589/2019-06-164>
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G., & Perez, D. R. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, *146*(12), 2275–2289. <https://doi.org/10.1007/s007050170002>
- Hulin, V., Bernard, P., Vorimore, F., Aaziz, R., Cléva, D., Robineau, J., Durand, B., Angelis, L., Siarkou, V. I., & Laroucau, K. (2016). Assessment of Chlamydia psittaci Shedding and Environmental Contamination as Potential Sources of Worker Exposure throughout the Mule Duck Breeding Process. *Applied and Environmental Microbiology*, *82*(5), 1504–1518. <https://doi.org/10.1128/AEM.03179-15>
- Huneau-Salaün, A., Schmitz, A., Scoizec, A., Briand, F.-X., Van De Wiele, A., Eterradossi, N., Bouquin, S. L., Niqueux, E., & Troyano-Groux, A. (2020). Bilan de la surveillance de l'Influenza aviaire et de la maladie de Newcastle en France en 2016. *Bulletin Epidémiologique Santé Animale et Alimentation - DGAL - Anses*, *91*, 1–7.
- Jones, B. A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M. Y., McKeever, D., Mutua, F., Young, J., McDermott, J., & Pfeiffer, D. U. (2013). Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and environmental change. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *110*(21), 8399–8404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208059110>
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, *451*(7181), 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Kaleta, E. F., & Taday, E. M. A. (2003). Avian host range of Chlamydophila spp. Based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathology*, *32*(5), 435–462. <https://doi.org/10.1080/03079450310001593613>
- Karamendin, K., Kydyrmanov, A., Kasymbekov, Y., Seidalina, A., Daulbayeva, K., Sayatov, M., & Fereidouni, S. (2020). Evolution of Avian orthoavulavirus 16 in wild avifauna of Central Asia. *Heliyon*, *6*(1), e03099. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e03099>
- Karunakaran, D., Hinshaw, V., Poss, P., Newman, J., & Halvorson, D. (1983). Influenza A Outbreaks in Minnesota Turkeys Due to Subtype H10N7 and Possible Transmission by Waterfowl. *Avian Diseases*, *27*(2), 357–366. <https://doi.org/10.2307/1590162>
- Kim, B.-Y., Lee, D.-H., Kim, M.-S., Jang, J.-H., Lee, Y.-N., Park, J.-K., Yuk, S.-S., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Choi, I.-S., & Song, C.-S. (2012). Exchange of Newcastle disease viruses in Korea: The relatedness of isolates between wild birds, live bird markets, poultry farms and neighboring countries. *Infection, Genetics and Evolution*, *12*(2), 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.004>
- Koch, G., & Elbers, A. R. W. (2006). Outdoor ranging of poultry: A major risk factor for the introduction and development of High-Pathogenicity Avian Influenza. *NJAS - Wageningen Journal of Life Sciences*, *54*(2), 179–194. [https://doi.org/10.1016/S1573-5214\(06\)80021-7](https://doi.org/10.1016/S1573-5214(06)80021-7)
- Krawiec, M., Piasecki, T., & Wieliczko, A. (2015). Prevalence of Chlamydia psittaci and Other Chlamydia Species in Wild Birds in Poland. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *15*(11), 652–655. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1814>

- Le Bouquin, S., Huneau-Salaün, A., Hamon, M., Moisson, M.-C., Scoizec, A., Niqueux, E., Schmitz, A., Briand, F.-X., Van De Wiele, A., & Bronner, A. (2016). L'épisode d'influenza aviaire en France en 2015-2016 – Situation épidémiologique au 30 juin 2016. *Bulletin Epidémiologique Santé Animale et Alimentation - DGAL - Anses*, 75, 1–7.
- Lee, D.-H., Lee, H.-J., Lee, Y.-J., Kang, H.-M., Jeong, O.-M., Kim, M.-C., Kwon, J.-S., Kwon, J.-H., Kim, C.-B., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Choi, I.-S., & Song, C.-S. (2010). DNA Barcoding Techniques for Avian Influenza Virus Surveillance in Migratory Bird Habitats. *Journal of Wildlife Diseases*, 46(2), 649–654. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.2.649>
- Lewis, N. S., Javakhishvili, Z., Russell, C. A., Machabishvili, A., Lexmond, P., Verhagen, J. H., Vuong, O., Onashvili, T., Donduashvili, M., Smith, D. J., & Fouchier, R. A. M. (2013). Avian Influenza Virus Surveillance in Wild Birds in Georgia: 2009–2011. *PLOS ONE*, 8(3), e58534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058534>
- Ley, D. H., Hawley, D. M., Geary, S. J., & Dhondt, A. A. (2016). House Finch (*Haemorrhous mexicanus*) Conjunctivitis, and *Mycoplasma* spp. Isolated from North American Wild Birds, 1994–2015. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(3), 669–673. <https://doi.org/10.7589/2015-09-244>
- Liu, S., Chen, J., Chen, J., Kong, X., Shao, Y., Han, Z., Feng, L., Cai, X., Gu, S., & Liu, M. (2005). Isolation of avian infectious bronchitis coronavirus from domestic peafowl (*Pavo cristatus*) and teal (*Anas*). *Journal of General Virology*, 86(3), 719–725. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80546-0>
- Milek, J., & Blicharz-Domańska, K. (2018). Coronaviruses in avian species – review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. *Journal of Veterinary Research*, 62(3), 249–255. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0035>
- Mine, J., Uchida, Y., Sharshov, K., Sobolev, I., Shestopalov, A., & Saito, T. (2019). Phylogeographic evidence for the inter- and intracontinental dissemination of avian influenza viruses via migration flyways. *PLOS ONE*, 14(6), e0218506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218506>
- Morand, S. (2020). Emerging diseases, livestock expansion and biodiversity loss are positively related at global scale. *Biological Conservation*, 248, 108707. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108707>
- Morens, D. M., & Fauci, A. S. (2020). Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. *Cell*, 182(5), 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.021>
- Munster, V. J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenström, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G. F., Beyer, W. E. P., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2007). Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. *PLOS Pathogens*, 3(5), e61. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030061>
- Munster, V. J., & Fouchier, R. A. M. (2009). Avian influenza virus: Of virus and bird ecology. *Vaccine*, 27(45), 6340–6344. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.082>
- Napp, S., Alba, A., Rocha, A. I., Sánchez, A., Rivas, R., Majó, N., Perarnau, M., Massot, C., Miguel, E. S., Soler, M., & Busquets, N. (2017). Six-year surveillance of Newcastle disease virus in wild birds in north-eastern Spain (Catalonia). *Avian Pathology*, 46(1), 59–67. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1206177>
- Nemeth, N. M., Thomas, N. O., Orahod, D. S., Anderson, T. D., & Oesterle, P. T. (2010). Shedding and serologic responses following primary and secondary inoculation of house sparrows (*Passer domesticus*) and European starlings (*Sturnus vulgaris*) with low-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathology*, 39(5), 411–418. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.513043>
- Oliveros, C. H., Field, D. J., Ksepka, D. T., Barker, F. K., Aleixo, A., Andersen, M. J., Alström, P., Benz, B. W., Braun, E. L., Braun, M. J., Bravo, G. A., Brumfield, R. T., Chesser, R. T., Claramunt, S.,

- Cracraft, J., Cuervo, A. M., Derryberry, E. P., Glenn, T. C., Harvey, M. G., ... Faircloth, B. C. (2019). Earth history and the passerine superradiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 116(16), 7916–7925. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813206116>
- Olsen, B., Munster, V. J., Wallensten, A., Waldenstrom, J., Osterhaus, A. D. M. E., & Fouchier, R. A. M. (2006). Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science*, 312(5772), 384–388. <https://doi.org/10.1126/science.1122438>
- Onuma, M., Kakogawa, M., Yanagisawa, M., Haga, A., Okano, T., Neagari, Y., Okano, T., Goka, K., & Asakawa, M. (2017). Characterizing the temporal patterns of avian influenza virus introduction into Japan by migratory birds. *Journal of Veterinary Medical Science*, 79(5), 943–951. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0604>
- Pauly, M., Snoeck, C. J., Phoutana, V., Keosengthong, A., Sausy, A., Khenkha, L., Nouanthong, P., Samounry, B., Jutavijittum, P., Vilivong, K., Hübschen, J. M., Black, A. P., Pommasichan, S., & Muller, C. P. (2019). Cross-species transmission of poultry pathogens in backyard farms: Ducks as carriers of chicken viruses. *Avian Pathology*, 48(6), 503–511. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1628919>
- Pedersen, K., Marks, D. R., Afonso, C. L., Stopak, S. R., Williams-Coplin, D., Dimitrov, K. M., Miller, P. J., & DeLiberto, T. J. (2016). Identification of Avian Paramyxovirus Serotype-1 in Wild Birds in the USA. *Journal of Wildlife Diseases*, 52(3), 657. <https://doi.org/10.7589/2015-10-278>
- Pérez-Ramírez, E., Rodríguez, V., Sommer, D., Blanco, J. M., Acevedo, P., Heffels-Redmann, U., & Höfle, U. (2010). Serologic Testing for Avian Influenza Viruses in Wild Birds: Comparison of Two Commercial Competition Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Avian Diseases*, 54(s1), 729–733. <https://doi.org/10.1637/8802-040109-ResNote.1>
- Plowright, R. K., Sokolow, S. H., Gorman, M. E., Daszak, P., & Foley, J. E. (2008). Causal inference in disease ecology: Investigating ecological drivers of disease emergence. *Frontiers in Ecology and the Environment*, 6(8), 420–429. <https://doi.org/10.1890/070086>
- R Core Team. (2019). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>
- Rahman, M. M., Talukder, A., Chowdhury, M. M. H., Talukder, R., & Akter, R. (2021). Coronaviruses in wild birds – A potential and suitable vector for global distribution. *Veterinary Medicine and Science*, 7(1), 264–272. <https://doi.org/10.1002/vms3.360>
- Ramírez-Martínez, L. A., Loza-Rubio, E., Mosqueda, J., González-Garay, M. L., & García-Espinosa, G. (2018). Fecal virome composition of migratory wild duck species. *PLOS ONE*, 13(11), e0206970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206970>
- Reiczigel, J., Földi, J., & Ózsvari, L. (2010). Exact confidence limits for prevalence of a disease with an imperfect diagnostic test. *Epidemiology and Infection*, 138(11), 1674–1678.
- Rogan, W. J., & Gladen, B. (1978). Estimating prevalence from the results of a screening test. *American Journal of Epidemiology*, 107(1), 71–76.
- Sergeant, E. S. G. (2018). *EpiTools epidemiological calculators*. Ausvet Pty Ltd. <http://epitools.ausvet.com.au>
- Shriner, S. A., Root, J. J., Lutman, M. W., Kloft, J. M., VanDalen, K. K., Sullivan, H. J., White, T. S., Milleson, M. P., Hairston, J. L., Chandler, S. C., Wolf, P. C., Turnage, C. T., McCluskey, B. J., Vincent, A. L., Torchetti, M. K., Gidlewski, T., & DeLiberto, T. J. (2016). Surveillance for highly pathogenic H5 avian influenza virus in synanthropic wildlife associated with poultry farms during an acute outbreak. *Scientific Reports*, 6(1), 36237. <https://doi.org/10.1038/srep36237>

- Slusher, M. J., Wilcox, B. R., Lutrell, M. P., Poulson, R. L., Brown, J. D., Yabsley, M. J., & Stallknecht, D. E. (2014). Are passerine birds reservoirs for influenza A viruses? *Journal of Wildlife Diseases*, *50*(4), 792–809. <https://doi.org/10.7589/2014-02-043>
- Soon, X., Gartrell, B., & Gedye, K. (2021). Presence and shedding of *Chlamydia psittaci* in waterfowl in a rehabilitation facility and in the wild. *New Zealand Veterinary Journal*, 1–15. <https://doi.org/10.1080/00480169.2021.1915212>
- Swayne, D. E. (Ed.). (2008). *Avian influenza* (1st ed). Blackwell Publishing Ltd.
- Szymańska-Czerwińska, M., Mitura, A., Niemczuk, K., Zaręba, K., Jodełko, A., Pluta, A., Scharf, S., Vitek, B., Aaziz, R., Vorimore, F., Laroucau, K., & Schnee, C. (2017). Dissemination and genetic diversity of chlamydial agents in Polish wildfowl: Isolation and molecular characterisation of avian *Chlamydia abortus* strains. *PLOS ONE*, *12*(3), e0174599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174599>
- Taberlet, P., Prud'Homme, S. M., Campione, E., Roy, J., Miquel, C., Shehzad, W., Gielly, L., Rioux, D., Choler, P., Clément, J.-C., Melodelima, C., Pompanon, F., & Coissac, E. (2012). Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Molecular Ecology*, *21*(8), 1816–1820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05317.x>
- The Global Consortium for H5N8 and Related Influenza Viruses. (2016). Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8. *Science*, *354*(6309), 213–217. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8852>
- Tong, S., Chern, S.-W. W., Li, Y., Pallansch, M. A., & Anderson, L. J. (2008). Sensitive and Broadly Reactive Reverse Transcription-PCR Assays To Detect Novel Paramyxoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(8), 2652–2658. <https://doi.org/10.1128/JCM.00192-08>
- Torrontegi, O., Alvarez, V., Acevedo, P., Gerrikagoitia, X., Höfle, U., & Barral, M. (2019). Long-term avian influenza virus epidemiology in a small Spanish wetland ecosystem is driven by the breeding Anseriformes community. *Veterinary Research*, *50*(1). <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0623-5>
- Van De Wiele, A., Humeau, A., Bronner, A., Guillemain, M., Le Loc'h, G., Guérin, J.-L., Cauchard, J., Mercier, A., & Calavas, D. (2017). Épisode H5N8 d'influenza aviaire en France en 2016-2017: Quel rôle pour la faune sauvage? *Bulletin Épidémiologique Santé Animale et Alimentation - DGAL - Anses*, *79*, 27–31.
- Velkers, F. C., Manders, T. T. M., Vernooij, J. C. M., Stahl, J., Slaterus, R., & Stegeman, J. A. (2020). Association of wild bird densities around poultry farms with the risk of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 outbreaks in the Netherlands, 2016. *Transboundary and Emerging Diseases*, *68*(1), 76–87. <https://doi.org/10.1111/tbed.13595>
- Verhagen, J. H., van der Jeugd, H. P., Nolet, B. A., Slaterus, R., Kharitonov, S. P., de Vries, P. P., Vuong, O., Majoor, F., Kuiken, T., & Fouchier, R. A. (2015). Wild bird surveillance around outbreaks of highly pathogenic avian influenza A(H5N8) virus in the Netherlands, 2014, within the context of global flyways. *Eurosurveillance*, *20*(12). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.12.21069>
- Vorimore, F., Thébault, A., Poisson, S., Cléva, D., Robineau, J., de Barbeyrac, B., Durand, B., & Laroucau, K. (2015). *Chlamydia psittaci* in ducks: A hidden health risk for poultry workers. *Pathogens and Disease*, *73*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu016>
- Wille, M., Avril, A., Tolf, C., Schager, A., Larsson, S., Borg, O., Olsen, B., & Waldenström, J. (2015). Temporal dynamics, diversity, and interplay in three components of the virodiversity of a Mallard population: Influenza A virus, avian paramyxovirus and avian coronavirus.

- Infection, Genetics and Evolution*, 29, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.014>
- Wille, M., & Holmes, E. C. (2020). Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses. *FEMS Microbiology Reviews*, fuaa026. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa026>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lai, K. K. Y., Huang, Y., Lee, P., Luk, G. S. M., Dyrting, K. C., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2009). Comparative Analysis of Complete Genome Sequences of Three Avian Coronaviruses Reveals a Novel Group 3c Coronavirus. *Journal of Virology*, 83(2), 908–917. <https://doi.org/10.1128/JVI.01977-08>
- Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Lam, C. S. F., Lau, C. C. Y., Tsang, A. K. L., Lau, J. H. N., Bai, R., Teng, J. L. L., Tsang, C. C. C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., & Yuen, K.-Y. (2012). Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *Journal of Virology*, 86(7), 3995–4008. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
- Zhuang, Q.-Y., Wang, K.-C., Liu, S., Hou, G.-Y., Jiang, W.-M., Wang, S.-C., Li, J.-P., Yu, J.-M., & Chen, J.-M. (2015). Genomic Analysis and Surveillance of the Coronavirus Dominant in Ducks in China. *PLoS ONE*, 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129256>

Supplementary information

Appendix 1

Appendix 2

Appendix 3

Appendix 4

Appendix 1

Optimization process and final protocols for molecular detection of avian influenza viruses, avulaviruses, coronaviruses and chlamydia.

I. Design and optimization of molecular detection tests

To screen swabs, feces and environmental samples for avulaviruses, coronaviruses and chlamydia, broad range one-step RT-qPCR and qPCR were adapted for primer pairs that were previously described in the literature. To be able to differentiate a wide diversity of strains, protocols were optimized for SYBR Green technology on a LightCycler 96 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland).

I.A. Avulaviruses

To screen for potentially unidentified avulaviruses, a one-step RT-qPCR was adapted from a previously described protocol with AVU-RUB-F1 (5'-GGT TAT CCT CAT TTI TTY GAR TGG ATH CA-3') and AVU-RUB-R (5'-GCA ATT GCT TGA TTI TCI CCY TGN AC-3') primers targeting 200bp of the L gene of *Avulavirinae* and *Rubulavirinae* subfamilies (Tong et al., 2008). Reactions were processed on a LightCycler 96 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland) by using iTaq Universal SYBR green One-Step kit (Biorad, Hercules, CA, USA) following manufacturer's instructions with few modifications described below. Two dilutions of extracted RNA of a cultivated and identified NDV class II virus from a clinical case available at the laboratory were tested, on different annealing temperatures at 45, 50, 55 or 60°C. The highest sensitivity was obtained with an annealing temperature of 55°C, which was then selected for further analyses. The reaction mix used for subsequent analyses then consisted of 2µL of sample RNA, 0.6µL of each 10µM primer (final concentration 0.6µM), 5µL of 2X iTaq reaction mix, 0.125µL of iScript reverse transcriptase, completed with 1.675µL of PCR-grade water for a total reaction volume of 10µL. The thermocycler program consisted of a first 10 min pre-incubation step at 50°C, followed by 1min at 95°C, then 40 amplification cycles including one 95°C step for 15 s, one 55°C annealing step for 15s, and one 60°C step for 1min. A final melting analysis step was then added following manufacturer's instructions. As a quantification control, a plasmid construct was synthesized by GenScript Biotech (Leiden, the Netherlands) including the target L gene sequence from Avian avulavirus 1 isolate duck/U.S./119535-1/2001 retrieved on GenBank (accession number AY626266.1) and adapted for few nucleotides to match the primers' sequences. The selected RT-qPCR protocol was tested on the previous NDV class II dilutions and on this plasmid on a dilution range from 10 to 10⁵ copies/µL to validate its sensitivity (Figure S1), estimated around 10² RNA copies/µL.

I.B. Coronaviruses

To screen for potentially unidentified coronaviruses, a one-step RT-qPCR was adapted from a previously described protocol with AC-CoV-F (5'-GGT TGG GAT TAT CCW AAR TGT G-3') and AC-CoV-R (5'-TGY TGT GAR CAA AAY TCR TG-3') primers targeting 600bp of the polymerase gene of all coronaviruses (Chamings et al., 2018). Reactions were processed on the same machine with the same one-step RT-qPCR kit described for avulaviruses. A first optimization was conducted for annealing temperature on 1/10 dilutions of SARS-CoV-2 RNA (betacoronavirus) and vaccine H52 infectious bronchitis virus (IBV) RNA (gammacoronavirus). The highest sensitivity and least primer self-complementarity was obtained with an annealing temperature of 50°C, which was then selected for further analyses. The reaction mix used for subsequent analyses was the same as for avulaviruses. The thermocycler program was similar to the one for avulaviruses, with an

annealing step at 50°C instead of 55°C. As a quantification control, a plasmid construct including the target sequence from SARS-CoV-2 was built with StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) following manufacturer's instructions. The selected RT-qPCR protocol was tested on two dilutions of the previous H52 IBV RNA and on this plasmid on a dilution range from 10 to 10⁶ copies/μL to validate its sensitivity (Figure S1), estimated around 10 RNA copies/μL.

I.C. Chlamydia

A previously described protocol for pan-chlamydia qPCR using Ch23S-F (5'-CTG AAA CCA GTA GCT TAT AAG CCG T-3') and Ch23S-R (5'-ACC TCG CCG TTT AAC TTA ACT CC-3') primers targeting a portion of the 23S rDNA (Ehrlich et al., 2006) was adapted for SYBR Green technology. Reactions were processed on the same machine as described above, by using LightCycler SYBR Green I Master reaction mix (Roche, Basel, Switzerland) and following manufacturer's instructions. The reaction mix consisted of 2μL of extracted DNA solution, with 0.4μL of each 10μM primer (final concentration of 0.2μM), 10μL of SYBR Green I Master, and completed with 7.2μL of PCR-grade water for a total reaction volume of 20μL. The thermocycler program consisted of a first 5 min pre-incubation step at 95°C, followed by 45 amplification cycles including 10 s at 95°C, 15s at 55°C and 15s at 72°C. A final melting analysis step was then added following manufacturer's instructions. As a quantification control, a plasmid construct including the target sequence from a cultivated *Chlamydia psittaci* was built with StrataClone PCR Cloning Kit (Agilent technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA) following manufacturer's instructions. The selected qPCR protocol was tested on this plasmid on a dilution range from 10 to 10⁶ copies/μL to validate its sensitivity (Figure S1), estimated around 1 DNA copy/μL.

II. Final protocols used in the study for molecular detection and identification of studied infectious agents

All reactions of (RT)qPCR were processed on a LightCycler 96 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland), and conventional (RT)PCR were processed on a peqSTAR thermocycler (Avantor, Radnor, Pennsylvania, USA), following protocols described in Table S1.

References for Appendix 1

- Chamings, A., Nelson, T. M., Vibin, J., Wille, M., Klaassen, M., & Alexandersen, S. (2018). Detection and characterisation of coronaviruses in migratory and non-migratory Australian wild birds. *Scientific Reports*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24407-x>
- Croville, G., Foret, C., Heuillard, P., Senet, A., Delpont, M., Mouahid, M., Ducatez, M. F., Kichou, F., & Guerin, J.-L. (2018). Disclosing respiratory co-infections: A broad-range panel assay for avian respiratory pathogens on a nanofluidic PCR platform. *Avian Pathology*, *47*(3), 253–260. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1430891>
- Ehricht, R., Slickers, P., Goellner, S., Hotzel, H., & Sachse, K. (2006). Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Molecular and Cellular Probes*, *20*(1), 60–63. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.09.003>
- Fouchier, R. A. M., Bestebroer, T. M., Herfst, S., Van Der Kemp, L., Rimmelzwaan, G. F., & Osterhaus, A. D. M. E. (2000). Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. *Journal of Clinical Microbiology*, *38*(11), 4096–4101.
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R. G., & Perez, D. R. (2001). Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Archives of Virology*, *146*(12), 2275–2289. <https://doi.org/10.1007/s007050170002>
- Tong, S., Chern, S.-W. W., Li, Y., Pallansch, M. A., & Anderson, L. J. (2008). Sensitive and Broadly Reactive Reverse Transcription-PCR Assays To Detect Novel Paramyxoviruses. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(8), 2652–2658. <https://doi.org/10.1128/JCM.00192-08>

Figure S1 - Profiles of SYBR Green (RT)qPCR results for sensitivity validation runs on **(A)** Avulavirus-Rubulavirus L gene target sequence (AVU-RUB-F1/AVU-RUB-R), **(B)** Coronavirus polymerase gene target sequence (AC-CoV-F/AC-CoV-R) and **(C)** *Chlamydia spp.* 23S rDNA target sequence (Ch23S-F/Ch23S-R).

For each figure, amplification curves on the left and melting peaks on the right. Red curves are from the negative controls. Other curves represent: **(A)** ten-fold dilutions (10 to 10⁵ copies/μL) of control plasmid with a NDV class I insert (in blue), and two dilutions of RNA from a cultivated NDV class II (in green); **(B)** ten-fold dilutions (10 to 10⁶ copies/μL) of control plasmid with a SARS-CoV-2 insert (in blue) and two dilutions of RNA from a cultivated vaccinal infectious bronchitis virus (in green); and **(C)** ten-fold dilutions (1 to 10³, and 10⁵ copies/μL) of control plasmid with a *Chlamydia psittaci* insert (in blue), and three duck swab samples that were consecutively sequenced as GR9 strain of *C. psittaci* (in green).

Thermocycling programs were ran on a LightCycler 96 thermocycler (Roche, Basel, Switzerland) following protocols described in Table S1.

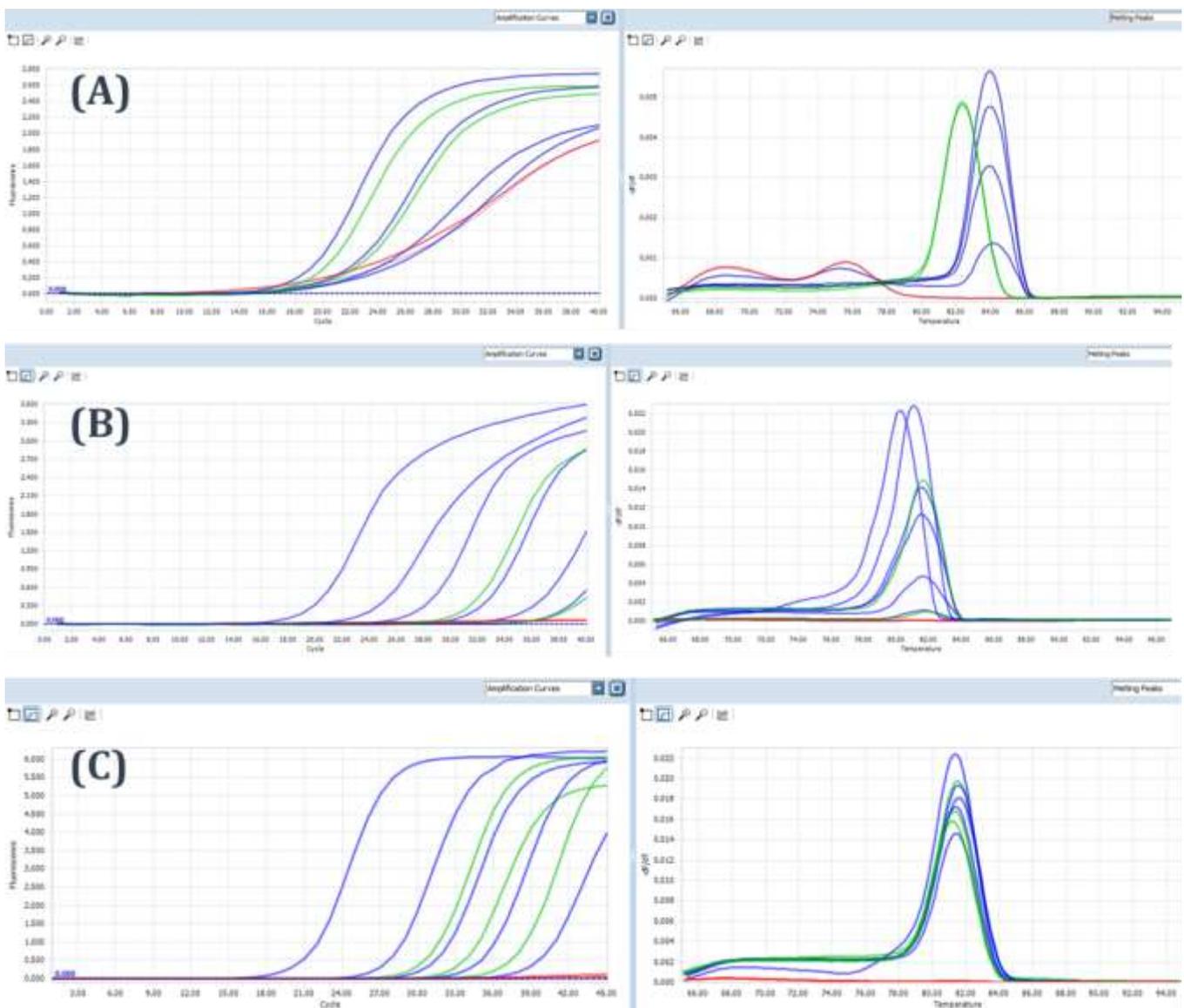


Table S1 – Description of (RT)-qPCR reagents and programs used for molecular screening and identification of infectious agents in the study.

Target agent	Aim of PCR	Target sequence (length)	Primer pair name	Primer pair sequence (5'-3')	Primer reference	
Avian Influenza Viruses (AIV)	Detection	M gene (240bp)	M52C	CTT CTA ACC GAG GTC GAA ACG	(Croville et al., 2018; Fouchier et al., 2000)	
			M253R	AGG GCA TTT TGG ACA AAK CGT CTA		
		Reaction kit	iTaq Universal SYBR green One-Step kit (Biorad, Hercules, CA, USA)			
		Reagent mix	2µL RNA - 0.5µL of each 10µM primer - 5µL of 2X iTaq reaction mix - 0.125µL of iScript reverse transcriptase - 1.875µL of PCR-grade water /10µL total			
		Thermocycling program	10min at 50°C - 1min at 95°C - 40x(15s at 95°C - 1min at 60°C) - melting analysis following manufacturer's instructions			
Expected detection threshold (genetic copies/µL)	10					
AIV	Identification - run 1 (Sanger sequencing)	HA gene (~1800bp)	Bm-HA-1	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG G	(Hoffmann et al., 2001)	
			Bm-NS-890R	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT		
		Reaction kit	QIAGEN OneStep RT-PCR kit (Qiagen, Venlo, the Netherlands)			
		Reagent mix	2µL RNA - 1.5µL of each 10µM primer - 5µL of QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer (5X) - 1µL of 10mM dNTP mix - 1µL of QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix - 13µL of PCR-grade water /25µL total			
		Thermocycling program	30min at 50°C - 15min at 95°C - 5x(30s at 95°C - 30s at 56°C - 1min at 72°C) - 30x(30s at 95°C - 30s at 54°C - 1min at 72°C) - 5x(30s at 95°C - 30s at 52°C - 1min at 72°C) - 5 min at 72°C			
Expected detection threshold (genetic copies/µL)	-					
AIV	Identification - run 2 (Sanger sequencing)	HA gene (~1800bp)	Bm-HA-1	TAT TCG TCT CAG GGA GCA AAA GCA GGG G	(Hoffmann et al., 2001)	
			Bm-NS-890R	ATA TCG TCT CGT ATT AGT AGA AAC AAG GGT GTT TT		
		Reaction kit	KAPA Taq PCR kit (Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA)			
		Reagent mix	2µL run 1 purified 1800bp products - 2µL of each 10µM primer - 2.5µL of KAPA Taq Buffer A (10X) - 0.5µL of 10mM dNTP mix - 0.1µL of KAPA Taq DNA Polymerase (5U/µL) - 15.9µL of PCR-grade water /25µL total			
		Thermocycling program	3min at 95°C - 40x(30s at 95°C - 30s at 53°C - 1.5min at 72°C) - 1 min at 72°C			
Expected detection threshold (genetic copies/µL)	-					

Table S1 – Continued

Target agent	Aim of PCR	Target sequence (length)	Primer pair name	Primer pair sequence (5'-3')	Primer reference
AIV - H6	Identification - run 3	HA gene (240bp)	H6-928	CCA CAT GCC AGA CTA TTG CAG G	This study
			H6-1251	CGA CAG CTT CGA ATT GTG TGT TC	
			Reaction kit	iTaq Universal SYBR green One-Step kit (Biorad, Hercules, CA, USA)	
			Reagent mix	2µL RNA - 0.5µL of each 10µM primer - 5µL of 2X iTaq reaction mix - 0.125µL of iScript reverse transcriptase - 1.875µL of PCR-grade water /10µL total	
			Thermocycling program	10min at 50°C - 1min at 95°C - 40x(15s at 95°C - 1min at 60°C) - melting analysis following manufacturer's instructions	
Expected detection threshold (genetic copies/µL)	10				
Avulaviruses	Detection	L gene (200bp)	AVU-RUB-F1	GGT TAT CCT CAT TTI TTY GAR TGG ATH CA	(Tong et al., 2008)
			AVU-RUB-R	GCA ATT GCT TGA TTI TCI CCY TGN AC	
			Reaction kit	iTaq Universal SYBR green One-Step kit (Biorad, Hercules, CA, USA)	
			Reagent mix	2µL RNA - 0.6µL of each 10µM primer - 5µL of 2X iTaq reaction mix - 0.125µL of iScript reverse transcriptase - 1.675µL of PCR-grade water /10µL total	
			Thermocycling program	10min at 50°C - 1min at 95°C - 40x(15s at 95°C - 15s at 55°C - 1min at 60°C) - melting analysis following manufacturer's instructions	
Expected detection threshold (genetic copies/µL)	10 ²				
Avulaviruses	Identification (Sanger sequencing)	L gene (200bp)	AVU-RUB-F2	ACA CTC TAT GTI GGI GAI CCN TTY AAY CC	(Tong et al., 2008)
			AVU-RUB-R	GCA ATT GCT TGA TTI TCI CCY TGN AC	
			Reaction kit	KAPA Taq PCR kit (Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA)	
			Reagent mix	2µL purified detection run products - 1.5µL of each 10µM primer - 2.5µL of KAPA Taq Buffer A (10X) - 0.5µL of 10mM dNTP mix - 0.1µL of KAPA Taq DNA Polymerase (5U/µL) - 11.9µL of PCR-grade water /20µL total	
			Thermocycling program	3min at 95°C - 40x(30s at 95°C - 30s at 53°C - 1.5min at 72°C) - 1 min at 72°C	
Expected detection threshold (genetic copies/µL)	-				

Table S1 – Continued

Target agent	Aim of PCR	Target sequence (length)	Primer pair name	Primer pair sequence (5'-3')	Primer reference	
Coronaviruses	Detection	polymerase gene	AC-CoV-F	GGT TGG GAT TAT CCW AAR TGT G	(Chamings et al., 2018)	
		(600bp)	AC-CoV-R	TGY TGT GAR CAA AAY TCR TG		
		Reaction kit	iTaq Universal SYBR green One-Step kit (Biorad, Hercules, CA, USA)			
		Reagent mix	2µL RNA - 0.6µL of each 10µM primer - 5µL of 2X iTaq reaction mix - 0.125µL of iScript reverse transcriptase - 1.675µL of PCR-grade water /10µL total			
		Thermocycling program	10min at 50°C - 1min at 95°C - 40x(15s at 95°C - 15s at 50°C - 1min at 60°C) - melting analysis following manufacturer's instructions			
Expected detection threshold (genetic copies/µL)	10					
Coronaviruses	Identification (Sanger sequencing)	polymerase gene	AC-CoV-F	GGT TGG GAT TAT CCW AAR TGT G	(Chamings et al., 2018)	
		(600bp)	AC-CoV-R	TGY TGT GAR CAA AAY TCR TG		
		Reaction kit	KAPA Taq PCR kit (Kapa Biosystems, Wilmington, Massachusetts, USA)			
		Reagent mix	2µL purified detection run products - 1.5µL of each 10µM primer - 2.5µL of KAPA Taq Buffer A (10X) - 0.5µL of 10mM dNTP mix - 0.1µL of KAPA Taq DNA Polymerase (5U/µL) - 16.9µL of PCR-grade water /25µL total			
		Thermocycling program	3min at 95°C - 40x(30s at 95°C - 30s at 53°C - 1.5min at 72°C) - 1 min at 72°C			
Expected detection threshold (genetic copies/µL)	-					
Chlamydia	Detection	23S rDNA (180bp)	Ch23S-F	CTG AAA CCA GTA GCT TAT AAG CGG T	(Ehrlich et al., 2006)	
			Ch23S-R	ACC TCG CCG TTT AAC TTA ACT CC		
		Reaction kit	LightCycler SYBR Green I Master reaction mix (Roche, Basel, Switzerland)			
		Reagent mix	2µL DNA - 0.4µL of each 10µM primer - 10µL of SYBR Green I Master - 7.2µL of PCR-grade water /20µL total			
		Thermocycling program	5min at 95°C - 45x(10s at 95°C - 15s at 55°C - 15s at 72°C) - melting analysis following manufacturer's instructions			
Expected detection threshold (genetic copies/µL)	1					

Appendix 2

Table S2 – Description of positive samples for all four infectious agents.

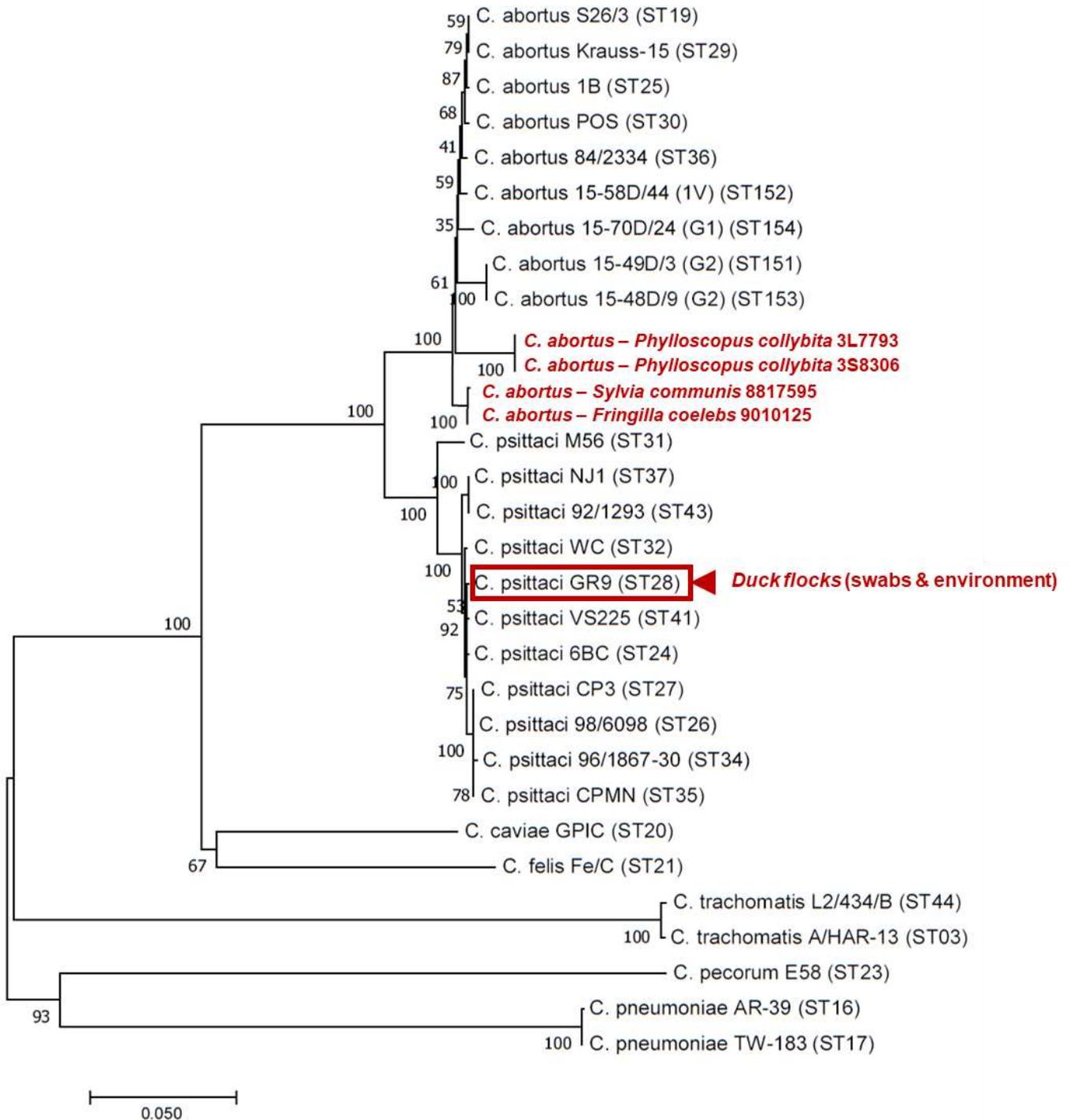
Infectious agent detected	Month (week) and year of sampling	Sample type	Wild bird group (species if known) or duck flock identification (based on those of Table 1) (small letters and colors refer to same wild bird or flock)	Positive detection test and its result (Ct for PCR, competition percentage for ELISA)	Infectious agent identification (identified by sequence or specific test or Reference Laboratory (RL))
AIV	June (24) 2019	Duck flock (regulatory)	C; D	PCR	H7N3 (RL)
	July (30) 2019	Wild (oropharyngeal)	SYL (<i>Sylvia atricapilla</i>)	PCR (33.54)	-
	August (35) 2019	Wild (cloacal)	MUS	PCR (33.65)	-
	August (35) 2019	Wild (oropharyngeal)	PASD (<i>Passer domesticus</i>)	PCR (36.98)	-
	August (35) 2019	Wild (blood)	SYL (<i>Sylvia atricapilla</i>)	ELISA (46.67%)	-
	August (35) 2019	Wild (blood)	MUS (<i>Luscinia megarhynchos</i>)	ELISA (22.98%)	-
	August (35) 2019	Wild (blood)	MUS (<i>Ficedula hypoleuca</i>)	ELISA (43.92%)	-
	October (43) 2019	Wild (cloacal)	MOT (<i>Motacilla alba</i>) i	PCR (33.04)	-
	October (43) 2019	Wild (blood)	MOT (<i>Motacilla alba</i>)	ELISA (33.43%)	-
	October (43) 2019	Wild (blood)	SYL (<i>Sylvia atricapilla</i>)	ELISA (49.24%)	-
	October (43) 2019	Wild (blood)	SYL (<i>Sylvia atricapilla</i>)	ELISA (29.09%)	-
	October (43) 2019	Wild (blood)	TUR (<i>Turdus philomelos</i>)	ELISA (48.14%)	-
	November (48) 2019	Wild (cloacal)	ANT (<i>Anthus sp.</i>)	PCR (34)	-
	November (48) 2019	Wild (oropharyngeal)	PASD (<i>Passer domesticus</i>)	PCR (33.36)	-
	December (52) 2019	Duck flock (cloacal)	K	PCR (34.31)	H6 (sequence)
	January (05) 2020	Environment	M	PCR (32.86)	-
	January (05) 2020	Environment	N	PCR (33.95)	H6 (PCR)
	January (05) 2020	Wild (oropharyngeal)	SYL (<i>Sylvia atricapilla</i>)	PCR (35.48)	-
	January (05) 2020	Wild (oropharyngeal)	FRI (<i>Fringilla sp.</i>)	PCR (36.17)	-
	January (05) 2020	Wild (blood)	PASM (<i>Passer montanus</i>) e	ELISA (39.89%)	-
	February (08) 2020	Duck flock (cloacal)	M	PCR (32.42)	H6 + H11 (sequence)
	February (08) 2020	Duck flock (regulatory)	N	PCR	not H5 or H7 (RL)
	February (09) 2020	Environment	M	PCR (32.98)	H6 (PCR)
	February (09) 2020	Wild (blood)	PASM (<i>Passer montanus</i>) e	ELISA (42.10%)	-
	May (22) 2020	Wild (blood)	MUS (<i>Luscinia megarhynchos</i>)	ELISA (10.18%)	-
	May (22) 2020	Wild (blood)	SYL (<i>Sylvia atricapilla</i>)	ELISA (38.53%)	-

Infectious agent detected	Month (week) and year of sampling	Sample type	Wild bird group (species if known) or duck flock identification (based on those of Table 1) (small letters and colors refer to same wild bird or flock)	Positive detection test and its result (Ct for PCR, competition percentage for ELISA)	Infectious agent identification (identified by sequence or specific test or Reference Laboratory (RL))
	May (22) 2020	Wild (blood)	SYL (<i>Sylvia atricapilla</i>)	ELISA (43.04%)	-
	May (22) 2020	Wild (blood)	TUR (<i>Turdus philomelos</i>)	ELISA (30.10%)	-
	November (46) 2020	Environment	T	PCR (31.81)	H6 (sequence)
	November (46) 2020	Environment	U	PCR (34.04)	H6 (sequence)
	November (46) 2020	Wild (blood)	MUS (<i>Erithacus rubecula</i>)	ELISA (38.45%)	-
	November (46) 2020	Wild (blood)	MUS (<i>Erithacus rubecula</i>)	ELISA (36.44%)	-
	November (46) 2020	Wild (blood)	PASD (<i>Passer domesticus</i>)	ELISA (46.96%)	-
	November (46) 2020	Wild (blood)	PRU (<i>Prunella modularis</i>)	ELISA (32.37%)	-
	November (46) 2020	Wild (blood)	PRU (<i>Prunella modularis</i>)	ELISA (26.78%)	-
	November (46) 2020	Wild (blood)	TUR (<i>Turdus philomelos</i>)	ELISA (45.85%)	-
	December (51) 2020	Environment	T	PCR (34.84)	H6 (PCR)
	December (51) 2020	Environment	V	PCR (35.16)	H6 (PCR)
	December (51) 2020	Environment	W	PCR (31.03)	H6 (PCR)
	December (51) 2020	Wild (blood)	MOT (<i>Motacilla alba</i>)	ELISA (10.22%)	-
	December (51) 2020	Wild (blood)	MOT (<i>Motacilla alba</i>)	ELISA (10.05%)	-
	December (51) 2020	Wild (blood)	MOT (<i>Motacilla alba</i>)	ELISA (9.37%)	-
	February (09) 2021	Wild (feces)	BUB (<i>Bubulcus ibis</i>)	PCR (35.5)	H5 low pathogenic (sequence)
	February (09) 2021	Wild (blood)	ACC (<i>Accipiter nisus</i>)	ELISA (10.54%)	-
	February (09) 2021	Wild (blood)	MOT (<i>Motacilla alba</i>)	ELISA (15.81%)	-
	February (09) 2021	Wild (blood)	PRU (<i>Prunella modularis</i>)	ELISA (38.84%)	-
Avulaviruses	January (05) 2020	Wild (blood)	TUR (<i>Turdus merula</i>) f	ELISA (69.59%)	-
	February (09) 2020	Wild (blood)	TUR (<i>Turdus merula</i>) f	ELISA (56.02%)	-
	December (51) 2020	Wild (blood)	ANT (<i>Anthus pratensis</i>)	ELISA (41.38%)	-
	December (51) 2020	Wild (blood)	MOT (<i>Motacilla alba</i>)	ELISA (65.53%)	-
Coronaviruses	October (43) 2019	Environment	H	PCR (33.3)	Duck igacovirus (sequence)
	November (45) 2019	Duck flock (cloacal)	G	PCR (31.83)	Duck igacovirus (sequence)
	December (52) 2019	Duck flock (cloacal)	K	PCR (38.28)	Duck igacovirus (sequence)
	November (46) 2020	Environment	T	PCR (-)	-
	November (46) 2020	Environment	V	PCR (38.52)	-

Infectious agent detected	Month (week) and year of sampling	Sample type	Wild bird group (species if known) or duck flock identification (based on those of Table 1) (small letters and colors refer to same wild bird or flock)	Positive detection test and its result (Ct for PCR, competition percentage for ELISA)	Infectious agent identification (identified by sequence or specific test or Reference Laboratory (RL))
Chlamydia	July (30) 2019	Wild (oropharyngeal)	PASM (<i>Passer montanus</i>)	PCR (37)	-
	August (35) 2019	Wild (oropharyngeal & cloacal)	AEG (<i>Phylloscopus sp.</i>)	PCR (35.34)	<i>C. abortus</i> avian strain 1(RL)
	August (35) 2019	Wild (cloacal)	SYL (<i>Sylvia communis</i>)	PCR (27)	<i>C. abortus</i> avian strain 2(RL)
	October (43) 2019	Wild (cloacal)	MOT (<i>Motacilla alba</i>) i	PCR (40)	-
	October (43) 2019	Wild (oropharyngeal)	MOT (<i>Motacilla alba</i>)	PCR (39.9)	-
	October (43) 2019	Wild (oropharyngeal)	SYL (<i>Sylvia atricapilla</i>)	PCR (37.25)	-
	December (52) 2019	Duck flock (oropharyngeal & cloacal)	K	PCR (32.66)	<i>C. psittaci</i> GR9 (sequence & RL)
	January (05) 2020	Environment	M	PCR (34.79)	<i>C. psittaci</i> NI
	January (05) 2020	Environment	N	PCR (33.81)	<i>C. psittaci</i> GR9 (RL)
	February (08) 2020	Duck flock (cloacal)	M	PCR (35.32)	<i>C. psittaci</i> GR9 (sequence & RL)
	February (09) 2020	Environment	O	PCR (29.72)	<i>C. psittaci</i> GR9 (RL)
	February (09) 2020	Wild (oropharyngeal)	AEG	PCR (37.9)	-
	February (09) 2020	Wild (cloacal)	FRI (<i>Fringilla coelebs</i>)	PCR (35.5)	<i>C. abortus</i> avian strain 2 (sequence)
	November (46) 2020	Environment	T	PCR (32.92)	<i>C. abortus</i> avian NI (RL)
	November (46) 2020	Environment	U	PCR (35.74)	<i>C. abortus</i> avian NI (RL)
	November (46) 2020	Wild (oropharyngeal)	AEG (<i>Phylloscopus collybita</i>)	PCR (34.81)	<i>C. abortus</i> avian strain 1(RL)
	December (51) 2020	Environment	T	PCR (36.59)	<i>C. abortus</i> avian NI (RL)
	December (51) 2020	Environment	U	PCR (34.59)	<i>C. psittaci</i> GR9 (RL)
	December (51) 2020	Environment	V	PCR (33.47)	<i>C. psittaci</i> GR9 (RL)
	December (51) 2020	Environment	W	PCR (34.41)	<i>C. abortus</i> avian NI (RL)

Appendix 3

Figure S2 – Phylogenetic tree of concatenated sequences (3100 bp) of seven MLST housekeeping gene fragments (*enoA*, *fumC*, *gatA*, *gidA*, *hemN*, *hlfX*, and *oppA*) for chlamydia strains identified in this study (in red) and established Chlamydiaceae species. Sequence types (ST) are given between brackets.



Appendix 4

Table S3 – Population sensitivity for each time of wild bird sampling. For each sample size, sensitivity calculation is based for each test on its estimated individual sensitivity (PCR 0.99, ELISA 0.9) and specificity (PCR 1, ELISA 0.9), with a confidence level of 95%.

Year	Month	Week	Swabs	Feces (cattle egrets)	Sample size swabs/feces	Population sensitivity PCR	Sample size blood	Population sensitivity ELISA
2019	July	30	184		184	1.60%	0	-
	August	35	256		256	1.20%	121	2.70%
	October	43	240	30	270	1.10%	142	2.30%
	November	48	184	30	214	1.40%	75	4.4%
2020	January	5	225		225	1.30%	112	2.90%
	February	9	141		141	2.10%	88	3.7%
	May	22	168		168	1.80%	140	2.40%
	November	46	225		225	1.30%	147	2.20%
	December	51	47	70	117	2.60%	40	8.0%
2021	February	6		25	25	11.4%	0	-
	February	9	51	50	101	3.00%	40	8.0%
	March	12	10		10	26%	5	50%

d. Discussions

L'étude de surveillance longitudinale présentée ici autour de l'interface entre avifaune et élevage de canards comporte des approches originales pour ce type de contexte et sur différents plans. Il s'agit en effet d'un suivi infectieux à une échelle très réduite et sur près d'un an et demi, qui a donc permis d'évaluer les dynamiques infectieuses dans les populations étudiées. Peu d'études sont basées sur ce type de suivi « micro-épidémiologique » détaillé d'hôtes aviaires, mais on peut citer par exemple une étude du portage de chlamydia sur des lots de canards (Hulin et al., 2016; Vorimore et al., 2015), une étude s'intéressant aux VIA chez des cygnes sauvages (Hill et al., 2019) et une étude portant sur les NDV chez diverses espèces commensales d'un élevage (Hirschinger et al., 2021). Le suivi en parallèle des différents compartiments de l'interface dans le contexte d'un élevage avicole est aussi une originalité. La triade avifaune, volailles, environnement est en effet rarement entièrement considérée en conditions réelles, où au plus deux des compartiments ont été étudiés en parallèle (Germeraad et al., 2020; Hirschinger et al., 2020; Shriner et al., 2016). Cette triade a pourtant été étudiée en conditions expérimentales (Ellis et al., 2021; Forrest et al., 2010) et présente un intérêt certain pour la caractérisation des échanges infectieux à l'interface avifaune-élevages. Enfin, l'originalité réside aussi dans l'étude épidémiologique de la population d'avifaune commensale autour d'un élevage avicole, qui est rarement considérée en comparaison d'autres populations d'avifaune (notamment aquatique) (Arenas et al., 1990; Brown et al., 2010; Hill et al., 2019; Lewis et al., 2013; Napp et al., 2017; Onuma et al., 2017; Torrontegi et al., 2019). Très peu d'études concernent donc l'avifaune commensale d'élevages avicoles n'ayant pas de liens proches avec des littoraux ou zones humides, et celles-ci ont en outre été réalisées dans d'autres contextes géographiques et d'élevage (Guimarães et al., 2016; Hirschinger et al., 2020; Shriner et al., 2016).

Les prévalences observées sur les différentes espèces sauvages et domestiques étudiées ici correspondent aux valeurs attendues dans ces populations en contexte non épidémique. En effet, les prévalences de VIA déjà détectées chez les passereaux et autres espèces terrestres sont faibles à nulles avec des sous-types variés (Caron et al., 2017; Hirschinger et al., 2020; Slusher et al., 2014), tandis que les séroprévalences sont légèrement plus élevées (Arenas et al., 1990; Hirschinger et al., 2020; Pérez-Ramírez et al., 2010; Slusher et al., 2014). Dans le compartiment domestique, les canards gras en Europe sont aussi fréquemment porteurs de VIAFP et notamment de sous-types H6 et H11 comme ceux identifiés dans cette étude (Cherbonnel et al., 2007; Marinova-Petkova et al., 2016). Les résultats de détection moléculaire et sérologique d'avulavirus et NDV sont aussi attendus, puisque le secteur de volailles commerciales en France est officiellement indemne de NDV (Huneau-Salaün et al., 2020) et que les Passériformes majoritaires dans les prélèvements sont rarement infectés par ces virus contrairement aux Ansériformes ou Columbiformes (Hirschinger et al., 2020; Napp et al., 2017; Pedersen et al., 2016). Cependant, quelques lots de canards gras en France ont parfois pu être trouvés fortuitement porteurs de NDV faiblement pathogènes (Cherbonnel et al., 2007), ce qui n'a pas été le cas ici. Concernant les

coronavirus, le genre Gammacoronavirus est le plus largement répandu dans l'avifaune aquatique avec une grande diversité de souches et des prévalences parfois élevées (de Sales Lima et al., 2015; Wille and Holmes, 2020b), ce qui se rapproche des résultats observés ici chez les canards domestiques. En revanche l'avifaune terrestre est plus rarement infectée et plutôt avec des Deltacoronavirus (Wille and Holmes, 2020b; Woo et al., 2009), ce qui étaye l'absence de détection de coronavirus faite dans l'avifaune commensale ici. Enfin concernant les chlamydia, l'excrétion fréquente et à de fortes prévalences intra-lot de *C. psittaci* chez des canards gras français a déjà été montrée (Hulin et al., 2016; Vorimore et al., 2015), comme dans l'étude présente. Dans l'avifaune, les Passériformes sont de façon attendue plus rarement porteurs de *C. psittaci* en comparaison d'autres ordres, mais peuvent présenter aussi bien que l'avifaune aquatique des prévalences élevées de *C. abortus* (Krawiec et al., 2015; Szymańska-Czerwińska et al., 2017). Comme cette dernière espèce a été aussi détectée dans un des prélèvements environnementaux, il est alors surprenant de ne pas l'avoir identifiée dans les écouillons de canards, ce qui aurait pu indiquer des échanges avec l'avifaune commensale. Cela doit toutefois être interprété en considérant que tous les lots de canards n'ont pas fait l'objet de recherche de chlamydia en même temps que les prélèvements environnementaux, et que tous les chlamydias détectés n'ont pas pu être identifiés.

L'étude présentée ici a donc mis en évidence des prévalences et typages d'agents infectieux distincts entre les compartiments de l'interface sauvage-domestique. De façon similaire, les évolutions temporelles des niveaux de prévalence dans l'avifaune et dans les lots de canards ont semblé distinctes. En particulier pour les VIA, les prévalences et charges virales parfois élevées chez les canards ainsi que dans leur environnement n'ont pas semblé induire de variation significative des prévalences chez l'avifaune commensale. Et les quelques VIA identifiés chez les canards n'ont pas été détectés (sous-type H6) dans l'avifaune. L'absence d'identification des VIA dans l'avifaune limite les conclusions quant aux potentielles transmissions depuis ou vers les canards, et semble liée à des difficultés techniques relatives aux méthodes de détection employées. En effet, l'infection virale sur des espèces peu sensibles, asymptomatiques et de petite taille produit des faibles charges virales dans les prélèvements ainsi qu'une brève fenêtre temporelle d'excrétion (Caron et al., 2017; Slusher et al., 2014). À méthodes de prélèvement et d'analyse identiques, les détections moléculaires de VIA sont donc plus rares et les typages plus compliqués (charges plus faibles) que dans les hôtes réservoirs sauvages ou domestiques (Munster et al., 2007; Slusher et al., 2014). Ces limites intrinsèques à l'étude de l'avifaune terrestre engendrent des difficultés particulières pour établir avec certitude leur rôle épidémiologique vis-à-vis des VIA. Elles sont en outre renforcées par les contraintes techniques à l'obtention des prélèvements (par captures en général) qui ont été aussi observées dans l'étude présentée ici, limitant la taille d'échantillon et orientant le type d'espèces ciblées (FAO, 2007; Whitman et al., 1997). Cependant, l'analyse de sensibilité réalisée sur la population totale de l'avifaune a montré que les seuils de prévalence détectables à plus de 95% de confiance avec les tailles d'échantillons obtenues étaient inférieurs à 3% en PCR et 8% en sérologie. Un éventuel épisode épidémique dans l'avifaune commensale pour l'un des agents infectieux étudiés aurait

donc été certainement détecté. Cela conforte aussi les faibles niveaux de prévalence virologique et sérologique observés dans l'avifaune. Prenant tous ces éléments en compte dans un contexte endémique, le rôle de l'avifaune commensale dans les épisodes d'IAHP en élevages semble donc mineur. Il est plutôt probable que ces espèces soient responsables d'introductions de VIA très sporadiquement en élevages, jouant alors potentiellement le rôle d'hôtes relais très irréguliers. Ces événements sporadiques seraient donc difficilement détectables même avec les tailles d'échantillon présentées ici, du fait de la courte durée d'excrétion et de la sensibilité imparfaite des méthodes de détection. Les niveaux faibles de prévalence sérologique pour les VIA indiquent d'ailleurs une absence probable de maintien et même de circulation virale au sein de ces populations d'avifaune commensale.

Comme évoqué précédemment, il est possible que la sensibilité de détection des VIA par les méthodes utilisées dans cette étude soit partiellement limitantes pour une détection fine des transmissions virales à l'échelle des populations échantillonnées. En effet, le nombre important d'échantillons prélevés en un court laps de temps (une session de trois jours de captures) a nécessité d'appliquer des méthodes de criblage adaptées pour optimiser le temps et le coût des analyses. Ces méthodes impliquaient notamment de conserver les prélèvements en solution isotonique sur glace (+4 °C) le temps des sessions de capture, afin de les grouper une fois au laboratoire par lots de cinq individus avant de congeler les prélèvements et leurs descendants (ARN purifiés) à -80 °C. Ce type de protocole est cependant nécessaire pour éviter les congélations successives d'échantillons individuels très dégradantes pour l'ARN (OIE, 2021b; Spackman et al., 2013), et serait théoriquement adapté (même jusqu'à 10 individus groupés) pour les études de criblage de VIA sans altérer outre mesure la sensibilité de détection (Fereidouni et al., 2012; OIE, 2021b; Spackman et al., 2013). La méthode de détection du gène M de VIA par RT-qPCR employée pourrait alors être en cause dans la limitation de sensibilité, mais il est communément admis que celle-ci est la plus sensible connue et qu'elle fait référence mondialement (Crovilla et al., 2018; Fouchier et al., 2000; OIE, 2021b). Pour conforter la qualité des méthodes de prélèvement et d'analyse, il faut rappeler en outre qu'elles ont été similaires pour les prélèvements issus des canards ou de l'environnement, qui ont révélé des charges et prévalences infectieuses bien supérieures. Il y a donc certainement bien une différence effective des profils infectieux entre compartiments et il est alors probable que les éventuelles limites de sensibilité dans l'avifaune commensale étudiée soient essentiellement dues aux facteurs intrinsèques à l'épidémiologie des VIA dans ces espèces (prévalence, charge et durée d'excrétion faibles) (Caron et al., 2017; Munster et al., 2007). Cela expliquerait aussi l'absence de détection de VIA dans l'avifaune commensale même en contexte d'épidémie d'IAHP dans les élevages environnants (Shriner et al., 2016; Van De Wiele et al., 2017).

Les VIA étant donc très difficiles à étudier finement dans la population d'avifaune commensale, l'approche présentée dans cette étude se proposait d'utiliser divers moyens pour accroître les probabilités de détection d'échanges infectieux. La collecte de prélèvements de natures variées directement sur les individus ou bien dans leur environnement a été déjà un premier pilier pour renforcer la robustesse des

recherches de VIA (Blagodatski et al., 2021). En effet, cette approche a d'abord permis de cumuler pour chaque individu les chances de détection d'une excrétion oropharyngée ou cloacale, jugée plus sensible pour la recherche VIA (Caron et al., 2017). Les prélèvements sanguins sur l'avifaune ont aussi permis d'étendre la fenêtre de détection des infections de VIA, de quelques jours en recherche virale (RT-PCR) à quelques semaines à mois en sérologie (Bosco-Lauth et al., 2019; Brown et al., 2009; Ellis et al., 2021; Nemeth et al., 2010). Enfin, les prélèvements de fèces de hérons garde-boeufs ont permis d'étendre la taille d'échantillon pour cette espèce qui s'est avérée comme dans d'autres études difficile à capturer en grands nombres (Caron et al., 2014). Un deuxième pilier pour accroître la robustesse des détections d'échanges infectieux entre compartiments de l'interface a été l'étude d'autres agents infectieux viraux et bactériens en tant que marqueurs de voies de transmission. Ces agents (avulavirus, coronavirus et chlamydia) sont en effet transmis par des voies comparables aux VIA, et présentent comme ceux-ci un spectre d'hôtes large (incluant en particulier les Anatidés), mais des prévalences et des persurances (d'excrétion et environnementale) généralement supérieures (Dimitrov et al., 2016; Kaleta and Taday, 2003; Wille and Holmes, 2020a). Les méthodes de biologie moléculaire actuelles permettent aussi de les détecter et de les identifier de manière fine afin de caractériser d'éventuelles similarités de souches entre compartiments, suggérant des voies d'échanges infectieux dont les VIAHP pourraient aussi occasionnellement bénéficier. Parmi ces marqueurs, les coronavirus et avulavirus n'ont été détectés que dans l'un des compartiments de l'interface étudiée, et se sont donc avérés non pertinents pour révéler des échanges infectieux. Au contraire, les chlamydias ont été détectés dans les deux populations de l'interface ainsi que dans l'environnement. Comme pour les VIA, les identifications moléculaires de chlamydia (par PCR HRM ou séquençage de produits de PCR) ont été souvent limitées par les faibles charges infectieuses dans l'avifaune et l'environnement, ne permettant pas de mettre en évidence des similarités de souches communes avec les canards. Ce genre bactérien semble donc prometteur pour une étude en tant que marqueur infectieux à l'interface avifaune-élevage, mais comme pour les VIA les méthodes d'identification ont encore besoin d'être améliorées lors de faibles charges bactériennes comme celles que présentent l'avifaune ou l'environnement.

L'environnement extérieur des lots de canards a montré globalement un profil de détection et d'identification infectieuses similaire à celui des écouvillons trachéaux et cloacaux réalisés sur les canards. Seul un des parcours a présenté une souche non identifiée de *C. abortus*, espèce non détectée dans les écouvillons de canards, mais aucun écouvillon n'a été prélevé dans le lot occupant ce parcours pour confirmer que la bactérie provenait ou non de canards excréteurs. Ainsi, les prélèvements environnementaux réalisés en de multiples points au niveau des zones les plus fréquentées par les canards ont semblé représenter un bon moyen d'obtenir une image assez fidèle du profil infectieux des lots de canards. Outre la validation de ce moyen de prélèvement complémentaire pour accroître à moindre coût et temps la taille d'échantillon par rapport aux écouvillons sur les canards, cette approche a permis aussi de caractériser la contamination infectieuse de l'environnement extérieur partagé par les

canards et l'avifaune commensale. Ainsi, tout agent infectieux identifié dans les flaques ou les surfaces des parcours, qu'il provienne d'un hôte excréteur sauvage ou domestique, a des chances d'infecter les canards ou l'avifaune commensale particulièrement exposés à ces zones (Germeraad et al., 2020). Que ce soit par absence effective de transmissions ou du fait des limitations précédemment évoquées (dans l'identification des souches en particulier), ce type d'évènement n'a cependant pas pu être mis en évidence dans cette étude. Les prélèvements n'ayant pas été réalisés à l'extérieur des parcours, il n'est pas possible d'étendre la constatation de la contamination environnementale due à l'élevage au-delà des parcours. Mais la grande surface des parcours et l'intensité des contacts de l'avifaune qui a été objectivée lors de l'étude écologique des interfaces de cette étude suffisent à suggérer le potentiel risque infectieux que représente l'élevage pour l'avifaune commensale réceptive. Il est donc très probable qu'en cas d'infection par des VIA et notamment des VIAHP chez des canards d'élevage maintenus en extérieur, la pression infectieuse extérieure expose fortement l'avifaune commensale. C'est ensuite les capacités de déplacement de ces espèces qui en feront ou non de bons hôtes relais vers d'autres populations aviaires (sauvages ou domestiques) dans leur courte durée d'excrétion virale (ou de survie) (Caron et al., 2015).

Enfin, malgré les limites évoquées précédemment, certains agents infectieux ont été détectés par voie directe (RT-PCR, PCR) ou indirecte (ELISA) sur l'avifaune commensale de l'élevage, et y compris sur des espèces ciblées suite à l'étude des contacts avec l'élevage (moineaux, bergeronnettes, pinsons). Cette population est donc capable d'héberger et excréter des agents infectieux auxquels les volailles d'élevage sont aussi réceptives (voire potentiellement sensibles). L'avifaune commensale représente donc une population d'hôtes d'intérêt, mais participant à des échanges infectieux semble-t-il plutôt sporadiques et diffus au regard de l'intensité de leur exposition par les contacts avec l'élevage. Si aucune majoration significative de prévalence n'a été observée ici chez les espèces cibles, et ce même lorsque les canards et leur environnement étaient fortement chargés (VIAFP, chlamydia), le contexte d'une épidémie de VIAHP chez les canards non confinés (situation que la réglementation sanitaire française permet d'éviter actuellement) pourrait représenter une épidémiologie tout autre dans l'avifaune du fait de la forte infectiosité de ces virus. Ainsi, après avoir précédemment identifié le rôle central de la Bergeronnette grise dans le réseau d'interactions entre les canards de l'élevage et l'avifaune, et après avoir détecté des portages de VIA (ARN et anticorps), de NDV (anticorps) et de chlamydia (ADN) dans cette espèce, des investigations plus détaillées pour évaluer son potentiel rôle d'hôte relais dans ce contexte semblent nécessaires.

C. Modalités de contacts et d'échanges entre avifaune sauvage et élevages avicoles

Les méthodes d'observations et de captures mises en place sur l'élevage d'étude ont permis de caractériser la population d'avifaune commensale et ses interactions avec les canards élevés en plein air. Ces études écologiques ont alors permis de cibler pour l'étude infectieuse les espèces d'intérêt épidémiologique. Elles ont aussi permis *a posteriori* d'analyser les résultats de l'étude infectieuse par rapport aux interactions objectivées. La complémentarité des deux phases d'étude est donc essentielle. Cependant, il semble nécessaire d'apporter des informations supplémentaires pour mieux évaluer les liens épidémiologiques que constitue l'avifaune commensale de l'élevage. Ainsi, des approches par des techniques alternatives ont été développées, visant pour l'une à détecter de manière plus exhaustive les espèces de l'avifaune visitant les parcours à proximité des canards, et pour l'autre à caractériser les déplacements individuels de bergeronnettes grises depuis l'élevage. Ces approches ont été développées en fin de thèse pour répondre à des questions et à des limites posées par les précédentes méthodes. Cette partie vise donc principalement à présenter les développements méthodologiques, les résultats préliminaires et les perspectives à l'échelle de l'élevage d'étude et d'une application plus généralisée à des études d'interfaces avifaune-élevages.

I. Détection moléculaire des espèces sauvages dans l'environnement extérieur d'un élevage avicole plein air

a. Introduction

Si certaines méthodes de prélèvements biologiques utilisées pour ce projet permettent de réduire efficacement le temps du travail de terrain (prélèvements environnementaux ou de fèces), les méthodes décrites d'études écologiques classiques par observations ou captures sont très chronophages pour arriver à des données statistiquement exploitables. D'autres inconvénients de ces méthodes évoqués précédemment en limitent l'usage généralisé : personnel compétent en identifications ornithologiques et captures mobilisé toute la durée de l'étude sur le terrain, matériel coûteux et spécifique, dérangement provoqué par la présence des observateurs ou manipulateurs, biais d'observation ou de captures pour certaines espèces ou à certaines périodes de l'année, contrainte réglementaire pour obtenir l'autorisation de capturer. Outre ces biais de détection qu'il est possible d'atténuer partiellement, ces méthodes d'inventaire se déroulent à instant donné et peuvent donc aussi manquer des espèces présentes à une autre période (nuit, autre journée que celle de la visite sur le site...). Ainsi, les prélèvements environnementaux réalisés sur le site pour rechercher des agents infectieux ont aussi été exploités pour rechercher des espèces aviaires présentes sur les parcours des canards et potentiellement hôtes des agents infectieux identifiés. En effet, ces techniques de « métabarcoding » sur l'ADNe se développent depuis quelques années avec la démocratisation progressive des biotechnologies de séquençage à haut débit (Taberlet et al., 2018) . Cependant, la nouveauté de ces méthodes et le vaste champs d'applications

fait que les protocoles ne sont pas encore standardisés pour un type de prélèvement et une analyse donnée, ce d'autant plus dans le contexte rarement abordé d'un élevage (Lijtmaer et al., 2012; Taberlet et al., 2018). Un gros travail préalable de mise au point méthodologique est donc nécessaire avant toute application. Le principe du métabarcoding est dans notre contexte d'aller amplifier spécifiquement par PCR une ou des séquences marqueurs spécifiques des oiseaux (les « codes-barres ») dans les prélèvements environnementaux. Le séquençage à haut débit des codes-barres amplifiés, contenant une portion de séquence variable entre espèces, permet alors d'identifier les différentes espèces aviaires ayant déposé leur ADN lors d'un passage dans les parcours (voir *Détection moléculaire de l'avifaune - p 63*). Les avantages de cette méthode appliquée en élevage sont divers, elle permet notamment : l'objectivation des hôtes ou de leurs excréments physiquement présents au lieu de prélèvement (contacts directs et indirects), la détection parallèle des hôtes et des agents infectieux dans un même prélèvement, l'accumulation temporelle d'informations jusqu'à quelques semaines dans un prélèvement, l'affranchissement en grande partie des compétences ornithologiques de terrain pour recenser les espèces présentes. Quelques inconvénients existent cependant avec cette méthode qu'il convient de contourner ou minimiser. Le premier est lié au contexte d'élevage avicole : les canards domestiques (hôtes aviaires également) sont bien plus abondants que l'avifaune et leur ADN risque de saturer les réactions d'amplification et de séquençage (Huggins et al., 2020; Taberlet et al., 2018; Vestheim and Jarman, 2008). Ensuite, selon la séquence ciblée, les bases de données de référence permettant l'identification ne sont pas encore complètes ce qui peut réduire la précision taxonomique (Lijtmaer et al., 2012; Taberlet et al., 2018). De ce fait il est nécessaire d'analyser les résultats avec un regard critique quant à la réelle distribution géographique et temporelle des espèces identifiées par leurs séquences, voire de confronter ces données moléculaires à quelques visites complémentaires de recensement ornithologique de terrain. Enfin, les protocoles de laboratoire et d'analyse bioinformatique des données de séquençage sont complexes et les résultats sensibles à la qualité du processus qui doit être adapté à la matrice initiale et aux questions de recherche, ce qui nécessite alors des compétences particulières dans ces domaines. Le matériel de laboratoire (consommables et machines) relativement spécifique à ces méthodes de biologie moléculaire de pointe est de moins en moins coûteux mais reste aussi réservé à un nombre restreint de laboratoires qui en ont un usage régulier, constituant souvent des plateformes partagées de biotechnologies à l'échelle régionale. Le contexte d'un élevage avicole, les matrices complexes utilisées d'eaux et chiffonnettes de surfaces, le besoin de détecter de la façon la plus exhaustive possible des séquences minoritaires, ainsi que la nécessité d'analyser le plus rapidement et finement possible un nombre important d'échantillons constituent des contraintes spécifiques à notre projet dont il fallait d'abord tenir compte pour mettre au point un protocole de métabarcoding adapté. Les premières étapes du processus menant à l'amplification des séquences codes-barres étant essentielles dans la qualité du séquençage et de l'analyse ultérieurs, et étant aussi les plus dépendants du contexte et de la matrice considérés, il était important de commencer par se focaliser sur le développement de ces

méthodes. Ces travaux de mise au point méthodologique ont été essentiellement réalisés dans le cadre de la thèse d'exercice vétérinaire de François Aubin soutenue à Toulouse en 2020 (Aubin, 2020). L'application des protocoles ainsi établis aux prélèvements environnementaux de l'élevage d'étude a été réalisée, et l'optimisation est toujours en cours, au moment de la rédaction du manuscrit, sur la seconde phase de séquençage à haut débit des échantillons préparés. La partie suivante présente donc essentiellement le développement de la méthode plutôt que son application finale pour compléter l'étude de l'interface.

b. Matériel et méthodes

Optimisation du protocole d'amplification des séquences

La première partie du travail d'optimisation a porté sur le protocole d'amplification par PCR, et notamment le choix des séquences codes-barres ciblées. Pour ce faire, des matrices simples et riches en ADN cible ont été utilisées afin de s'affranchir des difficultés liées à un traitement préparatoire sous-optimal. Des prélèvements de muscles ont donc été collectés sur une sélection de quelques espèces d'oiseaux de différents ordres taxonomiques communément présents sur l'élevage d'étude du Gers : merle noir pour les Passériformes, tourterelle turque et pigeon biset pour les Columbiformes, et buse variable pour les Accipitriformes. En plus de ceux-ci, un prélèvement a été fait sur une perruche (conure de Molina, *Pyrrhura molinae*) afin de disposer d'un témoin positif exotique permettant de distinguer une contamination interne lors du séquençage. Ces individus sont tous des animaux morts dans le cadre de l'activité clinique du centre de soins de la faune sauvage de l'École Nationale Vétérinaire de Toulouse (ENVT). Les échantillons individuels de muscle ont été traités simplement par broyage de 25 mg en tubes à billes céramiques, puis avec le kit de purification d'ADN One-4-All Genomic DNA Miniprep (Bio Basic Inc., Markham, Canada) suivant les recommandations du fabricant pour les tissus frais. L'ADN ainsi extrait et purifié a été ensuite amplifié par différents protocoles de PCR conventionnelles décrits dans la littérature pour des applications de barcoding sur les oiseaux, ciblant le gène de la Cytochrome Oxydase I (COI) de l'ADN mitochondrial (Tableau 3). L'avantage de cette cible moléculaire est la disponibilité d'une vaste base de données de séquences de référence en ligne sur GenBank, constituée et progressivement enrichie à partir de spécimens de muséums (projet du consortium International Barcode of Life (IBOL) notamment), et permettant une identification rapide et précise des séquences amplifiées par comparaison avec ces références.

Tableau 3 - Description des amorces considérées pour amplifier les codes-barres par PCR conventionnelle.

Amorce	Séquence (5'-3')	Type d'amorce	Taille du produit (pb)	Gène ciblé	Source amorces	Source protocole
BirdF1	TTCTCCAACCACAAAGACATTGGCAC	Sens (S)	700	COI	Hebert et al., 2004	Cheung et al., 2009
BirdR1	ACGTGGGAGATAATTCCAAATCCTG	anti-sens (AS)				
LTyr	TGTA AAAAGGWCTACAGCCTAACGC	S externe	700	COI	Tavares and Baker, 2008	Cheung et al., 2009 (hybridation 50 °C)
COI907aH2	GTRGCNGAYGTRAARTATGCTCG	AS externe				
COIaRt	AACAAACCACAAAGATATCGG	S interne	670	interne		Cheung et al., 2009
COI748Ht	TGGGARATAATTCCRAAGCCTGG	AS interne				
PasserF1	CCAACCACAAAGACATCGGAACC	S	650	COI	Lohman et al., 2009	
PasserR1	GTAAACTTCTGGGTGACCAAAGAATC	AS				

Les protocoles de PCR ont été réalisés en suivant ceux décrits dans les publications d'origine (Tableau 3) à l'aide du kit KAPA Taq (Kapa Biosystems, Inc., Wilmington, Massachusetts, USA), utilisé selon les recommandations du constructeur pour 23 µL de mélange de réactifs (dont 1 µL de chaque amorce à 10 µM) et 2 µL de solution d'ADN matrice. Les produits de PCR ont été visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose, et les bandes de taille attendue découpées avant d'être purifiées à l'aide d'un kit Qiagen Gel Extraction (Qiagen, Venlo, Pays-Bas). Une PCR nichée avec les amorces COIaRt / COI748Ht a été faite de façon similaire au protocole décrit (Tableau 3) à partir des produits de première PCR réalisée avec LTyr / COI907aH2. Les produits étant originaires d'une unique espèce chacun et pour vérifier leur qualité, ils ont été simplement séquencés par une méthode Sanger (rapide et très fidèle) par un laboratoire prestataire. Ces séquences ont été visualisées sur le logiciel BioEdit (Hall, 2011) pour attester de leur qualité, et ont été confrontées à la base de données en ligne GenBank afin de confirmer leur résolution d'identification. Étant donnée la complétude de la base de données de référence pour ces cibles de séquençage, et la longueur importante des séquences analysées, l'espèce d'origine de chaque prélèvement a été identifiée si la séquence analysée était identique au moins à 98% à la séquence de référence. Si plusieurs espèces correspondaient au critère, celle avec la similarité de séquence la plus élevée a été sélectionnée. Si encore plusieurs espèces correspondaient au critère, les aires de distribution géographique des espèces étaient comparées à la région d'origine du prélèvement.

Dans un second temps, différents protocoles d'amplification par qPCR ont été évalués sur les mêmes échantillons de muscles, ceci dans le but de simplifier, d'accélérer et de rendre plus sûre vis-à-vis des contaminations croisées (PCR nichée) la phase d'amplification de codes-barres. Comme des produits plus courts sont nécessaires pour ce type de méthode, il a été opté pour des couples d'amorces ciblant des portions de gènes mitochondriaux très courtes (Tableau 4), mais théoriquement hautement spécifiques des oiseaux et résolutive taxonomiquement (Taberlet et al., 2018). L'avantage aussi de l'amplification de courts fragments en comparaison des précédents était qu'un ADN d'avantage dégradé (donc

fragmenté) pouvait être encore détecté, allongeant ainsi le délai de détectabilité des espèces après leur passage.

Tableau 4 - Description des amorces considérées pour amplifier les codes-barres par PCR en temps réel.

Amorce	Séquence (5'-3')	Type d'amorce	Taille du produit (pb)	Gène ciblé	Source amorces
Aves01 F	GATTAGATACCCCACTATGC	Sens (S)	90	ADNr 12S	Epp et al., 2012
Aves01 R	GTTTTAAGCGTTTGTGCTCG	anti-sens (AS)			
Aves02 F	GAAAATGTAGCCCATTTCTTCC	S	120	ADNr 12S	Taberlet et al., 2018
Aves02 R	CATACCGCCGTCGCCAG	AS			
Aves03 F	TATGATAAAGTGAACATAGAGG	S	70	ARNt ile-gln	
Aves03 R	GGTTCGATTCTACTTTTCTA	AS			

Les protocoles de qPCR ont été adaptés à partir du kit LightCycler SYBR Green I Master (Roche, Basel, Suisse) utilisé selon le protocole du fabricant, en modulant les concentrations en amorces, les nombres de cycles thermiques et les températures d'hybridation pour atteindre la meilleure sensibilité et la meilleure quantité finale de produits. La taille et la pureté de ces produits de qPCR ont été visualisées par électrophorèse sur gel d'agarose, et les bandes de taille attendue découpées et purifiées avant d'être soumises à des séquençages Sanger de la même façon que précédemment. La qualité et la résolution taxonomique des séquences obtenues ont alors été évaluées comme décrit précédemment, mais avec un seuil d'identification à 95% étant donné la courte taille des séquences obtenues et la moindre richesse de la base de données de référence pour ces cibles de séquençage.

Optimisation du protocole de purification des ADN environnementaux

Une fois les protocoles d'amplification optimisés pour les PCR conventionnelle et en temps réel, les protocoles pour les phases préalables de purification des ADN ont été évalués. Cette évaluation portait notamment sur la capacité à extraire ou neutraliser les inhibiteurs de PCR fécaux, majoritairement présents dans des prélèvements d'eaux de surface ou de chiffonnettes en élevage. Pour ce faire, des prélèvements de fèces fraîches ont été récoltées au centre de soins de la faune sauvage de l'ENVT dans des cages de tourterelles turques. Ces prélèvements ont ensuite été dilués et homogénéisés dans de l'eau distillée par dilutions décimales de 500 à 0,05 µg/mL, et 100 µL de chaque dilution étaient traités en parallèle par deux kits commerciaux d'extraction et purification d'ADN selon les recommandations des fabricants : One-4-All Genomic DNA Miniprep (Bio Basic Inc., Markham, Canada) relativement polyvalent, et QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) spécifiquement développé pour les échantillons fécaux et permettant d'éliminer leurs inhibiteurs de PCR. Le protocole optimal précédemment identifié d'amplification par PCR conventionnelle a alors été appliqué à ces échantillons purifiés en duplicatas, et les limites de détection comparées entre les deux kits. Celui permettant d'amplifier les matrices fécales les plus diluées serait ensuite choisi pour la suite de la mise en œuvre de la méthode.

Optimisation du protocole de prétraitement des échantillons

Une fois les protocoles d'amplification et de purification d'ADN optimisés, le protocole pour la phase préalable de concentration et purification des prélèvements environnementaux a été mis au point. Afin de concentrer l'ADNe en quelques microlitres depuis des prélèvements de plusieurs dizaines de millilitres, il a été choisi de filtrer ceux-ci. En effet, la filtration par pores de 0,2 µm semble une bonne méthode pour concentrer l'ADNe libre (après lyse des cellules l'abritant) ou cellulaire (Majaneva et al., 2018). Comme ces filtres sont très fins et risquent de rapidement se boucher par les grosses particules solides des prélèvements, il était nécessaire d'optimiser la proportion d'ADNe libre en solution par rapport à celui qui était fixé à ces particules, celles-ci devant être évacuées avant la filtration. Des reconstitutions artificielles des matrices complexes qu'il fallait traiter sur l'élevage d'étude ont alors été réalisées, mêlant de la boue (2 g de sol de sous-bois riche en humus et 50 mL d'eau distillée) avec des fèces de tourterelle turque (250 mg), menant à une concentration de 5 mg/mL de fèces. Ces mélanges ont été homogénéisés par agitation douce durant une nuit en froid positif. Afin de séparer l'ADNe des particules solides auxquelles il peut s'adsorber par sa charge ionique négative, l'ajout d'un mélange de sels phosphatés en saturation à la solution a été évalué. Ceci élève le pH autour de 8 et ajoute une grande quantité de cations libérant l'ADNe adsorbé. Ces sels ont été ajoutés en concentration de 1,96 g/L de NaH_2PO_4 et 14,7 g/L de Na_2HPO_4 (Taberlet et al., 2012). Le mélange était alors homogénéisé par agitation en froid positif durant 15 à 30 min. Les solutions salées ou non étaient alors centrifugées à 4 000 rpm pendant 5 min pour décanter les particules solides, avant d'en filtrer le surnageant résultant. Pour ce faire, ce dernier était versé sur des filtres stériles à membrane en PES de 0,22 µm de diamètre de pores, reliés à un système d'aspiration par pompe à vide électrique. Lorsque la membrane du filtre semblait sèche (tout le liquide était passé à travers), l'aspiration était stoppée, le filtrat conservé et la membrane détachée du système à l'aide d'une lame de scalpel stérile. Elle était alors coupée en deux moitiés de façon stérile, chacune placée dans un tube de broyage à billes en céramique avec 1 mL de tampon phosphaté stérile (PBS 1X). Les tubes à billes étaient agités vivement pour broyer les membranes de filtres à l'aide d'un appareil Precellys (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, France), puis centrifugés rapidement (6 000 rpm, 1 min) afin d'en extraire le surnageant. Afin de comparer les fractions d'ADNe filtrées, 100 µL de ce dernier surnageant de membrane ou du filtrat (après passage sur membrane de 0,22 µm) étaient alors traités en parallèle à l'aide du kit d'extraction et purification d'ADN selon la méthode précédemment optimisée. Les échantillons résultants ont ensuite été soumis à des PCR en temps réel pour plus de rapidité et de précision dans la comparaison des quantifications, selon le protocole d'amplification par qPCR établi au préalable. En résumé, ont été comparés pour ces mélanges boue-fèces : les fractions de membrane et de filtrat ainsi que le surnageant initial sans saturation en sels, et les fractions de membranes avec ou sans saturation en sels (Figure 37).

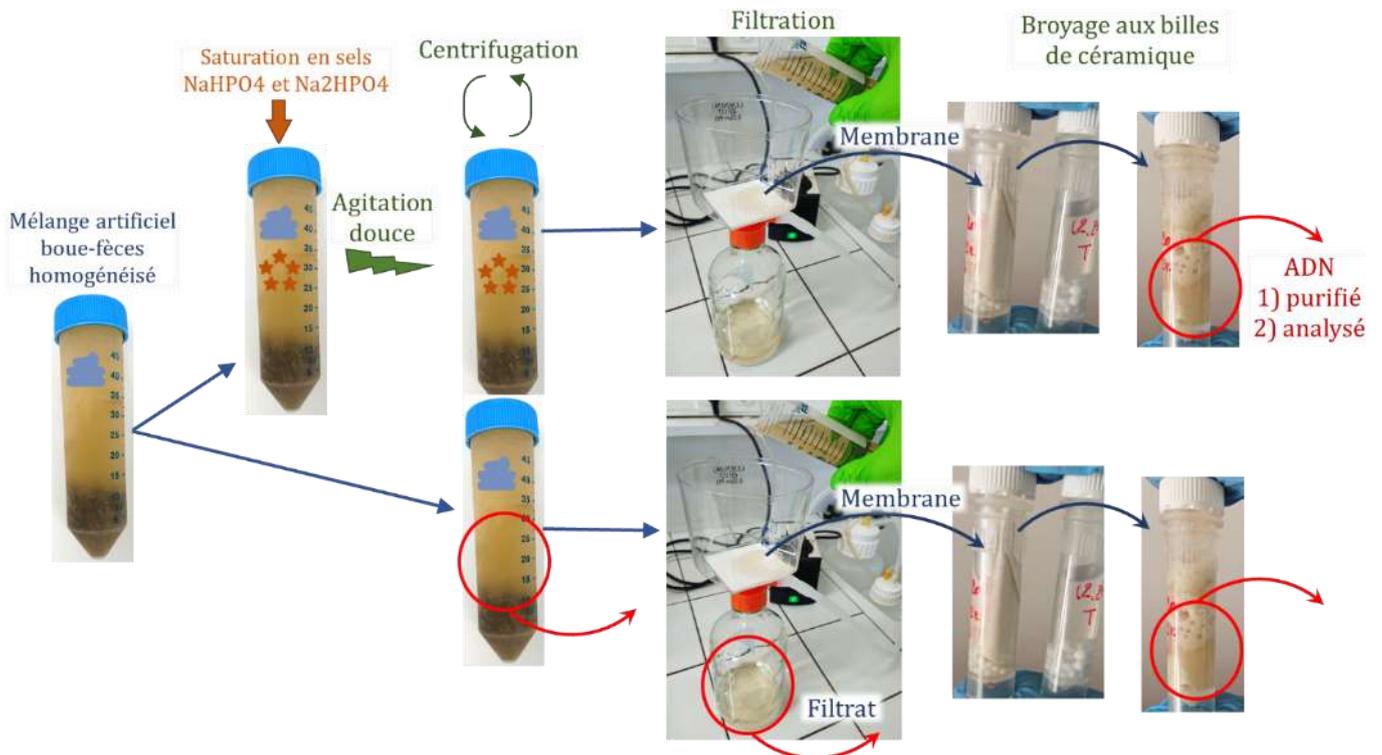


Figure 37 - Schéma du processus de prétraitement des prélèvements environnementaux.

c. Résultats

Optimisation du protocole d'amplification des séquences

Les trois protocoles de PCR conventionnelles évalués sur des échantillons de muscles ont montré des efficacités variables. Ces variations étaient d'abord en nombre d'amplicons générés et appréciés sur gel d'électrophorèse, selon l'espèce et le couple d'amorces utilisé : la tourterelle turque et le merle noir n'étaient respectivement pas et peu détectés avec les amorces PasserF1-PasserR1 (Figure 38). Ensuite, la comparaison de la qualité et de la résolution taxonomique des séquences produites a semblé montrer des résultats similaires entre les amorces LTyr-COI907aH2 et BirdF1-BirdR1, permettant d'identifier avec plus de 99% de similarité les espèces concernées et seulement celles-ci. Finalement, la plus grande taille de produit obtenue avec LTyr-COI907aH2, permettant l'identification même avec des séquences occasionnellement incomplètes, et la possibilité d'accroître encore la sensibilité par un protocole en PCR nichée ont orienté la suite des travaux vers l'utilisation de celles-ci.

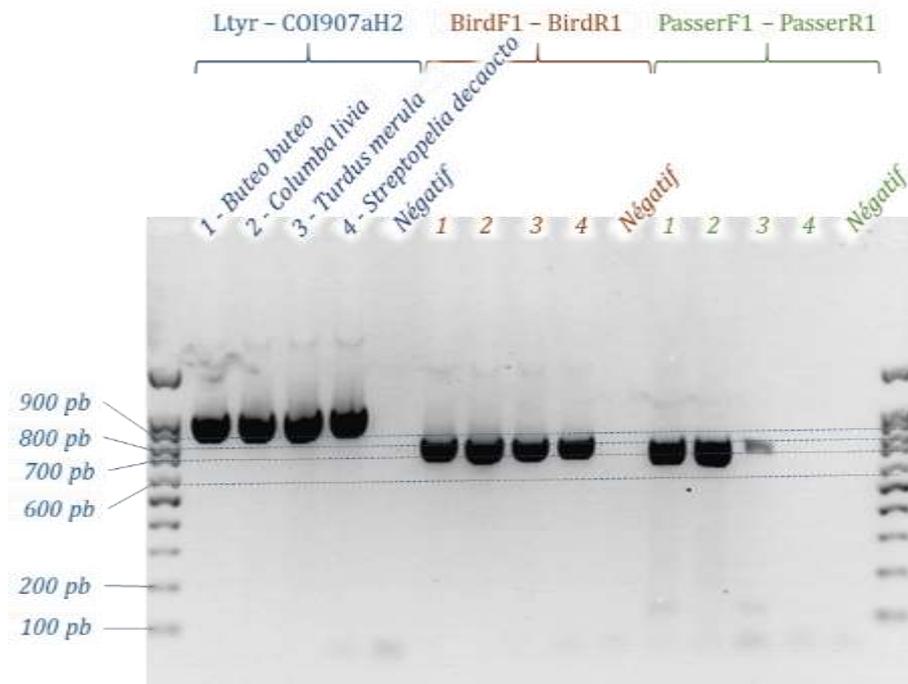


Figure 38 - Résultats sur gel d'agarose des PCR conventionnelles sur échantillons de muscles de quatre espèces, avec les trois couples d'amorces ciblant le gène COI des oiseaux.

En ce qui concerne les protocoles de qPCR évalués par la suite sur la base des amorces ciblant de courtes portions d'ADN mitochondrial, la variation des températures d'hybridation a semblé avoir peu d'effet sur le résultat à partir de muscle de perruche (Figure 39). Les amorces Aves03 ont été écartées du fait d'une très courte taille de produit amplifié difficile à distinguer des dimères d'amorces dans le produit final, et d'une variabilité dans le nombre d'amplicons générés apprécié par la courbe de fluorescence en fin de réaction (Figure 39a). La principale différence entre les amorces Aves02 et Aves03 était la sensibilité de détection moindre des premières, confirmée par la suite avec les échantillons de muscles des autres espèces témoins. Cependant, la taille plus grande de la séquence obtenue avec les amorces Aves02 ainsi que sa meilleure résolution taxonomique en comparaison de Aves01 et Aves03 (Taberlet et al., 2018) nous ont conduits à orienter le développement de protocole à partir de ces amorces, en l'adaptant pour accroître la sensibilité de la réaction. Ainsi un protocole dit en « touchdown » plus sensible a été mis en place, sur un nombre de cycles important, et en augmentant la concentration en amorces dans la réaction. La résolution taxonomique sur les quatre espèces témoins communes sur l'élevage d'étude était bonne avec les amorces Aves02, identifiant avec plus de 96% d'identité ces espèces ou bien des espèces proches taxonomiquement mais souvent distantes en terme de distribution géographique. La Buse variable était par exemple confondue avec d'autres espèces du genre *Buteo* : la Buse pattue (*Buteo lagopus*), la Buse féroce (*Buteo rufinus*), la Buse de l'Himalaya (*Buteo refectus*) ou la Buse du Japon (*Buteo japonicus*). Ces espèces étant exceptionnelles voire absentes dans la région étudiée, la déduction de l'identification de séquence est simple.

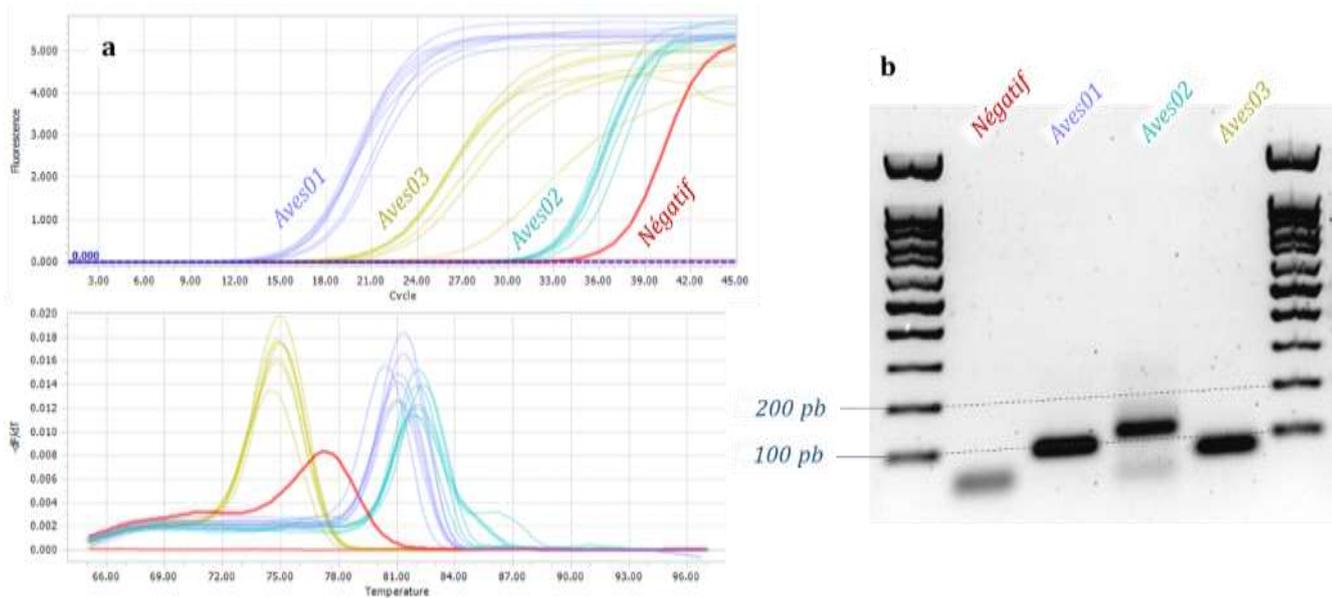


Figure 39 - Résultats des essais de température d'hybridation sur les qPCR ciblant de courtes séquences d'ADNmt des oiseaux.

a - Résultats de la qPCR en temps réel sur échantillon de muscle de perruche : en haut courbes d'amplification, en bas courbes de fusion. Les différentes courbes correspondent pour chaque paire d'amorces à des températures d'hybridation de 50 à 60 °C incrémentées par pas de 2 °C.

b - Visualisation sur gel d'agarose des produits de la qPCR.

Les protocoles de PCR conventionnelle et qPCR finalement utilisés sont ceux décrits en Tableau 5.

Tableau 5 - Protocoles de PCR et qPCR adaptés pour l'amplification spécifique des séquences codes-barres d'oiseaux.

Protocole et amorces	Kit de PCR	Mélange de réactifs (par puits)		Conditions thermiques		
		Réactifs	Volume (µL)	Température (°C)	Durée	Cycles
PCR LTyr - COI907aH2	KAPA Taq	Eau	17,9	95	5min	1
		KAPA Taq Buffer A (10X)	2,5	----	----	----
		dNTP (10mM)	0,5	95	30s	----
		amorce LTyr (10µM)	1	50	30s	45
		amorce COI907aH2 (10µM)	1	72	1min	----
		KAPA Taq DNA pol (5U/µL)	0,1	----	----	----
ADN matrice	2	72	1min	1		
PCR nichée COIaRt - COI748Ht	KAPA Taq	Eau	17,9	95	5min	1
		KAPA Taq Buffer A (10X)	2,5	----	----	----
		dNTP (10mM)	0,5	95	30s	----
		amorce COIaRt (10µM)	1	55	30s	35
		amorce COI748Ht (10µM)	1	72	1min	----
		KAPA Taq DNA pol (5U/µL)	0,1	----	----	----
Produits LTyr-COI907aH2	2	72	1min	1		
qPCR Aves02 F - Aves02 R	LightCycler SYBR Green I Master	Eau	8	95	5min	1
		Master mix	12,5	----	----	----
		amorce Aves02 F (10µM)	1	95	10s	----
		amorce Aves02 R (10µM)	1	60	15s	5
		ADN matrice	2,5	72	15s	----
		----	----	----	----	----
		95	10s	----	----	
-0,5°C/cycle	15s	30	----			
72	15s	----	----			

			-----	-----	-----
			95	10s	
			45	15s	10
			72	15s	
			-----	-----	-----
			95	10s	
			65	1min	1
			+0,2°C/s jusqu'à 97	~ 3 min	
			-----	-----	-----
			37	30s	1

Optimisation du protocole de purification des ADN environnementaux

La comparaison des résultats de PCR après extraction et purification de l'ADN par deux kits commerciaux a montré des différences entre eux. À partir des mêmes dilutions de fèces de tourterelle turque en solution aqueuse, le kit One-4-All Genomic DNA Miniprep (Bio Basic Inc., Markham, Canada) a semblé résulter en une plus grande sensibilité de PCR que le kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas) (Figure 40). Les dilutions à 1/1000^{ème} étaient en effet détectées par le premier kit, tandis que le second n'a détecté que les dilutions jusqu'au 1/100^{ème}. Etant donné en outre le coût financier plus abordable du kit One-4-All Genomic DNA Miniprep, il a donc été choisi de l'utiliser pour la suite de l'étude portant sur les matrices de mélanges de boue et matières fécales.

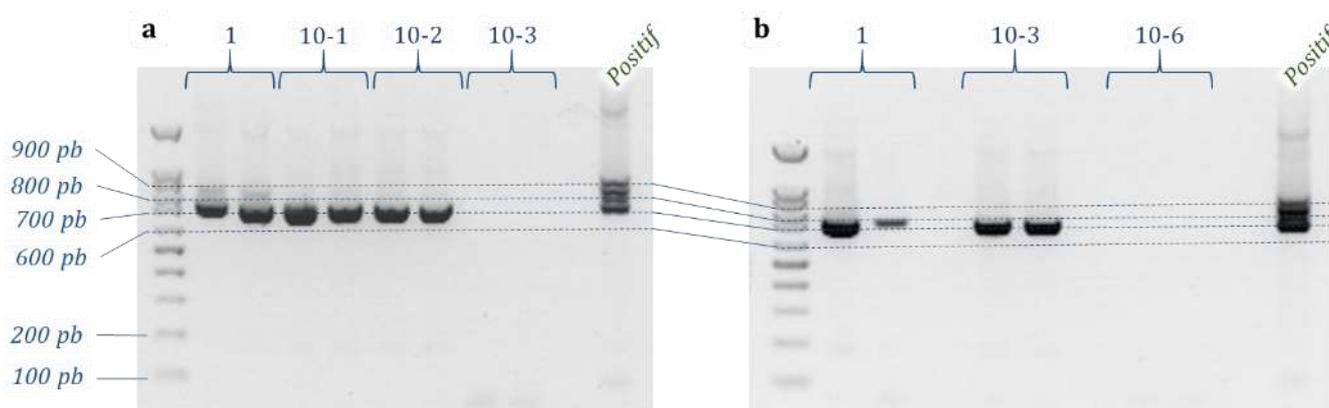


Figure 40 - Résultats comparés des PCR nichées ciblant le gène COI à partir d'ADN fécal de tourterelle extrait et purifié par deux kits commerciaux.

a - Résultats du kit QIAamp Fast DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Venlo, Pays-Bas).

b - Résultats du kit One-4-All Genomic DNA Miniprep (Bio Basic Inc., Markham, Canada). Les témoins positifs sont de l'ADN de muscle de tourterelle turque, les dilutions de la matrice initiale (fèces en eau distillée) soumise aux kits sont indiquées en tête des puits.

Optimisation du protocole de prétraitement des échantillons

L'intérêt de la filtration pour concentrer l'ADN d'un échantillon de grand volume a été évaluée à partir de matrice complexe mêlant boue et fèces. La comparaison des quantités d'ADN dans les fractions préfiltrées ainsi que dans la membrane du filtre et dans le filtrat a été faite par qPCR (amorces Aves02 précédemment sélectionnées) et en duplicatas. Ces résultats ont montré une quantité plus importante d'ADN cible dans la fraction issue de la membrane de filtre broyée (Ct moyen de 26,6) en comparaison du surnageant initial (Ct moyen de 34,3) suivi du filtrat (Ct moyen de 34,8) (Figure 41a,b). Ensuite, la

comparaison du pré-enrichissement par saturation en sels phosphatés de la solution mélange de boue et fèces a montré une efficacité certaine sur l'accroissement de détection en ADN dans la membrane du filtre, avec un gain de deux cycles d'amplification (Figure 41c).

Finalement, ces résultats ont donc mené au choix du protocole complet pour traiter les prélèvements environnementaux des parcours d'élevage : pré-enrichissement initial des prélèvements par saturation en sels phosphatés, puis concentration par filtration du surnageant, suivie d'une extraction à l'aide du kit One-4-All Genomic DNA Miniprep à partir de la membrane du filtre (Figure 37).

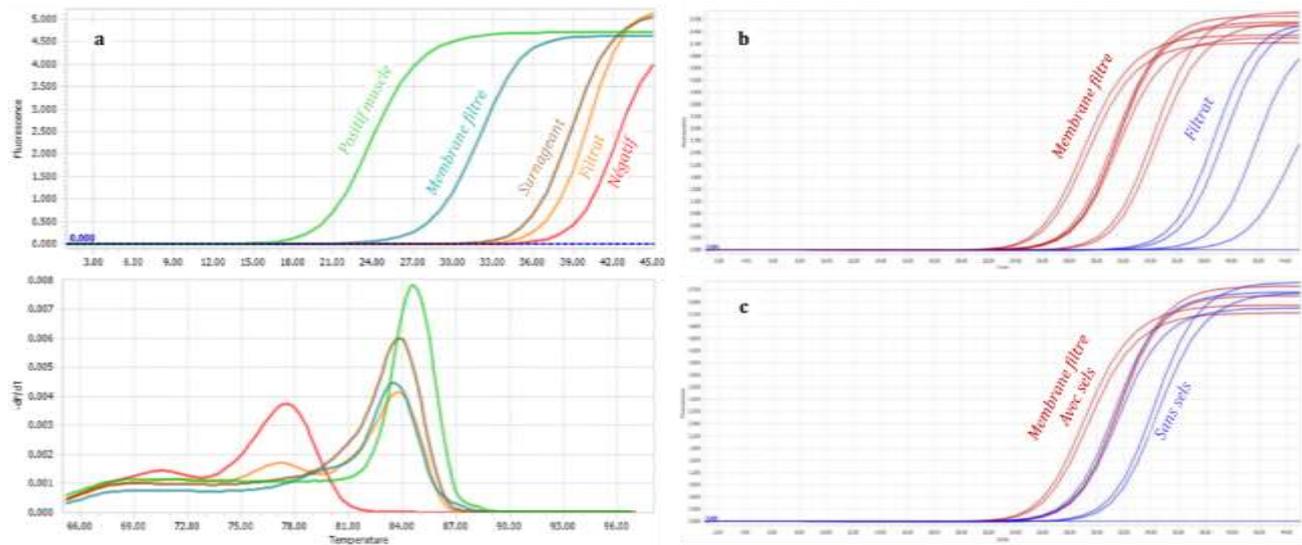


Figure 41 - Résultats de qPCR évaluant l'efficacité des protocoles de préparation par filtration et saturation en sels phosphatés.

a – Courbes de fluorescence et de fusion comparant les différentes fractions filtrées (Ct membrane : 26,4 ; Ct filtrat : 35,7) à partir du surnageant (Ct : 34,3) d'un mélange boue-fèces en dilution unique. Les couleurs identiques entre la courbe de fluorescence et de fusion correspondent à un même échantillon, indiqué à côté des courbes de fluorescence.

b – Courbes de fluorescence comparant les fractions filtrées à partir de trois dilutions décimales de fèces (nulle à 1/10^{ème}, chacune en duplicata) dans un mélange de boue artificielle. Le Ct moyen sur la membrane en dilution initiale est 26,7, et sur le filtrat de 34,4.

c – Courbes de fluorescence comparant les extraits de membranes de filtration, précédés ou non par une étape de saturation en sels phosphatés de la solution boue-fèces, celle-ci en deux dilutions décimales (nulle et 1/10^{ème}, chacune en duplicata). Le Ct moyen sans sels en dilution initiale est de 26,7, et celui avec sels de 24,8.

d. Discussions

La mise au point du processus complet de préparation des prélèvements avant séquençage, depuis l'étape de concentration jusqu'à l'amplification, a ainsi permis d'éprouver le matériel et d'adapter les protocoles au contexte et aux besoins particuliers de l'étude. Ainsi, le résultat inattendu d'une moindre efficacité du kit de purification spécifique pour fèces a permis de s'orienter vers un kit polyvalent, moins onéreux et plus simple d'utilisation pour la suite de l'étude. Ce résultat contre-intuitif peut être expliqué par une moindre concentration des ADN dans l'éluat purifié par le protocole du kit spécifique pour fèces en comparaison du kit polyvalent, tandis que théoriquement ce premier élimine ou désactive mieux les inhibiteurs de PCR présents dans les fèces. Si le protocole proposé par le fabricant du kit spécifique pour

fèces qui a été suivi aurait pu être encore adapté pour optimiser le résultat, cela montre en tout cas qu'un kit polyvalent peut être suffisant pour les objectifs visés, du moins en nombre de séquences produites qui a été notre critère principal d'évaluation. Il sera toutefois possible par la suite de revenir à ce kit spécifique en optimisant le protocole pour la quantité d'ADN purifiée si la qualité des séquences issues de l'analyse de « métabarcoding » paraît dégradée par d'éventuels inhibiteurs de PCR. Ainsi, le protocole de concentration et purification des ADNe issus des prélèvements de boue sur les parcours de l'élevage de canards étudié semble au point pour identifier les espèces aviaires. Après purification des ADNe, les séquences produites en qPCR avec les amorces Aves02, ou bien en PCR avec les amorces LTyr-COI907aH2 permettront d'identifier avec une bonne résolution les espèces susceptibles de fréquenter l'élevage d'étude, même si les espèces les plus proches taxonomiquement (au sein d'un même genre) pourraient être confondues moléculairement. Leur proximité taxonomique (et donc écologique et épidémiologique) ne devrait cependant pas limiter les conclusions quant à l'étude de l'interface avec les canards domestiques. À la différence des inventaires effectués par observations ou par captures, le recensement par « métabarcoding » a cependant le défaut de ne pas être quantitatif (Leempoel et al., 2020; Mercaldo-Allen et al., 2021; Taberlet et al., 2018). Les méthodes précédentes restent donc complémentaires au moins ponctuellement pour caractériser quantitativement la population d'avifaune du site et ainsi classer les espèces représentant *a priori* un risque infectieux selon leur abondance.

Pour une application de la méthode au site d'étude, l'analyse des séquences produites sera faite par « métabarcoding » et non plus par séquençage Sanger. Cela nécessite une méthode de séquençage à haut débit permettant d'identifier en parallèle toutes les séquences d'un même mélange initial, et même théoriquement les plus rares à condition d'obtenir une profondeur de séquençage importante. Ces méthodes complexes demandent une adaptation fine de chaque étape selon le produit initial (taille des fragments, quantité, qualité) et selon les besoins d'information. Il est très probable en particulier que le mélange d'ADNe des prélèvements de boue sur parcours soit majoritairement dominé par les séquences de canards domestiques qui ne nous intéressent pas mais qui pourraient limiter l'identification de séquences d'oiseaux rares (Vestheim and Jarman, 2008). Cette limitation s'effectue principalement dès l'étape d'amplification par (q)PCR, les réactifs étant consommés prioritairement par les séquences les plus abondantes. Il est alors possible de développer des oligonucléotides bloquant spécifiquement l'hybridation des amorces d'amplification sur les séquences d'une espèce donnée (Huggins et al., 2020; Kumari et al., 2019; Vestheim and Jarman, 2008). Ce blocage de l'espèce dominante permet ainsi de révéler une plus grande richesse taxonomique et notamment des espèces les plus rares dans l'échantillon. Ainsi, si à la suite des premiers séquençages il s'avère que les identifications d'autres espèces sont peu fréquentes malgré l'objectivation de leur présence par les observations visuelles précédemment décrites, il sera envisagé de développer cette approche de blocage d'amplification de l'ADN des canards. Un autre moyen d'accroître l'exhaustivité des séquençages est d'effectuer les étapes depuis la concentration jusqu'à l'amplification en duplicatas. Cela permet en effet de redistribuer à chaque étape et pour chaque

échantillon descendant la répartition du sous-échantillon de séquences issu du prélèvement initial, favorisant ainsi la probabilité de sélectionner à l'une des étapes quelques séquences rares (Leempoel et al., 2020; Taberlet et al., 2018).

II. Étude des déplacements individuels de bergeronnettes grises (*Motacilla alba*) à partir d'un élevage avicole plein air

a. Introduction

Dans l'étude d'interface épidémiologique entre avifaune commensale et élevages, les premières approches écologiques permettent de cibler des espèces *a priori* d'intérêt épidémiologique par leur abondance et leur écologie proche des animaux domestiques. Ces espèces ciblées pourront alors faire l'objet de prélèvements afin de détecter d'éventuelles similarités de souches d'agents infectieux avec le compartiment domestique, attestant ou non de l'efficacité des contacts précédemment objectivés pour les échanges infectieux (Caron et al., 2015, 2014). Dans le cas où des échanges sont révélés pour au moins une espèce commensale non sédentaire, il est alors important d'étudier sa capacité à faire le lien entre sites proches (zones humides, élevages) par les déplacements individuels. On peut ainsi véritablement évaluer et objectiver le potentiel d'hôte relais de l'espèce pour les agents infectieux en élevage, et cela permet aussi de mieux comprendre l'écologie locale de l'espèce pour appréhender voire prévenir le risque infectieux qu'elle représente (Cappelle et al., 2011; Caron et al., 2015). Dans le contexte de notre étude, après avoir identifié le rôle central de la Bergeronnette grise dans le réseau d'interactions entre les canards d'élevage et l'avifaune, et après avoir détecté des portages de VIA, de NDV et de chlamydia dans cette espèce, il semblait nécessaire d'explorer d'avantage ses déplacements entre sites proches. En effet, outre les élevages où les insectes sont nombreux pour son alimentation (Stoffolano and Geden, 1987), la Bergeronnette grise est connue pour son affinité pour les berges de cours ou plans d'eau (d'où lui vient d'ailleurs le nom de bergeronnette) (Snow et al., 1998). L'espèce est aussi capable de déplacements quotidiens ou saisonniers de plusieurs kilomètres, certaines populations étant migratrices entre le Nord de l'Europe (Scandinavie, Grande-Bretagne, Pays-Bas) et le Sud de l'Europe (France, Péninsule Ibérique) voire jusqu'à l'Afrique du Nord (Davies, 1976). Ainsi, les populations hivernantes mêlant individus sédentaires et migrants dans le Sud-Ouest de la France sont relativement plus importantes qu'en saison estivale, et regroupées autour de points d'intérêt plus rares du fait de la moindre abondance en insectes. Ces points d'intérêt peuvent être les sites de dortoir la nuit, les sites de rassemblement post- ou pré-dortoir où elles se toilettent et socialisent au lever et au coucher du soleil, et tous les sites d'alimentation où persistent les insectes : élevages et bordures de zones humides en particulier en hiver. Ces différents sites parfois distants de plusieurs kilomètres localement sont alors visités en alternance quotidienne, créant ainsi un lien écologique aviaire entre élevages et avec les zones

humides. Les éventuels agents infectieux d'un site pourraient alors circuler vers les autres sites par l'intermédiaire des groupes de bergeronnettes grises, hôtes relais mécaniques ou biologiques (Caron et al., 2015). Sur l'élevage d'étude, le suivi ornithologique régulier et à toutes les saisons a permis d'identifier des usages variables du site entre saisons : couples nicheurs et leurs jeunes durant la saison de reproduction, usage alimentaire des parcours toute l'année avec une concentration particulière en saison hivernale, rassemblements de post- et pré-dortoir sur les toits de hangars en saison hivernale. Le site semble donc d'intérêt particulier pour l'espèce, mais les abondances fluctuantes entre saisons et entre heures de la journée indiquent que ces populations fréquentent d'autres sites en parallèle. Il était donc essentiel d'essayer d'identifier les sites connectés depuis l'élevage d'étude par les bergeronnettes grises, ceci pour comprendre leur rôle épidémiologique entre sites. Cette phase de l'étude arrivant en dernier plan pour compléter les résultats précédemment présentés, le suivi des déplacements individuels de bergeronnettes grises est toujours en cours au moment de la rédaction du manuscrit. La partie suivante présente donc essentiellement le développement de la méthode et quelques résultats préliminaires des suivis télémétriques réalisés.

b. Matériel et méthodes

Au regard de la petite taille de la Bergeronnette grise, entre 17 et 30 g de masse corporelle environ, le choix des technologies de télémétrie individuelle était restreint. Celle-ci devait aussi répondre aux besoins de l'étude : détection possible à plusieurs centaines de mètres au moins, précision de localisation d'au moins quelques mètres, maximum quelques dizaines de mètres, rapidité de détection sur les sites d'intérêt voire entre sites, rapidité de récolte des informations de localisation et d'identification individuelle, et durée de fonctionnement de plusieurs mois. Les émetteurs satellite (GPS en particulier) auraient comblé l'ensemble de ces besoins, mais leur poids encore trop important à ce jour n'a pas permis leur usage dans ce contexte. En effet, il est généralement recommandé pour limiter l'impact éthique de l'équipement sur l'individu porteur que ce dernier ne dépasse pas 3% du poids du corps, soit 0,5 g pour un individu de 17 g ou 0,9 g pour un individu de 30 g. Le choix de matériel s'est donc porté sur des émetteurs VHF de 0,62 g, le modèle nanotag NTQB2-3-2 (Lotek, Newmarket, Canada) (Figure 42a), qui permet d'équiper des individus d'au moins 21 g. Le fonctionnement de ces émetteurs en fréquence fixe mais avec un code d'identification unique à chacun lors de l'émission (toutes les 13 s) permet en une seule recherche d'identifier tous les émetteurs détectables à proximité, faisant gagner un temps précieux sur le terrain au regard du caractère relativement fastidieux des recherches de localisations VHF (FAO, 2007). Dix-huit individus capturés sur l'élevage d'étude ont été équipés d'émetteurs, soit huit en fin d'hiver (février et mars) 2021, et douze à l'automne (novembre et décembre) suivant. À un rythme d'une émission toutes les 13 secondes, l'espérance de longévité des émetteurs est de 224 jours. S'inscrivant dans le prolongement des captures effectuées pour l'inventaire et les prélèvements de l'avifaune, l'ensemble des captures et manipulations ont été réalisées sous l'autorisation du CRBPO et avec l'aide de

Benjamin Vollot, bagueur généraliste expérimenté. Les individus capturés ont été équipés de bague métallique du MNHN, puis pesés et évalués afin d'assurer leur bonne santé et leur capacité à supporter l'équipement, notamment l'absence de mue en cours sur les plumes caudales. L'attachement du dispositif aux oiseaux s'est fait en effet par collage à la base des plumes rectrices centrales. En bref, après avoir été activé l'émetteur a été intégré à l'aide de colle forte entre deux épaisseurs de ruban adhésif pour accroître la surface de contact (Figure 42b), puis ce montage a été collé à la base de trois plumes rectrices centrales à l'aide de colle forte (Figure 42c). Après avoir assuré la bonne tenue de la colle, l'oiseau était alors relâché, et dès que possible suivi en visuel (sauf si trop éloigné de zones accessibles) pour s'assurer de sa bonne récupération et de son comportement normal.



Figure 42 - Description du matériel et de la méthode d'équipement et de suivi télémétrique des bergeronnettes grises.

a - Balise émettrice brute de modèle nanotag NTQB2-3-2 (Lotek, Newmarket, Canada).

b - Balise émettrice adaptée avec du ruban adhésif augmentant la surface.

c - Balise émettrice installée sur l'oiseau à la base des trois rectrices caudales centrales.

d - Dispositif de réception des ondes VHF émises par les balises : antenne omnidirectionnelle installée sur le toit d'un hangar en point haut de l'élevage, reliée à un récepteur fixe enregistrant en continu les données des individus présents sur l'élevage.

e - Dispositif de réception des ondes VHF émises par les balises : antenne directionnelle manuportée reliée à un récepteur mobile pour les recherches de balises hors du site d'élevage.

Une fois les premiers individus équipés, leur suivi a été assuré par deux méthodes complémentaires. La première a consisté en une détection continue et omnidirectionnelle depuis un toit de hangar en point haut de l'élevage (Figure 42d). Une antenne fixe a été installée sur ce toit, reliée à un récepteur allumé en continu et enregistrant l'ensemble des détections faites à la fréquence unique choisie pour l'ensemble des émetteurs. Chaque donnée enregistrée a consisté en un identifiant de balise, la date et l'heure précises (minutes et secondes), ainsi que la force du signal et le gain du récepteur (permettant d'évaluer

approximativement la distance de détection). Ces données ont été récoltées à l'occasion de chaque visite sur le site et rassemblées dans un tableur numérique. Grâce à des tests de sensibilité et de calibration de l'appareil réalisés au préalable, il était certain qu'un identifiant détecté par le récepteur correspondait à une localisation sur l'ensemble de la surface de l'élevage mais pas dans les champs ou les jardins particuliers à proximité, ceci à cause de l'opacité vis-à-vis des ondes émises de la végétation entourant l'élevage. La deuxième méthode de suivi a complété la station fixe pour les sites extérieurs à l'élevage. Elle a consisté en un récepteur mobile à lecture directe (sans enregistrement), relié à une antenne omnidirectionnelle à fixer sur un toit de véhicule, ou bien à une antenne directionnelle dite Yagi (Figure 42e) manuportée. Des calibrations préalables de ces dispositifs mobiles ont permis d'évaluer leur distance de détection en fonction du type de milieu (ouvert ou végétalisé) : jusqu'à 500 m en milieu ouvert, mais interrompue par la végétation boisée. Ainsi, les individus marqués ont été recherchés en véhicule par transects routiers à l'aide de l'antenne omnidirectionnelle dans un rayon de 20 km autour de l'élevage (estimation de la distance maximale de dispersion journalière d'un individu). Les circuits se sont concentrés sur les sites d'intérêt pour l'espèce (plans d'eau, cours d'eau, élevages, habitations), mais toute détection entre ces sites a aussi été notée, associée à l'identifiant individuel de la balise. Afin de préciser la localisation des individus détectés avec l'antenne omnidirectionnelle, l'émetteur a été alors connecté à l'antenne Yagi et la position précisée par bi- ou triangulation selon l'accessibilité du lieu et le type de végétation bloquant ou non les ondes. Ces recherches mobiles ont été réalisées par Benjamin Vollot et Chloé Le Gall-Ladevèze en alternance avec des étudiants vétérinaires volontaires (et préalablement formés à la technique) au moment de la pose des émetteurs, puis de façon hebdomadaire durant deux mois, puis au moins tous les mois. L'enregistrement des transects parcourus a été fait par un appareil GPS de randonnée sous forme de fichiers GPX retranscrits en cartographie à l'aide du logiciel QGIS version 3.6, ce qui a permis d'alterner entre régions de la zone d'étude pour couvrir l'ensemble de la surface entourant l'élevage. Les données de localisation par le récepteur fixe ou mobile ont été enfin condensées et transmises à la plateforme en ligne Movebank (<https://www.movebank.org/>).

c. Premiers résultats

Les résultats de suivi sur les huit premiers individus, marqués en février et mars 2021, seront présentés ici. Sept étaient dans leur premier hiver et un seul individu femelle était plus âgé (identifiant 15). Six d'entre eux étaient des femelles et deux des mâles. Sur les trois premiers mois de suivi du 20 février jusqu'au 20 mai (90 jours), dont 22 premiers jours avec seulement trois individus équipés, un grand nombre (plus de 244 000) de détections ont été faites sur la station fixe. Ce nombre a varié de 143 pour l'identifiant 14 à 226 313 pour l'identifiant 15. En effet, cet individu (femelle adulte) était présent tous les jours sur l'élevage et durant toute la nuit et la journée à partir du moment où il a été équipé, sans doute parce que nichant sur le site (Figure 43a). Afin de mieux visualiser les autres comportements, le numéro 15 a été masqué sur les figures (Figure 43b,c), montrant des fréquentations plus anecdotiques

mais régulières de l'élevage par les autres individus. Trois d'entre eux ont également été détectés à l'extérieur mais à moins de 2 km de l'élevage d'étude, tous en début de suivi (Figure 43b). Ainsi, l'individu numéro 17 (jeune femelle) a été repérée quatre fois sur trois jours différents, dont deux jours où elle avait été aussi détectée par la station fixe de l'élevage. Elle était dans le secteur Nord de l'élevage d'étude, soit à proximité du dortoir de hérons soit près du village (Figure 44). L'individu numéro 16 (jeune femelle) a été repérée une fois et à côté du numéro 17 près du village, le jour de son équipement sur l'élevage (Figure 44). L'individu 12 (jeune mâle) a été détecté de nuit donc très probablement en dortoir, à proximité d'habitations isolées, le soir suivant son équipement. Le lendemain, il était présent sur l'élevage d'étude ainsi que détecté le soir à proximité d'un autre élevage de volailles (Figure 44).

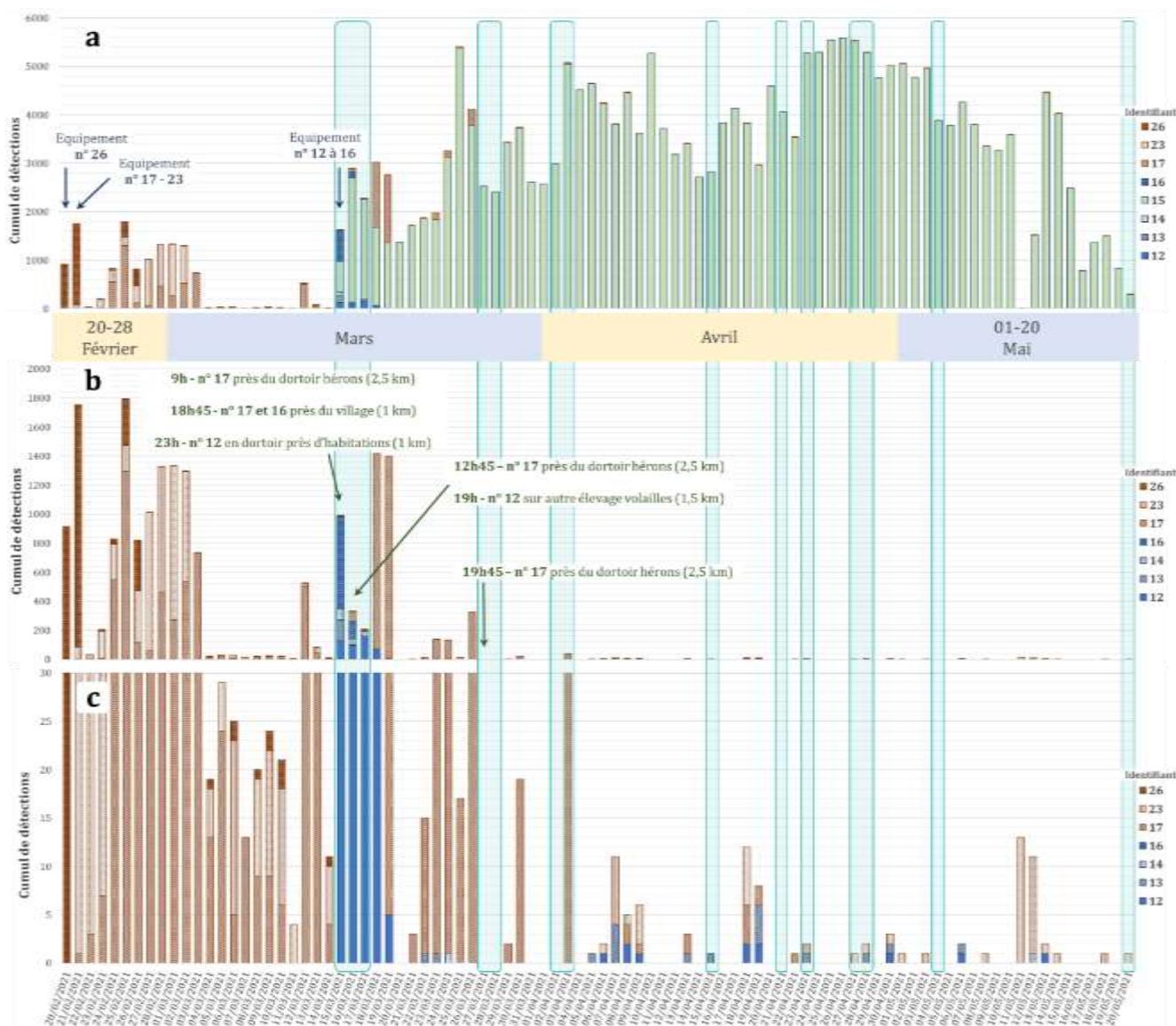


Figure 43 - Détections des émetteurs VHF de bergeronnettes grises par le récepteur fixe sur l'élevage et le récepteur mobile hors de l'élevage entre le 20 février et le 20 mai 2021.

Les bandes verticales bleutées indiquent les jours de recherches mobiles par transects routiers.

a - Tous individus détectés par la station fixe à partir du jour de leur équipement.

b - Détections fixes et mobiles des individus, sauf le numéro 15 présent constamment sur l'élevage.

c - Grossissement en axe Y de la précédente figure permettant de visualiser les détections plus rares au printemps.

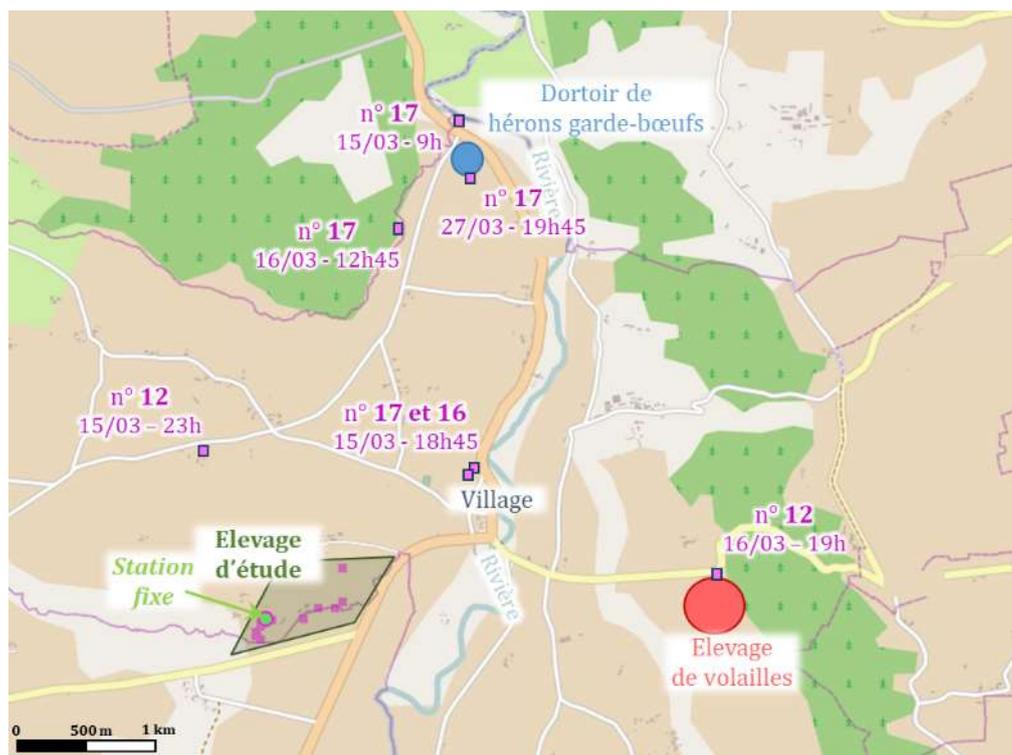


Figure 44 - Cartographie des détections d'émetteurs VHF de bergeronnettes grises hors de l'élevage d'étude du 20 février au 20 mai 2021.

Les localisations des balises détectées sont indiquées par les carrés roses.

Après le 27 mars, les détections ont été beaucoup plus rares pour les individus autres que le numéro 15, mais tout de même persistantes pour certains d'entre eux (Figure 43). Cela suggère que ces oiseaux ont toujours été présents dans la zone d'étude mais beaucoup plus mobiles et moins fixés autour de l'élevage. Les nombreux transects routiers effectués durant cette même période dans un rayon de 20 km en se concentrant sur la périphérie de l'élevage et les points d'intérêt de l'espèce n'ont pourtant pas permis de les détecter.

d. Discussions

Sur la période de fin d'hiver et de reproduction étudiée dans cette phase préliminaire, de nombreuses détections des balises à horaires variés par la station fixe sur l'élevage ont semblé indiquer une bonne mobilité des individus équipés, que l'on peut juger normale. Cela conforte donc les observations faites au relâcher des oiseaux, permettant d'affirmer que l'équipement ne provoque probablement pas de dérangement à court ou moyen terme sur le comportement individuel des bergeronnettes grises et en particulier sur les déplacements. Tandis que de nombreuses détections ont été faites sur l'élevage jusqu'à la fin du suivi, seulement trois individus ont également été détectés à l'extérieur. Ces détections ont été faites à moins de 2 km de l'élevage, et toutes en début de suivi, donc probablement avant la dispersion ou la migration plus distante : tous ces individus étaient dans leur première année donc possiblement plus tardifs à partir vers leur site de reproduction (Newton, 2007a). Bien que peu nombreuses, ces quelques

détections d'individus alternant entre l'élevage d'étude et l'extérieur constituent des preuves que les bergeronnettes grises, observées au plus près des canards et de leur environnement en plein air, pourraient disperser ou introduire d'éventuels agents infectieux entre sites, au moins les sites proches jusqu'à 2 km. Les sites visités pouvant être d'autres élevages de volailles ou des zones humides fréquentées par l'avifaune aquatique (ici les berges de la rivière ou de l'étang dortoir de hérons), les échanges infectieux potentiels sont d'autant plus importants à considérer.

Le suivi présenté ici n'a porté que sur la période de fin d'hivernage et de reproduction, et il sera alors important de comparer ces comportements avec ceux des individus équipés en automne et suivis durant toute la période d'hivernage suivante. Cette période est en effet importante pour la circulation infectieuse en élevage d'après les résultats de suivi infectieux sur le site étudié et les dates d'introduction de VIAHP dans la filière lors des précédents hivers d'épidémies (Anses, 2021). À cette pression infectieuse générale en hiver s'ajoute un risque épidémiologique potentiellement plus important représenté par les bergeronnettes grises vers ou depuis le site d'étude. En effet, l'espèce montre un comportement grégaire plus dense durant l'hiver avec des agrégations particulières sur l'élevage. Les déplacements locaux quotidiens sont aussi potentiellement plus importants à cette saison, notamment par les individus non territoriaux (Davies, 1976), pour rechercher des ressources à l'instar des Anatidés (Guillemain et al., 2021). Tous ces comportements de l'espèce sont encore méconnus et d'autant plus dans la région d'étude, donc nécessitent de poursuivre les suivis télémétriques en cours. Outre les bergeronnettes grises, il semble nécessaire d'éclairer plus amplement les déplacements individuels des hérons garde-bœufs sur la zone étudiée. En effet, ceux-ci sont un autre potentiel hôte relais pour les agents infectieux des canards (affection pour les élevages et les zones humides), mais avec une capacité de déplacement journalier probablement plus importante qui permettrait de connecter des sites plus distants. Leur taille plus importante permettrait aussi de les équiper de matériel plus facile à suivre en continu et à des distances illimitées, de type GPS, ce qui fournirait des informations plus complètes sur leurs déplacements. En revanche, l'espèce est plus délicate à capturer, nécessitant des méthodes différentes de celle du filet japonais et des adaptations spécifiques pour limiter le dérangement et les blessures (FAO, 2007).



~ ~ ~

Conclusions et perspectives

~ ~ ~



Le travail pluridisciplinaire présenté ici pour étudier l'interface entre avifaune commensale et élevages de volailles en plein air a permis de répondre à plusieurs objectifs présentés en introduction et représentés par la Figure 45. Il a aussi soulevé des perspectives de développements à poursuivre, tant à l'échelle de l'élevage de canards du Gers choisi comme modèle d'étude qu'à l'échelle d'autres contextes d'intérêt.

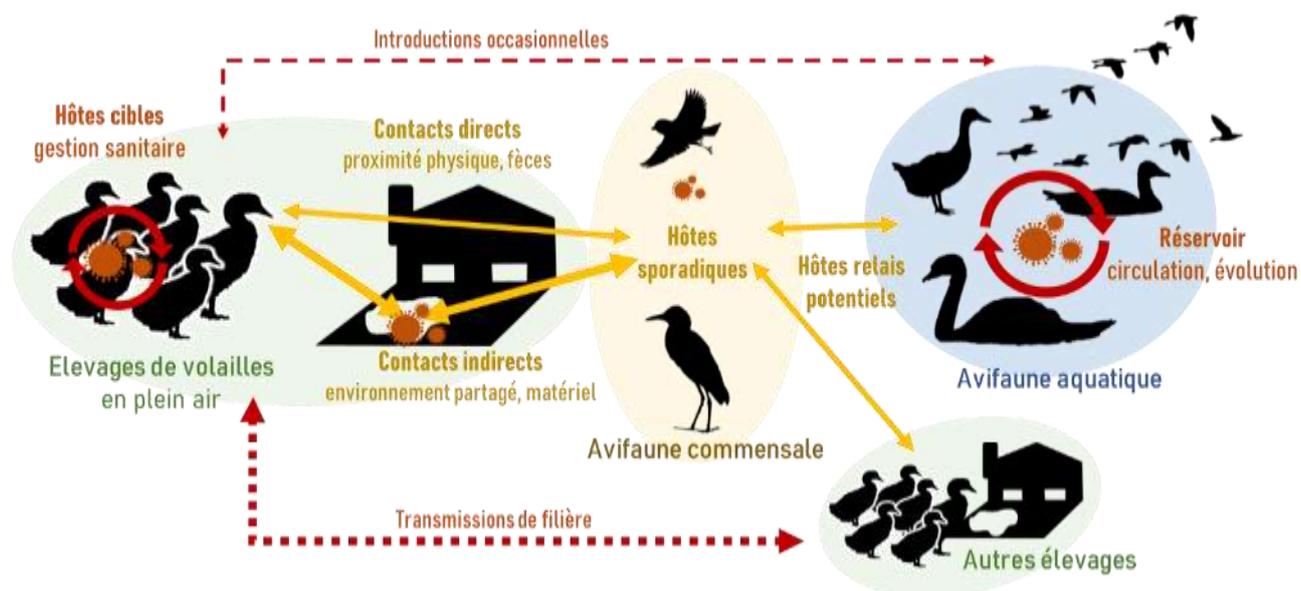


Figure 45 - Schéma final de l'épidémiologie des virus influenza à l'interface entre avifaune et élevages de volailles en plein air.

En **orange** les hypothèses explorées et caractérisées par le travail de cette thèse (voir la suggestion de celles-ci en **Figure 3**), en **rouge** les voies de circulation et de transmission virale connues et non considérées dans ce travail.

La phase initiale d'inventaire ornithologique par trois méthodes (observations standardisées, observations opportunistes et captures) centrées sur l'élevage d'étude a mis en évidence une grande richesse de plus d'une centaine d'espèces différentes. Les abondances de l'avifaune varient au fil des saisons biologiques, le site hébergeant divers profils d'espèces commensales : sédentaires (par exemple Moineaux domestique et friquet), estivales strictes (par exemple Rossignol philomèle et Hirondelles), hivernales strictes (par exemple Pipits farlouse et spioncelle ou Bécassine des marais), migratrices strictes (par exemple Gobemouche noir ou Rousserolle effarvate), ou encore semi-migratrices avec une sur-abondance hivernale (par exemple Pinson des arbres ou Bergeronnette grise). La comparaison des indices de diversité avec d'autres contextes agricoles (Jeliazkov et al., 2016) ou péri-urbains (Clergeau et al., 1998) permet aussi de conclure à une importante diversité ornithologique du site à toutes saisons. La conduite de cet élevage en agroforesterie (Bestman et al., 2018; Mupepele et al., 2021) dans un paysage agricole régional diversifié (Chiatante et al., 2021; Jeliazkov et al., 2016) n'y est certainement pas étrangère, et le site offre certainement des ressources alimentaires et d'habitat variées convenant à des espèces commensales de niches écologiques variées, tant généralistes que spécialistes des milieux agricoles. Quelques espèces d'avifaune aquatique pouvant faire le lien avec des réservoirs naturels de VIA

ont également été observées sur le site, parfois en groupes de plusieurs centaines mais de façon bien plus ponctuelle. Cette quasi-absence d'hôtes classiquement considérés à risque infectieux pour les canards d'élevage conforte le choix de l'élevage d'étude pour mieux caractériser l'interface avec l'avifaune commensale terrestre indépendamment des littoraux ou zones humides. La présence d'oiseaux aquatiques malgré la géographie terrestre du site étudié suggère cependant que le risque d'introduction de VIA par les réservoirs naturels en élevages avicoles n'est jamais nul quel que soit le contexte. Parmi l'avifaune commensale, la présence parfois en abondance d'espèces en déclin en Europe et en France (Burns et al., 2021; Fontaine et al., 2020) tend à recommander une préservation de ces espèces et notamment sur ce type de site de grand intérêt écologique apparent. La présence sur un élevage avicole en plein air d'une population d'avifaune diversifiée et en faveur d'espèces spécialistes plutôt que d'une population pauvre où les niches écologiques sont comblées par des espèces généralistes pourrait aussi favoriser la résilience sanitaire, par effet de dilution des agents infectieux dans une communauté d'hôtes peu réceptifs (Morand and Lajaunie, 2018a, 2018b). Cependant, l'évaluation plus précise des rôles épidémiologiques de l'avifaune commensale vis-à-vis des agents infectieux aviaires est nécessaire pour prendre aussi en compte dans les moyens de préservation locale le potentiel risque sanitaire qu'elle représenterait au cours d'épidémies majeures comme celles d'IAHP.

L'inventaire ornithologique réalisé autour du site ne permettant pas de caractériser avec certitude les niveaux de contacts de l'avifaune avec l'élevage, des observations individuelles localisées aux zones de vie des canards domestiques ont ensuite été menées. Ces observations directes tenant compte de différents facteurs temporels et environnementaux ont permis de mieux caractériser les modalités fines d'interactions permettant d'éventuels échanges infectieux à l'interface avifaune-élevage. Des espèces initialement recensées en abondance ont ainsi pu être écartées du réseau des contacts majeurs, orientant ainsi l'étude d'interface vers quelques espèces clés au comportement commensal le plus marqué. Celles-ci sont en effet impliquées dans des interactions fréquentes et très proches avec les canards domestiques. L'élevage de canards ici choisi comme modèle voit donc les interactions de son avifaune commensale dominées massivement par les Moineaux domestique et friquet ainsi que par la Bergeronnette grise. Si les moineaux sont couramment recensés en élevages (Gotteland et al., 2009; Lubac et al., 2012; Veen et al., 2007) et parmi les passereaux les plus étudiés pour leur potentiel rôle épidémiologique vis-à-vis des VIA autour des élevages (Brown et al., 2009; Forrest et al., 2010; Gutiérrez et al., 2011; Nemeth et al., 2010), ce n'est à l'heure actuelle pas le cas des bergeronnettes (Shriner and Root, 2020). Celles-ci ont en outre une écologie très différente de celle des moineaux, ce qui a aussi été confirmé sur ce site. Le comportement migratoire partiel et les déplacements potentiels des bergeronnettes grises vers d'autres sites d'intérêt épidémiologique en font une espèce de choix comme possible hôte relais (Caron et al., 2015, 2014). Les rares informations épidémiologiques sur l'espèce vis-à-vis des VIA ou d'autres agents infectieux ont alors justifié l'attention qui leur a été portée dans la suite des travaux présentés.

La comparaison des méthodes d'inventaire a aussi mis en évidence la complémentarité de leurs forces et limites pour caractériser de façon représentative la population d'avifaune commensale ou non du site. Ainsi, si les observations opportunistes se sont révélées plus exhaustives et ont permis de mettre à profit le temps passé sur le site, la quantification des effectifs a semblé plus précise par les protocoles d'observations standardisées ou de captures. Les observations directes des contacts et comportements individuels de l'avifaune sur les parcours extérieurs de l'élevage ont aussi permis de compléter les méthodes d'inventaires précédentes, fournissant une information plus détaillée et localisée aux zones d'intérêt spécifique pour l'étude de l'interface avifaune-élevage. En revanche, des biais de représentativité de ces méthodes d'inventaire ont été aussi supposés ou vérifiés, en particulier au détriment d'espèces plus farouches, cryptiques ou nocturnes. C'est dans le but de combler ce biais qu'a été envisagé le développement d'une méthode d'inventaire par métabarcoding ciblant l'ADNe des oiseaux (Taberlet et al., 2018) sur les prélèvements environnementaux collectés également à des fins d'analyses microbiologiques. Cette méthode sensible mais complexe et non standardisée, en particulier pour le type de prélèvement original envisagé dans ce contexte, a nécessité un long travail de mise au point au niveau de chaque étape du processus qui reste à finaliser. Une fois que la mise au point sera terminée, elle semble cependant très prometteuse pour s'affranchir de multiples contraintes techniques et administratives inhérentes aux méthodes habituelles de caractérisation écologique par observations ou captures. Le métabarcoding de l'ADNe des oiseaux permettrait en effet la réalisation d'un inventaire non quantitatif de l'avifaune cumulant plusieurs jours plutôt qu'en instantané (Deiner et al., 2017; Taberlet et al., 2018), sous simple condition d'accès aux zones d'intérêt pour la collecte des prélèvements. L'application de la méthode pourrait ainsi être envisagée à une échelle spatio-temporelle plus large pour caractériser et comparer par exemple les interfaces avifaune-élevages de différents sites, en s'affranchissant partiellement d'une expertise ornithologique locale. La comparaison d'autres types de sites avec l'élevage de canards étudié ici comme modèle semble en effet nécessaire pour évaluer de façon robuste l'impact de différents facteurs environnementaux sur les populations d'avifaune commensale et leurs modalités de contact avec les volailles.

Afin d'évaluer l'efficacité pour les échanges infectieux des abondances et contacts de l'avifaune objectivés précédemment, une étude longitudinale des profils infectieux à l'interface avifaune-élevage a été ensuite menée. Cette étude a été ciblée sur les espèces sauvages précédemment identifiées pour leur forte abondance ou intensité de contact avec l'élevage, impliquant *a priori* un fort intérêt épidémiologique. Les bergeronnettes grises et moineaux ont donc été ciblés en priorité par les captures pour prélèvements, ainsi que les hérons garde-boeufs par récolte de leurs fèces fraîches, mais toutes espèces capturées ont aussi été prélevées afin de mettre à profit le temps passé sur le terrain pour évaluer plus largement les profils infectieux de l'avifaune commensale méconnue. Les VIA ont été la cible principale des analyses, mais leur faible prévalence attendue dans l'avifaune ciblée saine, peu réceptive et de petite taille (Caron

et al., 2017; Olsen et al., 2006) a conduit à optimiser les prélèvements pour accroître les chances de détection virale et sérologique. En complément de l'avifaune, les compartiments domestique et environnemental de l'interface ont été prélevés afin d'identifier des similarités de souches indiquant de possibles partages infectieux par voies directe ou indirecte. Pour encore optimiser les probabilités de détection de telles voies de transmission virales, des agents infectieux plus robustes que les VIA ont été envisagés comme marqueurs d'échanges infectieux et recherchés dans la triade de compartiments à l'interface avifaune-élevage.

Une étude préliminaire a évalué le rôle potentiel de la bactérie MG comme tel marqueur dans différentes populations aviaires sauvages et domestiques de la région d'étude. Il s'est avéré que MG ne constitue pas un bon marqueur car présent uniquement dans les prélèvements de quelques volailles de basses-cours du Gers. Mais une nouvelle espèce de mycoplasme proche et confondue par les tests de diagnostic moléculaire communément utilisés a été détectée, puis caractérisée génétiquement et épidémiologiquement dans ces populations. Seule l'avifaune s'est révélée porteuse, mais un tropisme strictement cloacal et asymptomatique chez un grand nombre d'étourneaux sansonnets commensaux des élevages de volailles suggère une possibilité de contamination environnementale à laquelle une bergeronnette grise s'est révélée exposée. Cette étude a donc mis en évidence l'existence de flux infectieux méconnus parmi le réseau de contacts entre hôtes de l'avifaune commensale. Cela suggère aussi une pression infectieuse exercée par l'avifaune commensale, pouvant représenter un réservoir de gènes pour des agents infectieux et un risque de « spillover » vers les élevages de volailles en plein air.

Par la suite, d'autres marqueurs d'échanges infectieux plus pertinents dans le contexte de notre modèle de l'élevage de canards du Gers ont alors été sélectionnés et recherchés dans les prélèvements collectés. Des méthodes de recherche moléculaire à large spectre ont donc été développées à partir de protocoles décrits dans la littérature pour cibler : la sous-famille des *Avulavirinae* (dont uniquement les NDV par sérologie), la sous-famille des *Orthocoronavirinae*, et la famille des *Chlamydiaceae*. De la même façon que pour les VIA, les souches détectées ont ensuite été identifiées afin de caractériser des similarités entre compartiments indiquant de possibles partages infectieux à l'interface. Seuls les VIA et chlamydia ont été détectés dans chacun des compartiments de l'interface, ces derniers constituant donc *a priori* de bons marqueurs pour étudier l'interface épidémiologique considérée. Les identifications des souches de VIA et chlamydia ont cependant fréquemment buté sur les limites techniques inhérentes à l'avifaune commensale (Munster et al., 2007; Slusher et al., 2014) : faibles prévalences donc peu d'échantillons positifs, charges infectieuses très faibles à la limite des capacités de détection pourtant élevées des tests utilisés. Il a donc été souvent impossible d'isoler ou de séquencer finement les souches de VIA ou chlamydia détectées dans l'avifaune, hormis trois nouvelles souches de *C. abortus* aviaires (Krawiec et al., 2015; Szymańska-Czerwińska et al., 2017) parmi les neuf passereaux positifs aux *Chlamydiaceae*. Au contraire, les souches issues des canards ou de leur environnement ont été la plupart du temps identifiées

et correspondaient à des souches habituellement identifiées dans ce type d'élevages : VIA faiblement pathogènes de sous-types H6, H7 et H11 (Cherbonnel et al., 2007; Marinova-Petkova et al., 2016), *Chlamydia psittaci* de souche GR9 (Hulin et al., 2016; Vorimore et al., 2015). Les échantillons positifs par (RT)qPCR restant non identifiés et non isolés, en particulier dans l'avifaune, maintiennent donc le flou sur l'effectivité des échanges infectieux entre compartiments de l'interface. L'avifaune commensale a en effet présenté des portages de VIA (ARN et anticorps), de NDV (anticorps) et de chlamydia (ADN), ce qui en fait probablement des hôtes susceptibles et capables de contribuer à la circulation de ces agents infectieux à l'interface avec l'élevage. Malgré les limites évoquées, les identifications obtenues sont cependant toutes différentes entre l'avifaune et l'élevage, et les prévalences toujours faibles dans l'avifaune commensale et en particulier dans les espèces ayant des interactions intenses. Ces faits suggèrent donc tout de même une absence de maintien par l'avifaune commensale et une transmission minimale (non épidémique au moins) des agents infectieux étudiés à l'interface, pourtant parfois détectés abondamment et de façon prolongée dans le compartiment domestique et dans l'environnement partagé. L'étude ne s'est cependant pas déroulée de manière contemporaine à une circulation locale de VIAHP. De tels virus hautement infectieux pourraient en effet présenter un profil différent de transmission à l'interface entre avifaune commensale et élevage, notamment via les contacts objectivés avec certaines espèces sauvages.

Les difficultés rencontrées dans la détection et l'identification des agents infectieux de l'avifaune commensale malgré les tailles d'échantillon importantes et la multiplication des modes de prélèvement et d'analyse laissent penser que l'étude microbiologique de cette population requiert des méthodes encore davantage sensibles et résolutive taxonomiquement que les (RT)qPCR utilisées. L'approche métagénomique sans *a priori* explorant l'ensemble du microbiome ou du virome, en cours de démocratisation, pourrait être une solution à ce type de limites (Jahan et al., 2021; Ma et al., 2020; Wille et al., 2019). Le coût encore onéreux et la complexité technique de ce type d'analyse pourraient cependant la réserver à une phase préalable d'identification de marqueurs infectieux pertinents à l'interface, qu'une deuxième phase d'analyse ciblée étendue à l'ensemble des échantillons permettrait alors de mieux caractériser entre espèces et au cours du temps à la façon de l'étude présentée ici.

La prise en compte originale pour ce type de contexte des prélèvements environnementaux a permis d'informer sur les contaminations infectieuses de l'environnement auxquelles les canards domestiques ou l'avifaune observée fréquemment dans les zones échantillonnées pouvaient être exposés. Les souches identifiées étaient sans surprise les mêmes que celles des canards présents en permanence et par milliers sur ces zones, montrant aussi l'importance de la charge microbiologique environnementale que peut produire un élevage en plein air et à laquelle est exposée l'avifaune commensale. La récolte de ces prélèvements a été simple et rapide, et a demandé peu de contraintes techniques hormis celles inhérentes à la biosécurité lors de l'accès aux zones de vie des animaux d'élevage. Aussi, la mise à profit de ces mêmes

prélèvements environnementaux pour l'analyse, en cours de développement, de métabarcoding sur l'ADNe permettra de profiter du même processus relativement fastidieux de prétraitement, avant purification et analyse des acides nucléiques pour des agents infectieux et des hôtes aviaires. L'analyse des prélèvements environnementaux a donc aussi l'avantage de fournir une information semblable mais plus complète que celle obtenue par observation des contacts individuels entre l'avifaune et les canards. En effet, la présence d'ADNe des hôtes ainsi que d'acides nucléiques d'agents infectieux serait ainsi localisée précisément (c'est-à-dire au niveau des zones échantillonnées) et informerait sur la potentielle contamination infectieuse environnementale par les espèces hôtes identifiées. Bien que les phases analytiques de biologie moléculaire (amplification et séquençage) soient encore délicates et onéreuses, la possibilité d'analyser simultanément de multiples échantillons permettrait de réduire le temps et le coût de traitement. L'application de la méthode de métabarcoding couplée à l'analyse microbiologique sur les prélèvements environnementaux pourrait ainsi être envisagée à une échelle spatio-temporelle plus large. Il serait notamment intéressant d'utiliser cette approche pour caractériser et comparer les interfaces avifaune-élevages de différents sites, en s'affranchissant partiellement d'une expertise ornithologique locale. On pourrait ainsi explorer l'interface avec d'autres conduites d'élevage (agroforesterie ou non, plein air ou non), d'autres espèces de volailles, ou d'autres contextes climatiques et géographiques (proximité de littoraux ou zones humides, densités en élevages avicoles, paysage agricole, proximité du couloir migratoire). Cette comparaison d'autres types de sites avec l'élevage de canards étudié ici comme modèle semble en effet nécessaire pour évaluer l'impact des différents facteurs évoqués sur les contacts des populations d'avifaune avec les volailles et sur les expositions infectieuses associées. Dans la même idée de récolter rapidement et pour un effort et une expertise de terrain moindres des prélèvements, une approche plus individuelle de prélèvement environnemental de l'avifaune par leurs fèces pourrait être associée, comme nous l'avons présenté ici sur les hérons garde-bœufs. Réalisée rapidement après le dépôt des fèces, cette récolte est jugée aussi fiable qu'un écouvillon cloacal tout en étant non invasive pour la population sauvage et évitant les contraintes techniques et administratives liées à leur capture (Coombe et al., 2021; Latorre-Margalef et al., 2016; Torrontegi et al., 2019). En se concentrant sur des zones d'agrégation de l'avifaune ciblée plus riches en fèces (dortoir, perchoirs, aires d'alimentation), un grand nombre de prélèvements peuvent ainsi être récoltés en peu de temps. Certaines de ces zones peuvent même être superposées avec les zones de vie des volailles d'élevage ce qui fournit alors une information sur de possibles contaminations environnementales par l'avifaune : contrebas des bordures de toits et autres perchoirs, matériel utilisé comme perchoir, sol des parcours en général. En cas de doute sur l'espèce de provenance des fèces, un séquençage rapide de la cible de barcoding de l'échantillon permet alors d'en identifier l'espèce précise (Torrontegi et al., 2019). L'étude présentée ici a d'abord mis en évidence le rôle central des bergeronnettes grises dans le réseau de contacts connectant les canards de l'élevage d'étude avec l'ensemble de la communauté d'hôtes

aviaires, puis a permis de détecter chez cette espèce trois des agents infectieux (ou anticorps spécifiques) recherchés et pouvant être partagés avec les canards : VIA, NDV, chlamydia. Cette espèce très mobile et attirée par les élevages et les zones humides constitue donc effectivement un potentiel hôte relais entre l'élevage et les autres sites voisins d'intérêt épidémiologique (Caron et al., 2015, 2014). Une étude de suivi des déplacements individuels des bergeronnettes grises par télémétrie a donc été initiée afin de caractériser leurs comportements de déplacement et mettre en évidence d'éventuelles connexions inter-sites. La méthode employée par technologie VHF se montre fastidieuse et détecte assez peu les oiseaux lorsqu'ils ne sont pas concentrés sur l'élevage, mais elle semble à ce jour la seule adaptée à cette petite espèce et pour répondre à des besoins de localisation aussi précise. Les premiers mois de suivi présentés ici en période de migration pré-nuptiale puis reproduction ont tout de même déjà mis en évidence des connexions espacées de quelques heures entre l'élevage d'étude et un autre élevage de volailles proche, ainsi qu'avec les abords des cours et plans d'eau voisins. Des individus non localisés à l'extérieur de l'élevage sont aussi détectés en alternance sur celui-ci, suggérant des déplacements quotidiens entre sites. Le suivi devra se prolonger durant l'hiver suivant pour comparer les déplacements entre saisons biologiques et avec des pressions infectieuses généralement différentes (élévation du niveau de risque pour l'IAHP dès l'automne 2021). Les premières connexions individuelles objectivées permettent déjà de confirmer le rôle potentiel d'hôte relais des bergeronnettes grises sur le site étudié. Si l'espèce s'est avérée peu porteuse des agents infectieux étudiés hors contexte épidémique, son rôle de potentiel relais infectieux doit être pris en compte dans la gestion locale des mesures préventives d'épidémies, en particulier d'IAHP. L'extension de l'étude d'interface à d'autres élevages de la filière avicole du Sud-Ouest devrait permettre aussi d'évaluer plus largement la distribution de cet hôte commensal des élevages.

En parallèle des bergeronnettes grises, les hérons garde-bœufs ont été ciblés lors de l'étude comme potentiels hôtes relais d'après leur écologie et leur abondance sur l'élevage de canards durant l'hiver en particulier. L'espèce difficile à capturer a donc été seulement prélevée par récolte de fèces, dont seulement une a présenté une faible charge de VIA faiblement pathogène. La quasi absence de détections microbiologiques dans cette population étudiée contraste avec les résultats d'études précédentes, réalisées avec les mêmes méthodes dans la même région, qui ont montré des prévalences élevées de chlamydia et de mycoplasmes (Phouratsamay, 2018). L'échantillon ici limité à un groupe connecté à l'élevage et durant quelques semaines de l'hiver a pu réduire les chances de détections si des agents infectieux étaient excrétés à d'autres périodes de l'année ou à bas bruit. Les hérons garde-bœufs sont généralement jugés comme de bons hôtes relais potentiels, de par leur écologie mobile entre élevages et zones humides et leur réceptivité infectieuse plus proche de celle des volailles (Caron et al., 2014; Veen et al., 2007). De la même façon que les bergeronnettes grises, l'étude de leur déplacements individuels autour de l'élevage de canards permettrait de mieux objectiver ce potentiel rôle de relais, en particulier dans cette région où l'écologie de l'espèce, en expansion, est relativement méconnue. Grâce à une taille

plus importante que les bergeronnettes grises, les mouvements de hérons garde-bœufs pourraient ainsi être suivis de façon précise, quasi instantanée et illimitée en distance par des technologies GPS.

Finalement, l'étude menée sur l'élevage de canards en plein air du Gers choisi comme modèle a mis en évidence des interactions et des profils infectieux de l'avifaune commensale des élevages suggérant différents rôles épidémiologiques selon les espèces. Parmi les espèces étudiées, appartenant essentiellement à l'avifaune terrestre ainsi que quelques-unes plus aquatiques (hérons garde-bœufs, bécassines des marais), aucune ne semble jouer un rôle d'hôte de maintenance pour des agents infectieux présents chez les volailles. Cependant, la détection de souches communes entre espèces commensales (mycoplasme d'étourneau, *C. abortus*) a révélé l'efficacité du réseau de contacts entre espèces sympatriques pour les échanges infectieux. Ce réseau est intensément connecté au compartiment domestique via les bergeronnettes grises et moineaux domestiques et friquets, mais les transmissions infectieuses à l'interface semblent très sporadiques (voire absentes car non objectivées) dans le contexte étudié. Ces interactions directes et indirectes entre avifaune et canards pourraient cependant s'avérer plus efficaces pour des agents plus infectieux tels que les VIAHP. Cela justifie les mesures réglementaires actuelles de restriction préventive des contacts en élevages, renforcées en région et période à risque d'IAHP (DGAL, 2021a). Par leur abondance en élevages, leur écologie mobile et leur réceptivité au moins ponctuelle aux agents infectieux des volailles, les bergeronnettes grises et les hérons garde-bœufs pourraient aussi représenter des hôtes relais locaux permettant la connexion écologique entre sites d'intérêt (élevages et zones humides). Une prévention plus particulière des contacts avec ces espèces, du moins en période à risque d'IAHP, semble donc primordiale.

Les mesures de lutte préventive contre l'avifaune sur les exploitations agricoles peuvent être de natures très variées (Aubin, 1990; Conover and Perito, 1981; Elbers and Gonzales, 2021; Seamans and Gosser, 2016; Shriner et al., 2016) et visent généralement à éviter un risque immédiat sanitaire ou productif (dégâts dans les semis ou stocks de grains). Certains dépeuplements par piégeages ou tirs sont même parfois organisés pour des espèces dites anciennement « nuisibles » et aujourd'hui « susceptibles d'occasionner des dégâts » (ESOD) telles que les Corvidés, pour éviter la menace immédiate sur les productions (Jiguet, 2020). Le maillage géographique de sites couverts par de telles mesures pourrait alors contribuer à menacer les espèces spécialistes de milieux agricoles qui dépendent de ces habitats spécifiques. À l'inverse, les espèces généralistes se satisferont d'habitats voisins (Guetté et al., 2017) voire esquivent les mesures par habitude (Elbers and Gonzales, 2021; Lubac et al., 2012; Seamans and Gosser, 2016). En effet, les espèces au comportement commensal le plus marqué sont aussi celles qui vivent généralement au plus près des activités humaines (Anderson, 2006; Guetté et al., 2017; Veen et al., 2007), montrant alors une grande habileté et intelligence à contourner les contraintes environnantes comme on a pu l'observer avec les filets de capture durant cette étude. De plus, la mise en place de mesures d'éloignement de l'avifaune est une contrainte technique et financière supplémentaire pour les

exploitants agricoles, et semble parfois incompatible avec les systèmes d'élevage extensifs en plein air. Ceci est d'autant plus vrai qu'on vise à éloigner des espèces d'oiseaux commensales qui tenteront en permanence de profiter de toute faille du système, et dans toutes dimensions de l'espace. Quant aux dépeuplements localisés, leur efficacité est jugée nulle à moyen ou long terme pour éloigner les espèces ciblées d'un site ou réduire le risque sanitaire qu'elles représentent (Jiguet, 2020; Prentice et al., 2019). Des agents infectieux tels que les VIA dont le réservoir naturel ne peut pas être éradiqué et constitue une pression infectieuse permanente nécessitent donc de contrôler les transmissions infectieuses à l'interface sauvage-domestique (Gortazar et al., 2015; Gortázar et al., 2007). Une adaptation des mesures d'éloignement de l'avifaune sur les élevages doit donc être considérée de façon raisonnée pour garantir une efficacité minimale sur un risque objectif, tout en limitant les contraintes pour les systèmes de production concernés. Dans le contexte qui nous intéresse de la prévention des transmissions de VIAHP à l'interface avifaune-élevages, cette adaptation pourra notamment être faite en ciblant le plus finement les zones à risque (volailles, aliment, litière, matériel, chemins d'accès) et la période à risque (foyers d'IAHP, abondance d'espèces hôtes) (Lubac et al., 2012), afin d'éviter l'habituation tout en réduisant l'impact zootechnique et économique, et en permettant de maintenir l'accès aux populations d'avifaune sauvage à des ressources et habitats spécifiques. Bien que contraires aux exigences des productions de volailles sous SIQO et des pratiques durables d'élevage en plein air, la claustration momentanée des volailles en plein air en période à risque paraît alors le moyen le plus raisonnable d'éviter les contacts directs et indirects avec l'avifaune (Central Veterinary Institute, Wageningen University et al., 2017; Wageningen Bioveterinary Research and Elbers, 2021). La meilleure connaissance globale de l'écologie et de l'épidémiologie de l'avifaune dans les milieux agricoles variés est aussi nécessaire pour maintenir des mesures de restriction des contacts adaptées au contexte, et l'étude présentée ici ainsi que ses perspectives futures y contribuent en partie.

Au-delà de l'éloignement de l'avifaune en élevages, les mesures de prévention des transmissions infectieuses à l'interface devraient aussi veiller à limiter la contamination microbologique environnementale que les élevages en plein air produisent. Cette contamination a été mise en évidence par l'étude présentée ici, et d'autres travaux scientifiques en ont avéré l'extension par ruissèlement dans les sols et le système hydrique (Dufour et al., 2012; Mawdsley et al., 1995). Une limitation de cette contamination pourrait alors limiter l'exposition de l'avifaune aux agents infectieux des volailles, réduisant ainsi le risque de formation de réservoirs secondaires ou de relais entre sites par les espèces mobiles. Si les risques de contamination environnementale ne peuvent certainement pas être totalement anéantis, ils peuvent en revanche être réduits au maximum par quelques mesures raisonnées sur le moyen à long terme. On peut citer par exemple l'implantation géographique des sites d'élevages à l'écart de zones de diversité aviaire (zones humides ou littorales en particulier) (Velkers et al., 2020), ou encore l'adaptation de la configuration des structures d'élevage évitant les risques d'écoulements d'eau et les

vents dominants vers et depuis les animaux, et enfin et surtout par l'application la plus rigoureuse possible des mesures de biosécurité permanentes. Des failles dans ces mesures quotidiennes ont en effet été identifiées comme facteurs majeurs pour le risque de transmission infectieuse entre élevages voire avec l'avifaune (Guinat et al., 2020a; Ssematimba et al., 2013). À défaut de disposer d'installations optimales préalablement à un épisode d'IAHP, là encore seule la claustration en bâtiment dont le ruissellement d'eau ne s'épandrait pas directement dans l'environnement pourrait permettre de réduire immédiatement une contamination environnementale par un élevage infecté.

Outre la contamination environnementale, de fortes prévalences ont été observées parmi les lots de canards pour *Chlamydia psittaci*, qui est zoonotique (Laroucau et al., 2009; Vorimore et al., 2015), ou pour des VIAFP réservoirs de gènes pour l'émergence de souches potentiellement zoonotiques (Beerens et al., 2017; Gilbert et al., 2017). La moindre pathogénicité de ces agents chez les canards peut avoir un effet négatif sur la surveillance et la prévention sanitaire, puisqu'elle masque les circulations infectieuses parfois massives dans et entre les lots. L'élevage de grands lots de canards en plein air puis en salles d'engraissement confinées favorise en outre les transmissions avec d'autres espèces animales ou l'Homme, par contacts directs ou indirects. On constate donc l'important rôle de réservoir infectieux que peuvent représenter ces élevages, avec de potentiels impacts éthiques et écologiques pour la faune, et de santé publique pour les humains à leur contact. Ces menaces pour la faune et la santé humaine s'ajoutent aux impacts éthiques, sanitaires et économiques pour toute la filière lorsqu'une épidémie de VIAHP se déclenche. La durabilité des élevages de volailles et en particulier de palmipèdes en plein air est donc de plus en plus fragilisée avec la récurrence d'épisodes dévastateurs (EFSA et al., 2021a, 2017; Le Bouquin et al., 2016). Pourtant, l'élevage en plein air est presque indissociable de l'élevage de palmipèdes, pour le comportement de ces espèces et pour des raisons zootechniques liées à la production importante de lisier. De plus, le microbiote bactérien et viral riche que favoriserait l'élevage en plein air (Cui et al., 2017; Ocejo et al., 2019; Seidlerova et al., 2020) pourrait aussi jouer un rôle protecteur pour la pathogénicité globale des agents infectieux, par effet flore de barrière. Ainsi le microbiote global peut avoir un effet protecteur contre les VIAHP (Figuroa et al., 2020). On sait aussi que certains VIAFP peuvent protéger directement (compétition) ou indirectement (anticorps) contre une infection à VIAHP chez les canards (Bessière et al., 2021; Koethe et al., 2020), ou qu'une infection initiale par mycoplasme peut inhiber l'infectiosité respiratoire d'un VIA (Sid et al., 2016). L'élevage en plein air pourrait donc représenter un facteur protecteur pour le bien-être et la santé des canards. Mais cette protection ne serait effective que dans une certaine limite, comme l'ont montré les récurrences d'épidémies à VIAHP, favorisées par les systèmes en plein air très perméables aux introductions infectieuses (Delpont et al., 2021; Koch and Elbers, 2006). Face à ces menaces sanitaires sur un système de production qui est pourtant plébiscité par l'évolution sociétale actuelle vers plus de durabilité, un défi complexe s'impose pour repenser les systèmes d'élevages de volailles du Sud-Ouest français. Ce défi repose alors sur l'atténuation du risque

lié aux introductions de VIAHP par l'avifaune, diffus et inévitable (Anses, 2021; DGAL, 2021b), pour aller vers une plus grande résilience et durabilité de la filière, sur les plans sanitaire et environnemental. Pour contribuer à répondre à ces enjeux, la mise en place d'une stratégie de vaccination « préventive d'urgence » contre les VIAHP est actuellement étudiée, ciblant en priorité les palmipèdes du Sud-Ouest en période à risque (CGAAER, 2021).

Le contrôle des transmissions infectieuses à l'interface avifaune-élevages pour les VIA à réservoir naturel ubiquitaire passe donc essentiellement par la restriction des contacts avec l'avifaune et des contaminations environnementales par les élevages (Gortazar et al., 2015; Gortázar et al., 2007). Si l'éradication de l'immense et diffus réservoir naturel des VIA dans l'avifaune aquatique est inimaginable, la réduction de la pression infectieuse globale exercée par cette population sur les élevages pourrait toutefois être influencée grâce à des mesures de gestion. En effet, le risque d'introduction de VIAHP en élevages situés à proximité de zones humides semble réduit lorsque ces zones sont protégées par des réglementations locales ou internationales (sites classés RAMSAR notamment), plutôt que sans protection particulière (Wu et al., 2019). La préservation de telles zones implique en effet une distanciation réglementaire des activités humaines dont l'élevage, ainsi que la conservation d'un habitat naturel fournissant les ressources nécessaires à l'avifaune aquatique qui se disperserait donc moins à proximité des élevages environnants. À l'image de la préservation d'une communauté d'avifaune commensale riche autour des élevages, la préservation des zones humides pour favoriser la richesse en espèces aquatiques de réceptivité variée pour les VIA pourrait aussi contribuer à l'effet de dilution infectieuse (Morand and Lajaunie, 2018a, 2018b). Ce cloisonnement des zones de production et de conservation de biodiversité est le principe fondant le concept de « land sparing » élaboré par des chercheurs de l'Université de Cambridge (Balmford, 2021). La structuration géographique raisonnée des paysages agricoles consisterait ainsi à concentrer les productions sur de multiples petites surfaces laissant la place entre elles au fonctionnement naturel des écosystèmes et de la biodiversité. Cela va donc à l'opposé de la tendance générale de « land sharing » que favorise l'expansion actuelle de l'agriculture extensive et moins productive favorable à la biodiversité de façon plus diffuse. En effet, le « land sparing » impliquerait d'intensifier localement les productions agricoles (élevages et cultures) par l'augmentation raisonnée des rendements. Ce concept promet ainsi d'assurer et maintenir durablement la sécurité alimentaire par des systèmes de production résilients, tout en préservant la biodiversité. Confortant ce principe, la fragmentation géographique d'une grande partie des paysages agricoles du Sud-Ouest de la France en des aires de production espacées de boisements sur les zones plus escarpées et les ripisylves tend déjà à s'approcher d'un tel schéma de « land sparing ». Ce type de paysage fragmenté semble aussi favorable à la biodiversité du moins aviaire, comme l'étude présentée ici l'a montré (Chiatante et al., 2021; Jeliaskov et al., 2016).





Références bibliographiques

- Abd El-Hamid, H.S., Shafi, M.E., Albaqami, N.M., Ellakany, H.F., Abdelaziz, N.M., Abdelaziz, M.N., Abd El-Hack, M.E., Taha, A.E., Alanazi, K.M., Elbestawy, A.R., 2020. Sequence analysis and pathogenicity of Avian Orthoavulavirus 1 strains isolated from poultry flocks during 2015–2019. *BMC Vet. Res.* 16, 253. <https://doi.org/10.1186/s12917-020-02470-9>
- Agreste, la statistique agricole, 2020a. En France, la consommation de viande se modifie fortement entre 1960 et 2018. *Primeur* 1–5.
- Agreste, la statistique agricole, 2020b. Alimentation. Signes de qualité, in: *Graph'Agri 2020*. pp. 118–121.
- Agreste, la statistique agricole, 2020c. Produits agroalimentaires. Aviculture et cuniculture, in: *Graph'Agri 2020*. pp. 169–173.
- Agreste, la statistique agricole, 2015. Après une année 2013 en léger repli, la production de foie gras s'est accrue en 2014. *Agreste Synthèses Avic. - Foie Gras* 1–5.
- Agreste, la statistique agricole, 2010. Les exploitations avicoles en 2008 : Les volailles de qualité marquent le pas. *Primeur*.
- Ahad, A., Thornton, R.N., Rabbani, M., Yaqub, T., Younus, M., Muhammad, K., Mahmood, A., Shabbir, M.Z., Kashem, M.A., Islam, Md.Z., Mangtani, P., Burgess, G.W., Tun, H.M., Hoque, Md.A., 2014. Risk factors for H7 and H9 infection in commercial poultry farm workers in provinces within Pakistan. *Prev. Vet. Med.* 117, 610–614. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.10.007>
- Alerstam, T., Ulfstrand, S., 1974. A Radar Study of the Autumn Migration of Wood Pigeons *Columba Palumbus* in Southern Scandinavia. *Ibis* 116, 522–542. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1974.tb07649.x>
- Alexander, D.J., 2011. Newcastle disease in the European Union 2000 to 2009. *Avian Pathol.* 40, 547–558. <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.618823>
- Alexander, D.J., 2009. Ecology and Epidemiology of Newcastle Disease, in: Capua, I., Alexander, D.J. (Eds.), *Avian Influenza and Newcastle Disease: A Field and Laboratory Manual*. Springer Milan, Milano, pp. 19–26. https://doi.org/10.1007/978-88-470-0826-7_2
- Alexander, D.J., 2003. Avian Influenza: Historical Aspects. *Avian Dis.* 47, 4–13.
- Alexander, D.J., 1982. Ecological aspects of influenza A viruses in animals and their relationship to human influenza: a review. *J. R. Soc. Med.* 75, 799–811.
- Alexander, D.J., Aldous, E.W., Fuller, C.M., 2012. The long view: a selective review of 40 years of Newcastle disease research. *Avian Pathol.* 41, 329–335. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.697991>
- Alexandratos, N., Bruinsma, J., 2012. World agriculture towards 2030/2050: the 2012 revision (ESA Working paper No. 12– 03). FAO, Rome.
- Amery-Gale, J., Legione, A.R., Marendia, M.S., Owens, J., Eden, P.A., Konsak-Ilievski, B.M., Whiteley, P.L., Dobson, E.C., Browne, E.A., Slocombe, R.F., Devlin, J.M., 2020. Surveillance for *Chlamydia* spp. with Multilocus Sequence Typing analysis in wild and captive birds in Victoria, Australia. *J. Wildl. Dis.* 56, 1–11. <https://doi.org/10.7589/2018-11-281>

- Andersen, K., Bird, K.L., Rasmussen, M., Haile, J., Breuning-Madsen, H., Kjaer, K.H., Orlando, L., Gilbert, M.T.P., Willerslev, E., 2012. Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. *Mol. Ecol.* 21, 1966–1979. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05261.x>
- Anderson, T., 2006. *Biology of the Ubiquitous House Sparrow: From Genes to Populations*. Oxford University Press, New York. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780195304114.001.0001>
- Anses, 2021. Avis relatif à un retour d'expérience sur la crise influenza aviaire hautement pathogène 2020-2021 (1ère partie) (No. Saisine n° 2021-SA-0022). Anses - Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail, Maisons-Alfort, France.
- Anses, 2016. Avis relatif au « risque de maintien de l'infection à Influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) H5 par l'avifaune non migratrice, dans la zone réglementée du Sud-Ouest de la France » (No. Saisine n° 2016-SA-0059). Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail.
- Arenas, A., Carranza, J., Perea, A., Miranda, A., Maldonado, A., Hermoso, M., 1990. Type a influenza viruses in birds in southern Spain: Serological survey by enzyme-linked immunosorbent assay and haemagglutination inhibition tests. *Avian Pathol.* 19, 539–546. <https://doi.org/10.1080/03079459008418706>
- Aubin, F., 2020. Mise en place d'une méthode de détection et d'identification moléculaire de l'avifaune à partir de prélèvements environnementaux (Thèse d'exercice vétérinaire). Université Paul Sabatier Toulouse.
- Aubin, T., 1990. Synthetic bird calls and their application to scaring methods. *Ibis* 132, 290–299. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1990.tb01046.x>
- Ayala, A.J., Dimitrov, K.M., Becker, C.R., Goraichuk, I.V., Arns, C.W., Bolotin, V.I., Ferreira, H.L., Gerilovych, A.P., Goujgoulova, G.V., Martini, M.C., Muzyka, D.V., Orsi, M.A., Scagion, G.P., Silva, R.K., Solodiankin, O.S., Stegnyy, B.T., Miller, P.J., Afonso, C.L., 2016. Presence of Vaccine-Derived Newcastle Disease Viruses in Wild Birds. *PLOS ONE* 11, e0162484. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162484>
- Ayala, A.J., Yabsley, M.J., Hernandez, S.M., 2020. A Review of Pathogen Transmission at the Backyard Chicken–Wild Bird Interface. *Front. Vet. Sci.* 7, 539925. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.539925>
- Badham, M.D., Rossman, J.S., 2016. Filamentous Influenza Viruses. *Curr. Clin. Microbiol. Rep.* 3, 155–161. <https://doi.org/10.1007/s40588-016-0041-7>
- Baigent, S.J., McCauley, J.W., 2003. Influenza type A in humans, mammals and birds: Determinants of virus virulence, host-range and interspecies transmission. *BioEssays* 25, 657–671. <https://doi.org/10.1002/bies.10303>
- Balmford, A., 2021. Concentrating vs. spreading our footprint: how to meet humanity's needs at least cost to nature. *J. Zool.* 315, 79–109. <https://doi.org/10.1111/jzo.12920>
- Barbet-Massin, M., Thuiller, W., Jiguet, F., 2012. The fate of European breeding birds under climate, land-use and dispersal scenarios. *Glob. Change Biol.* 18, 881–890. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2486.2011.02552.x>
- Beaudoin, A.L., Kitikoon, P., Schreiner, P.J., Singer, R.S., Sasipreeyajan, J., Amonsin, A., Gramer, M.R., Pakinsee, S., Bender, J.B., 2014. Risk Factors for Exposure to Influenza A Viruses, Including Subtype H5 Viruses, in Thai Free-Grazing Ducks. *Transbound. Emerg. Dis.* 61, 362–374. <https://doi.org/10.1111/tbed.12043>

- Becker, W.B., 1966. The isolation and classification of Tern virus: Influenza Virus A/Tern/South Africa/1961. *J. Hyg. (Lond.)* 64, 309–320. <https://doi.org/10.1017/S0022172400040596>
- Beerens, N., Heutink, R., Bergervoet, S.A., Harders, F., Bossers, A., Koch, G., 2017. Multiple Reassorted Viruses as Cause of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Epidemic, the Netherlands, 2016. *Emerg. Infect. Dis.* 23, 1974–1981. <https://doi.org/10.3201/eid2312.171062>
- Bekó, K., Kreizinger, Z., Sulyok, K.M., Kovács, Á.B., Gróznér, D., Catania, S., Bradbury, J., Lysnyansky, I., Olaogun, O.M., Czanik, B., Ellakany, H., Gyuranecz, M., 2019. Genotyping *Mycoplasma gallisepticum* by multilocus sequence typing. *Vet. Microbiol.* 231, 191–196. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.03.016>
- Bergervoet, S.A., Pritz-Verschuren, S.B.E., Gonzales, J.L., Bossers, A., Poen, M.J., Dutta, J., Khan, Z., Kriti, D., van Bakel, H., Bouwstra, R., Fouchier, R.A.M., Beerens, N., 2019. Circulation of low pathogenic avian influenza (LPAI) viruses in wild birds and poultry in the Netherlands, 2006–2016. *Sci. Rep.* 9, 13681. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50170-8>
- Bessei, W., 2018. Impact of animal welfare on worldwide poultry production. *Worlds Poult. Sci. J.* 74, 211–224. <https://doi.org/10.1017/S0043933918000028>
- Bessière, P., Figueroa, T., Coggon, A., Foret-Lucas, C., Houffschmitt, A., Fusade-Boyer, M., Dupré, G., Guérin, J.-L., Delverdier, M., Volmer, R., 2021. Opposite outcomes of the within-host competition between highly and low pathogenic H5N8 avian influenza viruses in chickens compared to ducks. *J. Virol.* JVI0136621. <https://doi.org/10.1128/JVI.01366-21>
- Bestman, M., de Jong, W., Wagenaar, J.-P., Weerts, T., 2018. Presence of avian influenza risk birds in and around poultry free-range areas in relation to range vegetation and openness of surrounding landscape. *Agrofor. Syst.* 92, 1001–1008. <https://doi.org/10.1007/s10457-017-0117-2>
- Bicout, J.D., Artois, M., Musseau, R., Caparros, O., Lubac, S., 2011. Which wild birds are potentially at risk for contacts between wild avifauna and with poultry?, in: 9èmes Journées de la Recherche Avicole, Tours, France. Presented at the 9èmes Journées de la Recherche Avicole, World's Poultry Science Association (WPSA), Tours, France, p. 5pp.
- BirdLife International, 2021. European Red List of Birds, Publications Office of the European Union. ed. BirdLife International, Luxembourg.
- Blagodatski, A., Trutneva, K., Glazova, O., Mityaeva, O., Shevkova, L., Kegeles, E., Onyanov, N., Fede, K., Maznina, A., Khavina, E., Yeo, S.-J., Park, H., Volchkov, P., 2021. Avian Influenza in Wild Birds and Poultry: Dissemination Pathways, Monitoring Methods, and Virus Ecology. *Pathogens* 10, 630. <https://doi.org/10.3390/pathogens10050630>
- Bos, M.E.H., Nielen, M., Koch, G., Bouma, A., De Jong, M.C.M., Stegeman, A., 2009. Back-calculation method shows that within-flock transmission of highly pathogenic avian influenza (H7N7) virus in the Netherlands is not influenced by housing risk factors. *Prev. Vet. Med.* 88, 278–285. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.12.003>
- Bosco-Lauth, A.M., Marlenee, N.L., Hartwig, A.E., Bowen, R.A., Root, J.J., 2019. Shedding of clade 2.3.4.4 H5N8 and H5N2 highly pathogenic avian influenza viruses in peridomestic wild birds in the U.S. *Transbound. Emerg. Dis.* <https://doi.org/10.1111/tbed.13147>
- Bourgeois, L., Demotes-Mainard, M., 2000. Les cinquante ans qui ont changé l'agriculture française. *Économie Rurale* 255, 14–20. <https://doi.org/10.3406/ecoru.2000.5151>

- Bray, J.R., Curtis, J.T., 1957. An Ordination of the Upland Forest Communities of Southern Wisconsin. *Ecol. Monogr.* 27, 325–349. <https://doi.org/10.2307/1942268>
- Breban, R., Drake, J.M., Stallknecht, D.E., Rohani, P., 2009. The Role of Environmental Transmission in Recurrent Avian Influenza Epidemics. *PLoS Comput. Biol.* 5, e1000346. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1000346>
- Briand, F.-X., Niqueux, E., Schmitz, A., Martenot, C., Cherbonnel, M., Massin, P., Kerbrat, F., Chatel, M., Guillemoto, C., Guillou-Cloarec, C., Ogor, K., Le Prioux, A., Allée, C., Beven, V., Hirchaud, E., Blanchard, Y., Scoizec, A., Le Bouquin, S., Eterradosi, N., Grasland, B., 2021. Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Virus Spread by Short- and Long-Range Transmission, France, 2016–17. *Emerg. Infect. Dis.* 27, 508–516. <https://doi.org/10.3201/eid2702.202920>
- Bridge, E.S., Kelly, J.F., Xiao, X., Takekawa, J.Y., Hill, N.J., Yamage, M., Haque, E.U., Islam, M.A., Mundkur, T., Yavuz, K.E., Leader, P., Leung, C.Y.H., Smith, B., Spragens, K.A., Vandegrift, K.J., Hosseini, P.R., Saif, S., Mohsanin, S., Mikolon, A., Islam, A., George, A., Sivananthaperumal, B., Daszak, P., Newman, S.H., 2014. Bird migration and avian influenza: A comparison of hydrogen stable isotopes and satellite tracking methods. *Ecol. Indic.* 45, 266–273. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2014.04.027>
- Brown, J.D., Luttrell, M.P., Berghaus, R.D., Kistler, W., Keeler, S.P., Howey, A., Wilcox, B., Hall, J., Niles, L., Dey, A., Knutsen, G., Fritz, K., Stallknecht, D.E., 2010. Prevalence of antibodies to type A influenza virus in wild avian species using two serologic assays. *J. Wildl. Dis.* 46, 896–911. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.3.896>
- Brown, J.D., Stallknecht, D.E., Berghaus, R.D., Swayne, D.E., 2009. Infectious and Lethal Doses of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus for House Sparrows (*Passer Domesticus*) and Rock Pigeons (*Columbia Livia*). *J. Vet. Diagn. Invest.* 21, 437–445. <https://doi.org/10.1177/104063870902100404>
- Brown, J.D., Swayne, D.E., Cooper, R.J., Burns, R.E., Stallknecht, D.E., 2007. Persistence of H5 and H7 avian influenza viruses in water. *Avian Dis.* 51, 285–289. <https://doi.org/10.1637/7636-042806R.1>
- Burns, F., Eaton, M.A., Burfield, I.J., Klvaňová, A., Šilarová, E., Staneva, A., Gregory, R.D., 2021. Abundance decline in the avifauna of the European Union reveals cross-continental similarities in biodiversity change. *Ecol. Evol.* 0, 1–14. <https://doi.org/10.1002/ece3.8282>
- Burns, T.E., Ribble, C., Stephen, C., Kelton, D., Toews, L., Osterhold, J., Wheeler, H., 2012. Use of observed wild bird activity on poultry farms and a literature review to target species as high priority for avian influenza testing in 2 regions of Canada. *Can. Vet. J.* 53, 158–166. <https://doi.org/PMID:22851777>
- Cambra-López, M., Aarnink, A.J.A., Zhao, Y., Calvet, S., Torres, A.G., 2010. Airborne particulate matter from livestock production systems: A review of an air pollution problem. *Environ. Pollut.* 158, 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2009.07.011>
- Cappelle, J., Gaidet, N., Iverson, S.A., Takekawa, J.Y., Newman, S.H., Fofana, B., Gilbert, M., 2011. Characterizing the interface between wild ducks and poultry to evaluate the potential of transmission of avian pathogens. *Int. J. Health Geogr.* 10, 60. <https://doi.org/10.1186/1476-072X-10-60>
- Cardenas Garcia, S., Navarro Lopez, R., Morales, R., Olvera, M.A., Marquez, M.A., Merino, R., Miller, P.J., Afonso, C.L., 2013. Molecular Epidemiology of Newcastle Disease in Mexico and the Potential

- Spillover of Viruses from Poultry into Wild Bird Species. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 4985–4992. <https://doi.org/10.1128/AEM.00993-13>
- Carnaccini, S., Perez, D.R., 2020. H9 Influenza Viruses: An Emerging Challenge. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 10, a038588. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a038588>
- Caron, A., Cappelle, J., Cumming, G.S., de Garine-Wichatitsky, M., Gaidet, N., 2015. Bridge hosts, a missing link for disease ecology in multi-host systems. *Vet. Res.* 46, 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13567-015-0217-9>
- Caron, A., Cappelle, J., Gaidet, N., 2017. Challenging the conceptual framework of maintenance hosts for influenza A viruses in wild birds. *J. Appl. Ecol.* 54, 681–690. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12839>
- Caron, A., Grosbois, V., Etter, E., Gaidet, N., de Garine-Wichatitsky, M., 2014. Bridge hosts for avian influenza viruses at the wildlife/domestic interface: An eco-epidemiological framework implemented in southern Africa. *Prev. Vet. Med.* 117, 590–600. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2014.09.014>
- Carpenter, S.R., Caraco, N.F., Correll, D.L., Howarth, R.W., Sharpley, A.N., Smith, V.H., 1998. Nonpoint Pollution of Surface Waters with Phosphorus and Nitrogen. *Ecol. Appl.* 8, 559–568. [https://doi.org/10.1890/1051-0761\(1998\)008\[0559:NPOSWW\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1051-0761(1998)008[0559:NPOSWW]2.0.CO;2)
- Causey, D., Edwards, S.V., 2008. Ecology of Avian Influenza Virus in Birds. *J. Infect. Dis.* 197, S29–S33. <https://doi.org/10.1086/524991>
- Cavanagh, D., 2005. Coronaviruses in poultry and other birds. *Avian Pathol.* 34, 439–448. <https://doi.org/10.1080/03079450500367682>
- Cavina, E., 2014. Decision making of autumn migrations of woodpigeons (*Columba palumbus*) in Europe: analysis of the abiotic factors and atmospheric pressure changes. *Ornithol. Heresy.*
- CDC, 2019. Types of Influenza Viruses [WWW Document]. *Cent. Dis. Control Prev.* URL <https://www.cdc.gov/flu/about/viruses/types.htm> (accessed 10.19.21).
- Central Veterinary Institute, Wageningen University, Gonzales, J.L., Elbers, A.R.W., Beerens, N., 2017. Risk factors of primary introduction of highly pathogenic and low pathogenic avian influenza virus into European poultry holdings, considering at least material contaminated by wild birds and contact with wild birds. *EFSA Support. Publ.* 14, 24 pp. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1282>
- CGAAER, 2021. Place de la vaccination dans la lutte contre l'influenza aviaire hautement pathogène. Conseil général de l'alimentation, de l'agriculture et des espaces ruraux (CGAAER).
- Chamings, A., Nelson, T.M., Vibin, J., Wille, M., Klaassen, M., Alexandersen, S., 2018. Detection and characterisation of coronaviruses in migratory and non-migratory Australian wild birds. *Sci. Rep.* 8, 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-24407-x>
- Chapman, D.G., 1951. Some Properties of the Hypergeometric Distribution With Applications to Zoological Sample Censuses, University of California Publications in Statistics. University of California Press, Berkeley.
- Chauhan, R.P., Gordon, M.L., 2021. Deciphering transmission dynamics and spillover of avian influenza viruses from avian species to swine populations globally. *Virus Genes.* <https://doi.org/10.1007/s11262-021-01873-6>

- Cheong, H.C., Lee, C.Y.Q., Cheok, Y.Y., Tan, G.M.Y., Looi, C.Y., Wong, W.F., 2019. Chlamydiaceae: Diseases in Primary Hosts and Zoonosis. *Microorganisms* 7, 146. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7050146>
- Cherbonnel, M., Lamandé, J., Allée, C., Schmitz, A., Ogor, K., Le Gall-Reculé, G., Le Bras, M.O., Guillemoto, C., Pierre, I., Picault, J.-P., Jestin, V., 2007. Virologic Findings in Selected Free-Range Mule Duck Farms at High Risk for Avian Influenza Infection. *Avian Dis.* 51, 408–413. <https://doi.org/10.1637/7595-040306R1.1>
- Cheung, P.P., Leung, Y.H.C., Chow, C.-K., Ng, C.-F., Tsang, C.-L., Wu, Y.-O., Ma, S.-K., Sia, S.-F., Guan, Y., Peiris, J.S.M., 2009. Identifying the species-origin of faecal droppings used for avian influenza virus surveillance in wild-birds. *J. Clin. Virol.* 46, 90–93. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2009.06.016>
- Chiatante, G., Pellitteri-Rosa, D., Torretta, E., Nonnis Marzano, F., Meriggi, A., 2021. Indicators of biodiversity in an intensively cultivated and heavily human modified landscape. *Ecol. Indic.* 130, 108060. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2021.108060>
- CIFOG, 2021. Chiffres Clés Foie Gras et Magret [WWW Document]. CIFOG - Interprofession Foie Gras. URL <https://lefoiegras.fr/le-foie-gras/les-chiffres-cles-du-foie-gras> (accessed 11.6.21).
- CIFOG, 2020. Enquête exclusive décembre 2020 [WWW Document]. CIFOG - Interprofession Foie Gras. URL <https://lefoiegras.fr/le-foie-gras/enquete-exclusive-decembre-2020> (accessed 11.6.21).
- Citti, C., Baranowski, E., Dordet-Frisoni, E., Faucher, M., Nouvel, L.-X., 2020. Genomic Islands in *Mycoplasmas*. *Genes* 11, 836. <https://doi.org/10.3390/genes11080836>
- Citti, C., Blanchard, A., 2013. *Mycoplasmas* and their host: emerging and re-emerging minimal pathogens. *Trends Microbiol.* 21, 196–203. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.003>
- Citti, C., Dordet-Frisoni, E., Nouvel, L.-X., Kuo, C.H., Baranowski, E., 2018. Horizontal Gene Transfers in *Mycoplasmas* (Mollicutes). *Curr. Issues Mol. Biol.* 3–22. <https://doi.org/10.21775/cimb.029.003>
- Cleaveland, S., Haydon, D.T., Taylor, L., 2007. Overviews of Pathogen Emergence: Which Pathogens Emerge, When and Why?, in: Childs, J.E., Mackenzie, J.S., Richt, J.A. (Eds.), *Wildlife and Emerging Zoonotic Diseases: The Biology, Circumstances and Consequences of Cross-Species Transmission*, Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp. 85–111. https://doi.org/10.1007/978-3-540-70962-6_5
- Clergeau, P., Savard, J.-P.L., Mennechez, G., Falardeau, G., 1998. Bird Abundance and Diversity along an Urban-Rural Gradient: A Comparative Study between Two Cities on Different Continents. *The Condor* 100, 413–425. <https://doi.org/10.2307/1369707>
- Code rural, 2006. LOI n° 2006-11 du 5 janvier 2006 d'orientation agricole NOR : AGRX0500091L.
- Commission Européenne, 2018. Règlement d'exécution (UE) 2018/1882 de la Commission du 3 décembre 2018 sur l'application de certaines dispositions en matière de prévention et de lutte contre les maladies à des catégories de maladies répertoriées et établissant une liste des espèces et des groupes d'espèces qui présentent un risque considérable du point de vue de la propagation de ces maladies répertoriées. *OJ L* 308, 21–29.
- Conan, A., Goutard, F.L., Sorn, S., Vong, S., 2012. Biosecurity measures for backyard poultry in developing countries: a systematic review. *BMC Vet. Res.* 8, 240. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-8-240>

- Conover, M.R., Perito, J.J., 1981. Response of Starlings to Distress Calls and Predator Models Holding Conspecific Prey. *Z. Für Tierpsychol.* 57, 163–172. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0310.1981.tb01320.x>
- Conraths, F.J., Sauter-Louis, C., Globig, A., Dietze, K., Pannwitz, G., Albrecht, K., Höreth-Böntgen, D., Beer, M., Staubach, C., Homeier-Bachmann, T., 2016. Highly Pathogenic Avian Influenza H5N8 in Germany: Outbreak Investigations. *Transbound. Emerg. Dis.* 63, 10–13. <https://doi.org/10.1111/tbed.12443>
- Conseil de l'Europe, 1999. CM/Inf(2002)6 Addendum: Recommandation concernant les canards domestiques, les canards de Barbarie, les hybrides de canards de Barbarie et de canards domestiques, les oies domestiques et leurs croisements. Com. Minist. - Com. Perm. Conv. Eur. Pour Prot. Animaux Dans Élev.
- Conseil de l'Europe, 1998. Directive 98/58/CE du Conseil du 20 juillet 1998 concernant la protection des animaux dans les élevages.
- Coombe, M., Iwasawa, S., Byers, K.A., Prystajek, N., Hsiao, W., Patrick, D.M., Himsforth, C.G., 2021. A systematic review and narrative synthesis of the use of environmental samples for the surveillance of avian influenza viruses in wild waterbirds. *J. Wildl. Dis.* 57, 1–18. <https://doi.org/10.7589/JWD-D-20-00082>
- Corzo, C.A., Culhane, M., Dee, S., Morrison, R.B., Torremorell, M., 2013. Airborne Detection and Quantification of Swine Influenza A Virus in Air Samples Collected Inside, Outside and Downwind from Swine Barns. *PLOS ONE* 8, e71444. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071444>
- Costa, T.P., Brown, J.D., Howerth, E.W., Stallknecht, D.E., Swayne, D.E., 2011. Homo- and Heterosubtypic Low Pathogenic Avian Influenza Exposure on H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Infection in Wood Ducks (*Aix sponsa*). *PLOS ONE* 6, e15987. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015987>
- Criado, M.F., Moresco, K.A., Stallknecht, D.E., Swayne, D.E., 2021. Low-pathogenicity influenza viruses replicate differently in laughing gulls and mallards. *Influenza Other Respir. Viruses* 0, 1–6. <https://doi.org/10.1111/irv.12878>
- Croville, G., Foret, C., Heuillard, P., Senet, A., Delpont, M., Mouahid, M., Ducatez, M.F., Kichou, F., Guerin, J.-L., 2018. Disclosing respiratory co-infections: a broad-range panel assay for avian respiratory pathogens on a nanofluidic PCR platform. *Avian Pathol.* 47, 253–260. <https://doi.org/10.1080/03079457.2018.1430891>
- Cui, P., Zeng, X., Li, X., Li, Y., Shi, J., Zhao, C., Qu, Z., Wang, Y., Guo, J., Gu, W., Ma, Q., Zhang, Yuancheng, Lin, W., Li, M., Tian, J., Wang, D., Xing, X., Liu, Y., Pan, S., Zhang, Yaping, Bao, H., Liu, L., Tian, G., Li, C., Deng, G., Chen, H., 2021. Genetic and biological characteristics of the globally circulating H5N8 avian influenza viruses and the protective efficacy offered by the poultry vaccine currently used in China. *Sci. China Life Sci.* 64. <https://doi.org/10.1007/s11427-021-2025-y>
- Cui, Y., Wang, Q., Liu, S., Sun, R., Zhou, Y., Li, Y., 2017. Age-Related Variations in Intestinal Microflora of Free-Range and Caged Hens. *Front. Microbiol.* 8, 1310. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01310>
- Dalziel, A.E., Delean, S., Heinrich, S., Cassey, P., 2016. Persistence of Low Pathogenic Influenza A Virus in Water: A Systematic Review and Quantitative Meta-Analysis. *PLOS ONE* 11, e0161929. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0161929>

- Daszak, P., Cunningham, A.A., Hyatt, A.D., 2000. Emerging Infectious Diseases of Wildlife - Threats to Biodiversity and Human Health. *Science* 287, 443–449. <https://doi.org/10.1126/science.287.5452.443>
- Davies, N.B., 1976. Food, Flocking and Territorial Behaviour of the Pied Wagtail (*Motacilla alba yarrellii* Gould) in Winter. *J. Anim. Ecol.* 45, 235–253. <https://doi.org/10.2307/3777>
- de Melo, A.A., Nunes, R., de Campos Telles, M.P., 2021. Same information, new applications: revisiting primers for the avian COI gene and improving DNA barcoding identification. *Org. Divers. Evol.* <https://doi.org/10.1007/s13127-021-00507-x>
- de Sales Lima, F.E., Gil, P., Pedrono, M., Minet, C., Kwiatek, O., Campos, F.S., Spilki, F.R., Roehe, P.M., Franco, A.C., Maminiaina, O.F., Albina, E., de Almeida, R.S., 2015. Diverse gammacoronaviruses detected in wild birds from Madagascar. *Eur. J. Wildl. Res.* 61, 635–639. <https://doi.org/10.1007/s10344-015-0931-7>
- Deiner, K., Bik, H.M., Mächler, E., Seymour, M., Lacoursière-Roussel, A., Altermatt, F., Creer, S., Bista, I., Lodge, D.M., de Vere, N., Pfrender, M.E., Bernatchez, L., 2017. Environmental DNA metabarcoding: Transforming how we survey animal and plant communities. *Mol. Ecol.* 26, 5872–5895. <https://doi.org/10.1111/mec.14350>
- del Hoyo, J., Elliott, A., Sargatal, J., Christie, D.A. (Eds.), 1992. *Handbook of the Birds of the World Series*. Lynx Editions, Barcelona, Spain.
- Delpont, M., Blondel, V., Robertet, L., Duret, H., Guerin, J.-L., Vaillancourt, J.-P., Paul, M.C., 2018. Biosecurity practices on foie gras duck farms, Southwest France. *Prev. Vet. Med.* 158, 78–88. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2018.07.012>
- Delpont, M., Guinat, C., Guérin, J.-L., Le leu, E., Vaillancourt, J.-P., Paul, M.C., 2021. Biosecurity measures in French poultry farms are associated with farm type and location. *Prev. Vet. Med.* 195, 105466. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105466>
- Densmore, C.L., Iwanowicz, D.D., Ottinger, C.A., Hindman, L.J., Bessler, A.M., Iwanowicz, L.R., Prosser, D.J., Whitbeck, M., Driscoll, C.P., 2017. Molecular Detection of Avian Influenza Virus from Sediment Samples in Waterfowl Habitats on the Delmarva Peninsula, United States. *Avian Dis.* 61, 520–525. <https://doi.org/10.1637/11687-060917-ResNote.1>
- Desriers, M., 2007. L'agriculture française depuis cinquante ans : des petites exploitations familiales aux droits à paiement unique. *Agric. Nouv. Défis Insee* 17–30.
- Deverre, C., Marie, C. de S., 2008. L'écologisation de la politique agricole européenne. Verdissement ou refondation des systèmes agro-alimentaires. *Rev. Etudes En Agric. Environ. - Rev. Agric. Environ. Stud. INRA Ed.* 83–104. <https://doi.org/hal-02663276f>
- DGAL, 2021a. Arrêté du 29 septembre 2021 relatif aux mesures de biosécurité applicables par les opérateurs et les professionnels liés aux animaux dans les établissements détenant des volailles ou des oiseaux captifs dans le cadre de la prévention des maladies animales transmissibles aux animaux ou aux êtres humains AGRG2129005A.
- DGAL, 2021b. Influenza aviaire : les professionnels et les services de l'État s'engagent sur une feuille de route pour éviter un nouvel épisode. DGAL - Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation.
- DGAL, 2021c. Arrêté du 29 septembre 2021 définissant les zones à risque de diffusion du virus de l'influenza aviaire AGRG2129004A.

- DGAL, 2018. Influenza aviaire : dépistage obligatoire des palmipèdes à compter du 1er juin 2018 [WWW Document]. URL <https://agriculture.gouv.fr/influenza-aviaire-depistage-obligatoire-des-palmipedes-compter-du-1er-juin-2018> (accessed 10.14.21).
- DGAL, 2016a. Arrêté du 8 février 2016 relatif aux mesures de biosécurité applicables dans les exploitations de volailles et d'autres oiseaux captifs dans le cadre de la prévention contre l'influenza aviaire AGRG1603907A.
- DGAL, 2016b. Arrêté du 16 novembre 2016 modifiant l'arrêté du 16 mars 2016 relatif aux niveaux de risque épizootique en raison de l'infection de l'avifaune par un virus de l'influenza aviaire hautement pathogène et aux dispositifs associés de surveillance et de prévention chez les volailles et autres oiseaux captifs AGRG1633440A.
- DGAL, 2016c. Influenza aviaire : création d'une chaire de biosécurité aviaire [WWW Document]. URL <https://agriculture.gouv.fr/influenza-aviaire-creation-dune-chaire-de-biosecurite-aviaire> (accessed 12.9.21).
- DGAL, 2013. Arrêté du 29 juillet 2013 relatif à la définition des dangers sanitaires de première et deuxième catégorie pour les espèces animales AGRG1320208A.
- DGAL, 2008. Arrêté du 18 janvier 2008 fixant des mesures techniques et administratives relatives à la lutte contre l'influenza aviaire AGRG0801623A.
- DGAL, DGS, DGT, 1994. Arrêté du 18 juillet 1994 fixant la liste des agents biologiques pathogènes AGRG2129005A. <https://doi.org/NOR:TEFT9400844A>
- Dhondt, K.V., Dhondt, A.A., Ley, D.H., 2007. Effects of route of inoculation on *Mycoplasma gallisepticum* infection in captive house finches. *Avian Pathol.* 36, 475–479. <https://doi.org/10.1080/03079450701642016>
- Dimitrov, K.M., Abolnik, C., Afonso, C.L., Albina, E., Bahl, J., Berg, M., Briand, F.-X., Brown, I.H., Choi, K.-S., Chvala, I., Diel, D.G., Durr, P.A., Ferreira, H.L., Fusaro, A., Gil, P., Goujgoulova, G.V., Grund, C., Hicks, J.T., Joannis, T.M., Torchetti, M.K., Kolosov, S., Lambrecht, B., Lewis, N.S., Liu, Haijin, Liu, Hualei, McCullough, S., Miller, P.J., Monne, I., Muller, C.P., Munir, M., Reischak, D., Sabra, M., Samal, S.K., Servan de Almeida, R., Shittu, I., Snoeck, C.J., Suarez, D.L., Van Borm, S., Wang, Z., Wong, F.Y.K., 2019. Updated unified phylogenetic classification system and revised nomenclature for Newcastle disease virus. *Infect. Genet. Evol.* 74, 103917. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.103917>
- Dimitrov, K.M., Ramey, A.M., Qiu, X., Bahl, J., Afonso, C.L., 2016. Temporal, geographic, and host distribution of avian paramyxovirus 1 (Newcastle disease virus). *Infect. Genet. Evol.* 39, 22–34. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.008>
- Dordet-Frisoni, E., Faucher, M., Sagné, E., Baranowski, E., Tardy, F., Nouvel, L.X., Citti, C., 2019. *Mycoplasma* Chromosomal Transfer: A Distributive, Conjugative Process Creating an Infinite Variety of Mosaic Genomes. *Front. Microbiol.* 10. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02441>
- Dufour, A., Bartram, J., Bos, R., Gannon, V.P.J., Organization, W.H., Association, I.W., Agency, U.S.E.P., 2012. Animal waste, water quality and human health. IWA Publishing.
- ECDC, 2021. Threat assessment brief: First identification of human cases of avian influenza A (H5N8) infection. European Centre for Disease Prevention and Control ECDC, Stockholm.
- EFSA, ECDC, EURL, Adlhoch, C., Fusaro, A., Gonzales, J.L., Kuiken, T., Marangon, S., Niqueux, É., Staubach, C., Terregino, C., Guajardo, I.M., Lima, E., Baldinelli, F., 2021a. Scientific report: Avian influenza

overview December 2020 – February 2021. EFSA J. 19, 74 pp.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6497>

- EFSA, ECDC, EURL, Adlhoch, C., Fusaro, A., Gonzales, J.L., Kuiken, T., Marangon, S., Staubach, C., Terregino, C., Aznar, I., Guajardo, I.M., Baldinelli, F., 2021b. Scientific report: Avian influenza overview May – September 2021. EFSA J. 76 pp.
- EFSA, ECDC, EURL, Brown, I., Mulatti, P., Smietanka, K., Staubach, C., Willeberg, P., Adlhoch, C., Candiani, D., Fabris, C., Zancanaro, G., Morgado, J., Verdonck, F., 2017. Scientific report: Avian influenza overview October 2016–August 2017. EFSA J. 15, 101 pp.
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5018>
- Ehricht, R., Slickers, P., Goellner, S., Hotzel, H., Sachse, K., 2006. Optimized DNA microarray assay allows detection and genotyping of single PCR-amplifiable target copies. *Mol. Cell. Probes* 20, 60–63.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2005.09.003>
- Elbers, A.R.W., Gonzales, J.L., 2021. Efficacy of an automated laser for reducing wild bird visits to the free range area of a poultry farm. *Sci. Rep.* 11, 12779. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-92267-z>
- Elbers, A.R.W., Gonzales, J.L., 2019. Quantification of visits of wild fauna to a commercial free-range layer farm in the Netherlands located in an avian influenza hot-spot area assessed by video-camera monitoring. *Transbound. Emerg. Dis.* tbed.13382. <https://doi.org/10.1111/tbed.13382>
- Ellis, J.W., Root, J.J., McCurdy, L.M., Bentler, K.T., Barrett, N.L., VanDalen, K.K., Dirsmith, K.L., Shriner, S.A., 2021. Avian influenza A virus susceptibility, infection, transmission, and antibody kinetics in European starlings. *PLOS Pathog.* 17, e1009879. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009879>
- Engering, A., Hogerwerf, L., Slingenbergh, J., 2013. Pathogen–host–environment interplay and disease emergence. *Emerg. Microbes Infect.* 2, 1–7. <https://doi.org/10.1038/emi.2013.5>
- Epp, L.S., Boessenkool, S., Bellemain, E.P., Haile, J., Esposito, A., Riaz, T., Erséus, C., Gusarov, V.I., Edwards, M.E., Johnsen, A., Stenøien, H.K., Hassel, K., Kauserud, H., Yoccoz, N.G., Bråthen, K.A., Willerslev, E., Taberlet, P., Coissac, E., Brochmann, C., 2012. New environmental metabarcodes for analysing soil DNA: potential for studying past and present ecosystems. *Mol. Ecol.* 21, 1821–1833.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05537.x>
- Everett, K.D.E., Andersen, A.A., 1999. Identification of nine species of the Chlamydiaceae using PCR-mRFLP. *J. Syst. Bacteriol.* 49, 803–813.
- FAO, 2021. EMPRES-i - Global Animal Disease Information System [WWW Document]. URL <https://empres-i.apps.fao.org/> (accessed 11.6.21).
- FAO, 2013. World livestock 2013 - Changing disease landscapes. FAO, Rome.
- FAO, 2007. Wild birds and avian influenza: an introduction to applied field research and disease sampling techniques, FAO Animal Production and Health Manual. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Fereidouni, S.R., Harder, T.C., Gaidet, N., Ziller, M., Hoffmann, B., Hammoumi, S., Globig, A., Starick, E., 2012. Saving resources: Avian influenza surveillance using pooled swab samples and reduced reaction volumes in real-time RT-PCR. *J. Virol. Methods* 186, 119–125.
<https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2012.08.002>

- Ferenczi, M., Beckmann, C., Klaassen, M., 2021. Rainfall driven and wild-bird mediated avian influenza virus outbreaks in Australian poultry. *BMC Vet. Res.* 17, 306. <https://doi.org/10.1186/s12917-021-03010-9>
- Ferguson-Noel, N., Armour, N.K., Noormohammadi, A.H., El-Gazzar, M., Bradbury, J.M., 2020. Chapter 21: Mycoplasmosis, in: Swayne, D.E. (Ed.), *Diseases of Poultry*, 14th Edition. Wiley-Blackwell, pp. 907–965.
- Figueroa, T., Bessière, P., Coggon, A., Bouwman, K.M., van der Woude, R., Delverdier, M., Verheije, M.H., de Vries, R.P., Volmer, R., 2020. The Microbiota Contributes to the Control of Highly Pathogenic H5N9 Influenza Virus Replication in Ducks. *J. Virol.* 94, e00289-20. <https://doi.org/10.1128/JVI.00289-20>
- Fontaine, B., Moussy, C., Carricaburu, J.C., Dupuis, J., Corolleur, E., Schmaltz, L., Lorrillière, R., Lois, G., Gaudard, C., 2020. Suivi des oiseaux communs en France 1989-2019 : 30 ans de suivis participatifs - Executive summary of the 2019 common birds monitoring report. MNHN- Centre d'Ecologie et des Sciences de la Conservation, LPO BirdLife France - Service Connaissance, Ministère de la Transition écologique et solidaire.
- Forrest, H.L., Kim, J.-K., Webster, R.G., 2010. Virus Shedding and Potential for Interspecies Waterborne Transmission of Highly Pathogenic H5N1 Influenza Virus in Sparrows and Chickens. *J. Virol.* 84, 3718–3720. <https://doi.org/10.1128/JVI.02017-09>
- Fouchier, R.A.M., Bestebroer, T.M., Herfst, S., Van Der Kemp, L., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D.M.E., 2000. Detection of Influenza A Viruses from Different Species by PCR Amplification of Conserved Sequences in the Matrix Gene. *J. Clin. Microbiol.* 38, 4096–4101.
- Fouchier, R.A.M., Schneeberger, P.M., Rozendaal, F.W., Broekman, J.M., Kemink, S.A.G., Munster, V., Kuiken, T., Rimmelzwaan, G.F., Schutten, M., van Doornum, G.J.J., Koch, G., Bosman, A., Koopmans, M., Osterhaus, A.D.M.E., 2004. Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 1356–1361. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308352100>
- Fournié, G., Høg, E., Barnett, T., Pfeiffer, D.U., Mangtani, P., 2017. A Systematic Review and Meta-Analysis of Practices Exposing Humans to Avian Influenza Viruses, Their Prevalence, and Rationale. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97, 376–388. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0014>
- França, M., Stallknecht, D.E., Howerth, E.W., 2013. Expression and distribution of sialic acid influenza virus receptors in wild birds. *Avian Pathol. J. WVPA* 42, 60–71. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.759176>
- FranceAgriMer, 2020. L'impact de la crise de la COVID sur la consommation alimentaire en France : parenthèse, accélérateur ou élément de rupture de tendances ?, LES ETUDES de FranceAgriMer. FranceAgriMer.
- Frutos, M.C., Monetti, M.S., Vaulet, L.G., Cadario, M.E., Fermepin, M.R., Ré, V.E., Cuffini, C.G., 2015. Genetic diversity of Chlamydia among captive birds from central Argentina. *Avian Pathol.* 44, 50–56. <https://doi.org/10.1080/03079457.2014.993593>
- Fujimoto, Y., Usui, T., Ito, H., Ono, E., Ito, T., 2015. Susceptibility of wild passerines to subtype H5N1 highly pathogenic avian influenza viruses. *Avian Pathol.* 44, 243–247. <https://doi.org/10.1080/03079457.2015.1043235>

- Furlan, E.M., Gleeson, D., Hardy, C.M., Duncan, R.P., 2016. A framework for estimating the sensitivity of eDNA surveys. *Mol. Ecol. Resour.* 16, 641–654. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12483>
- Fusaro, A., Zecchin, B., Vrancken, B., Abolnik, C., Ademun, R., Alassane, A., Arafa, A., Awuni, J.A., Couacy-Hymann, E., Coulibaly, M. B., Gaidet, N., Go-Maró, E., Joannis, T., Jumbo, S.D., Minoungou, G., Meseko, C., Souley, M.M., Ndumu, D.B., Shittu, I., Twabela, A., Wade, A., Wiersma, L., Akpeli, Y.P., Zamperin, G., Milani, A., Lemey, P., Monne, I., 2019. Disentangling the role of Africa in the global spread of H5 highly pathogenic avian influenza. *Nat. Commun.* 10, 5310. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13287-y>
- Gaïde, N., Foret-Lucas, C., Figueroa, T., Vergne, T., Lucas, M.-N., Robertet, L., Souvestre, M., Croville, G., Le Loc'h, G., Delverdier, M., Guérin, J.-L., 2021. Viral tropism and detection of clade 2.3.4.4b H5N8 highly pathogenic avian influenza viruses in feathers of ducks and geese. *Sci. Rep.* 11, 5928. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85109-5>
- Gaidet, N., Cappelle, J., Takekawa, J.Y., Prosser, D.J., Iverson, S.A., Douglas, D.C., Perry, W.M., Mundkur, T., Newman, S.H., 2010. Potential spread of highly pathogenic avian influenza H5N1 by wildfowl: dispersal ranges and rates determined from large-scale satellite telemetry: Potential dispersal of H5N1 HPAI virus by wildfowl. *J. Appl. Ecol.* 47, 1147–1157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01845.x>
- Gaidet, N., Caron, A., Cappelle, J., Cumming, G.S., Balança, G., Hammoumi, S., Cattoli, G., Abolnik, C., Servan de Almeida, R., Gil, P., Fereidouni, S.R., Grosbois, V., Tran, A., Mundava, J., Fofana, B., Ould El Mamy, A.B., Ndlovu, M., Mondain-Monval, J.Y., Triplet, P., Hagemeyer, W., Karesh, W.B., Newman, S.H., Dodman, T., 2012. Understanding the ecological drivers of avian influenza virus infection in wildfowl: a continental-scale study across Africa. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 279, 1131–1141. <https://doi.org/10.1098/rspb.2011.1417>
- Gaidet, N., Dodman, T., Caron, A., Balança, G., Desvaux, S., Goutard, F., Cattoli, G., Lamarque, F., Hagemeyer, W., Monicat, F., 2007. Avian Influenza Viruses in Water Birds, Africa. *Emerg. Infect. Dis.* 13, 626–629. <https://doi.org/10.3201/eid1304.061011>
- García, M., Ikuta, N., Levisohn, S., Kleven, S.H., 2005. Evaluation and Comparison of Various PCR Methods for Detection of *Mycoplasma gallisepticum* Infection in Chickens. *Avian Dis.* 49, 125–132. <https://doi.org/10.1637/7261-0812204R1>
- Gassie, J., 2017. Les conduites alimentaires comme reflets de la mondialisation : tendances d'ici 2030 - Analyse n°103. Centre d'études et de prospective du ministère de l'Agriculture, de l'Agroalimentaire et de la Forêt.
- Gavier-Widén, D., Duff, P., Meredith, A. (Eds.), 2012. Infectious diseases of wild mammals and birds in Europe. Wiley, Chichester.
- Germeraad, E.A., Elbers, A.R.W., de Bruijn, N.D., Heutink, R., van Voorst, W., Hakze-van der Honing, R., Bergervoet, S.A., Engelsma, M.Y., van der Poel, W.H.M., Beerens, N., 2020. Detection of Low Pathogenic Avian Influenza Virus Subtype H10N7 in Poultry and Environmental Water Samples During a Clinical Outbreak in Commercial Free-Range Layers, Netherlands 2017. *Front. Vet. Sci.* 7, 237. <https://doi.org/10.3389/fvets.2020.00237>
- Gilbert, M., Xiao, X., Robinson, T.P., 2017. Intensifying poultry production systems and the emergence of avian influenza in China: a 'One Health/Ecohealth' epitome. *Arch. Public Health* 75, 1–7. <https://doi.org/10.1186/s13690-017-0218-4>

- Gilchrist, P., 2005. Involvement of free-flying wild birds in the spread of the viruses of avian influenza, Newcastle disease and infectious bursal disease from poultry products to commercial poultry. *Worlds Poult. Sci. J.* 61, 198–214. <https://doi.org/10.1079/WPS200451>
- Gilot-Fromont, E., Rossi, S., 2000. Echantillonnage en faune sauvage: quelques questions sur la taille d'échantillon. *Epidémiologie Santé Anim.* 37, 11–19.
- Globig, A., Baumer, A., Revilla-Fernández, S., Beer, M., Wodak, E., Fink, M., Greber, N., Harder, T.C., Wilking, H., Brunhart, I., Matthes, D., Kraatz, U., Strunk, P., Fiedler, W., Fereidouni, S.R., Staubach, C., Conraths, F.J., Griot, C., Mettenleiter, T.C., Stärk, K.D.C., 2009. Ducks as Sentinels for Avian Influenza in Wild Birds. *Emerg. Infect. Dis.* 15, 1633–1636. <https://doi.org/10.3201/eid1510.090439>
- Gobbo, F., Fornasiero, D., De Marco, M.A., Zecchin, B., Mulatti, P., Delogu, M., Terregino, C., 2021. Active Surveillance for Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Wintering Waterbirds in Northeast Italy, 2020–2021. *Microorganisms* 9, 2188. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9112188>
- Gonzales, J.L., Elbers, A.R.W., Bouma, A., Koch, G., De Wit, J.J., Stegeman, J.A., 2010. Low-pathogenic notifiable avian influenza serosurveillance and the risk of infection in poultry – a critical review of the European Union active surveillance programme (2005–2007). *Influenza Other Respir. Viruses* 4, 91–99. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2009.00126.x>
- Gonzales, J.L., Elbers, A.R.W., van der Goot, J.A., Bontje, D., Koch, G., de Wit, J.J., Stegeman, J.A., 2012. Using egg production data to quantify within-flock transmission of low pathogenic avian influenza virus in commercial layer chickens. *Prev. Vet. Med.* 107, 253–259. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.06.010>
- Gonzales, J.L., Stegeman, J.A., Koch, G., de Wit, S.J., Elbers, A.R.W., 2013. Rate of introduction of a low pathogenic avian influenza virus infection in different poultry production sectors in the Netherlands. *Influenza Other Respir. Viruses* 7, 6–10. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2012.00348.x>
- Gortazar, C., Diez-Delgado, I., Barasona, J.A., Vicente, J., De La Fuente, J., Boadella, M., 2015. The Wild Side of Disease Control at the Wildlife-Livestock-Human Interface: A Review. *Front. Vet. Sci.* 1, 27. <https://doi.org/10.3389/fvets.2014.00027>
- Gortázar, C., Ferroglio, E., Höfle, U., Frölich, K., Vicente, J., 2007. Diseases shared between wildlife and livestock: a European perspective. *Eur. J. Wildl. Res.* 53, 241. <https://doi.org/10.1007/s10344-007-0098-y>
- Gortazar, C., Reperant, L.A., Kuiken, T., de la Fuente, J., Boadella, M., Martínez-Lopez, B., Ruiz-Fons, F., Estrada-Peña, A., Drosten, C., Medley, G., Ostfeld, R., Peterson, T., VerCauteren, K.C., Menge, C., Artois, M., Schultsz, C., Delahay, R., Serra-Cobo, J., Poulin, R., Keck, F., Aguirre, A.A., Henttonen, H., Dobson, A.P., Kutz, S., Lubroth, J., Mysterud, A., 2014. Crossing the Interspecies Barrier: Opening the Door to Zoonotic Pathogens. *PLoS Pathog.* 10, e1004129. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004129>
- Gotteland, C., Lubac, S., Bicout, D., 2009. Où trouve-t-on les oiseaux sauvages aux alentours des élevages ? Risque de contact oiseaux sauvages et volailles. *Epidemiol. Sante Anim.* 55, 103–115.
- Gear, D.A., Dusek, R.J., Walsh, D.P., Hall, J.S., 2017. No evidence of infection or exposure to highly pathogenic avian influenzas in peridomestic wildlife on an affected poultry facility. *J. Wildl. Dis.* 53, 37–45. <https://doi.org/10.7589/2016-02-029>

- Gróznér, D., Forró, B., Sulyok, K.M., Marton, S., Kreizinger, Z., Bányai, K., Gyuranecz, M., 2018. Complete Genome Sequences of *Mycoplasma anatis*, *M. anseris*, and *M. cloacale* Type Strains. *Microbiol. Resour. Announc.* 7, e00939-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.00939-18>
- Guémené, D., Guy, G., 2004. The past, present and future of force-feeding and “foie gras” production. *Worlds Poult. Sci. J.* 60, 210–222. <https://doi.org/10.1079/WPS200314>
- Guetté, A., Gaüzère, P., Devictor, V., Jiguet, F., Godet, L., 2017. Measuring the synanthropy of species and communities to monitor the effects of urbanization on biodiversity. *Ecol. Indic.* 79, 139–154. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2017.04.018>
- Guillemain, M., Plaquin, B., Caizergues, A., Bacon, L., Van De Wiele, A., 2021. La migration des anatidés : patron général, évolutions, et conséquences épidémiologiques. *Bull. Epidémiologique Santé Anim. Aliment. - DGAL - Anses* 14.
- Guimarães, M., Hurtado, R., Bello, C., Vanstreels, R., Ferreira, A., 2016. Surveillance for Newcastle Disease Virus, Avian Influenza Virus and *Mycoplasma Gallisepticum* in Wild Birds Near Commercial Poultry Farms Surrounded by Atlantic Rainforest Remnants, Southeastern Brazil. *Rev. Bras. Ciênc. Avícola* 18, 387–394. <https://doi.org/10.1590/1806-9061-2015-0164>
- Guinat, C., Artois, J., Bronner, A., Guérin, J.L., Gilbert, M., Paul, M.C., 2019. Duck production systems and highly pathogenic avian influenza H5N8 in France, 2016–2017. *Sci. Rep.* 9, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-42607-x>
- Guinat, C., Comin, A., Kratzer, G., Durand, B., Delesalle, L., Delpont, M., Guérin, J.-L., Paul, M.C., 2020a. Biosecurity risk factors for highly pathogenic avian influenza (H5N8) virus infection in duck farms, France. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 2961–2970. <https://doi.org/10.1111/tbed.13672>
- Guinat, C., Durand, B., Vergne, T., Corre, T., Rautureau, S., Scoizec, A., Lebouquin-Leneveu, S., Guérin, J.-L., Paul, M.C., 2020b. Role of Live-Duck Movement Networks in Transmission of Avian Influenza, France, 2016–2017. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 472–480. <https://doi.org/10.3201/eid2603.190412>
- Guinat, C., Nicolas, G., Vergne, T., Bronner, A., Durand, B., Courcoul, A., Gilbert, M., Guérin, J.-L., Paul, M.C., 2018. Spatio-temporal patterns of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 spread, France, 2016 to 2017. *Eurosurveillance* 23, 1700791. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.26.1700791>
- Gummow, B., 2010. Challenges posed by new and re-emerging infectious diseases in livestock production, wildlife and humans. *Livest. Sci., 10th World Conference on Animal Production (WCAP)* 130, 41–46. <https://doi.org/10.1016/j.livsci.2010.02.009>
- Gutiérrez, R.A., Sorn, S., Nicholls, J.M., Buchy, P., 2011. Eurasian Tree Sparrows, Risk for H5N1 Virus Spread and Human Contamination through Buddhist Ritual: An Experimental Approach. *PLOS ONE* 6, e28609. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028609>
- Guy, J.S., 2020. Chapter 12: Viral Enteric Infections - Turkey Coronavirus Enteritis, in: Swayne, D.E. (Ed.), *Diseases of Poultry*, 14th Edition. Wiley-Blackwell, pp. 402–408.
- Hall, T., 2011. BioEdit: An important software for molecular biology. *GERF Bull. Biosci.* 2, 60–61.
- Halvorson, D.A., 2008. Control of Low Pathogenicity Avian Influenza, in: Swayne, D.E. (Ed.), *Avian Influenza*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, UK, pp. 513–536. <https://doi.org/10.1002/9780813818634.ch23>

- Halvorson, D.A., Karunakaran, D., Senne, D., Kelleher, C., Bailey, C., Abraham, A., Hinshaw, V., Newman, J., 1983. Epizootiology of Avian Influenza: Simultaneous Monitoring of Sentinel Ducks and Turkeys in Minnesota. *Avian Dis.* 27, 77–85. <https://doi.org/10.2307/1590374>
- Hautefeuille, C., Dauphin, G., Peyre, M., 2020. Knowledge and remaining gaps on the role of animal and human movements in the poultry production and trade networks in the global spread of avian influenza viruses - A scoping review. *PloS One* 15, e0230567. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0230567>
- Hebert, P.D.N., Stoeckle, M.Y., Zemplak, T.S., Francis, C.M., 2004. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biol.* 2, e312. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020312>
- Hill, N.J., Takekawa, J.Y., Cardona, C.J., Meixell, B.W., Ackerman, J.T., Runstadler, J.A., Boyce, W.M., 2012. Cross-Seasonal Patterns of Avian Influenza Virus in Breeding and Wintering Migratory Birds: A Flyway Perspective. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 12, 243–253. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0246>
- Hill, S.C., Hansen, R., Watson, S., Coward, V., Russell, C., Cooper, J., Essen, S., Everest, H., Parag, K.V., Fiddaman, S., Reid, S., Lewis, N., Brookes, S.M., Smith, A.L., Sheldon, B., Perrins, C.M., Brown, I.H., Pybus, O.G., 2019. Comparative micro-epidemiology of pathogenic avian influenza virus outbreaks in a wild bird population. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 374, 20180259. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0259>
- Hinlo, R., Gleeson, D., Lintermans, M., Furlan, E., 2017. Methods to maximise recovery of environmental DNA from water samples. *PLOS ONE* 12, e0179251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0179251>
- Hirschinger, J., Marescot, L., Hingrat, Y., Guerin, J.L., Le Loc'h, G., Vergne, T., 2021. Newcastle disease virus transmission dynamics in wild peridomestic birds in the United Arab Emirates. *Sci. Rep.* 11, 3491. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-79184-3>
- Hirschinger, J., Munoz, M.C., Hingrat, Y., Vergne, T., Guerin, J.-L., Le Loc'h, G., 2020. Exposure to and Circulation of Avian Influenza and Newcastle Disease Viruses in Peridomestic Wild Birds in the United Arab Emirates. *J. Wildl. Dis.* 56, 437. <https://doi.org/10.7589/2019-06-164>
- Hobson, K.A., Lormée, H., Van Wilgenburg, S.L., Wassenaar, L.I., Boutin, J.M., 2009. Stable isotopes (δD) delineate the origins and migratory connectivity of harvested animals: the case of European woodpigeons. *J. Appl. Ecol.* 46, 572–581. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2009.01651.x>
- Hoffmann, E., Stech, J., Guan, Y., Webster, R.G., Perez, D.R., 2001. Universal primer set for the full-length amplification of all influenza A viruses. *Arch. Virol.* 146, 2275–2289. <https://doi.org/10.1007/s007050170002>
- Höfle, U., Van de Bildt, M.W.G., Leijten, L.M., Van Amerongen, G., Verhagen, J.H., Fouchier, R.A.M., Osterhaus, A.D.M.E., Kuiken, T., 2012. Tissue tropism and pathology of natural influenza virus infection in black-headed gulls (*Chroicocephalus ridibundus*). *Avian Pathol.* 41, 547–553. <https://doi.org/10.1080/03079457.2012.744447>
- Hong, Y., García, M., Leiting, V., Benčina, D., Dufour-Zavala, L., Zavala, G., Kleven, S.H., 2004. Specific Detection and Typing of *Mycoplasma synoviae* Strains in Poultry with PCR and DNA Sequence Analysis Targeting the Hemagglutinin Encoding Gene *vlhA*. *Avian Dis.* 48, 606–616. <https://doi.org/10.1637/7156-011504R>

- Horton, K.G., La Sorte, F.A., Sheldon, D., Lin, T.-Y., Winner, K., Bernstein, G., Maji, S., Hochachka, W.M., Farnsworth, A., 2020. Phenology of nocturnal avian migration has shifted at the continental scale. *Nat. Clim. Change* 10, 63–68. <https://doi.org/10.1038/s41558-019-0648-9>
- Hoye, B.J., Munster, V.J., Nishiura, H., Klaassen, M., Fouchier, R.A.M., 2010. Surveillance of Wild Birds for Avian Influenza Virus. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1827. <https://doi.org/10.3201/eid1612.100589>
- Huang, S.Y., Yang, J.R., Lin, Y.J., Yang, C.H., Cheng, M.C., Liu, M.T., Wu, H.S., Chang, F.Y., 2015. Serological comparison of antibodies to avian influenza viruses, subtypes H5N2, H6N1, H7N3 and H7N9 between poultry workers and non-poultry workers in Taiwan in 2012. *Epidemiol. Infect.* 143, 2965–2974. <https://doi.org/10.1017/S0950268815000394>
- Huggins, L.G., Koehler, A.V., Schunack, B., Inpankaew, T., Traub, R.J., 2020. A Host-Specific Blocking Primer Combined with Optimal DNA Extraction Improves the Detection Capability of a Metabarcoding Protocol for Canine Vector-Borne Bacteria. *Pathogens* 9, 258. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040258>
- Hulin, V., 2016. Circulation des Chlamydiaceae en filières avicoles, exposition des professionnels et étude de la survie de *Chlamydia psittaci* (PhD Thesis). Université Paris-Est.
- Hulin, V., Bernard, P., Vorimore, F., Aaziz, R., Cléva, D., Robineau, J., Durand, B., Angelis, L., Siarkou, V.I., Laroucau, K., 2016. Assessment of *Chlamydia psittaci* Shedding and Environmental Contamination as Potential Sources of Worker Exposure throughout the Mule Duck Breeding Process. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1504–1518. <https://doi.org/10.1128/AEM.03179-15>
- Humphreys, J.M., Douglas, D.C., Ramey, A.M., Mullinax, J.M., Soos, C., Link, P., Walther, P., Prosser, D.J., 2021. The spatial–temporal relationship of blue-winged teal to domestic poultry: Movement state modelling of a highly mobile avian influenza host. *J. Appl. Ecol.* 58, 2040–2052. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13963>
- Huneau-Salaün, A., Schmitz, A., Scoizec, A., Briand, F.-X., Van De Wiele, A., Eterradossi, N., Bouquin, S.L., Niqueux, E., Troyano-Groux, A., 2020. Bilan de la surveillance de l’Influenza aviaire et de la maladie de Newcastle en France en 2016. *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment. - DGAL - Anses* 91, 1–7.
- Huneau-Salaün, A., Scoizec, A., Thomas, R., Martenot, C., Schmitz, A., Pierre, I., Allée, C., Busson, R., Massin, P., Briand, F.-X., Guillemoto, C., Louboutin, K., Souchaud, F., Cherbonnel-Pansart, M., Niqueux, E., Grasland, B., Souillard, R., Bouquin, S.L., 2022. Avian influenza outbreaks: evaluating the efficacy of cleaning and disinfection of vehicles and transport crates. *Poult. Sci.* 101, 101569. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101569>
- Hurt, A.C., Vijaykrishna, D., Butler, J., Baas, C., Maurer-Stroh, S., Silva-de-la-Fuente, M.C., Medina-Vogel, G., Olsen, B., Kelso, A., Barr, I.G., Gonzalez-Acuna, D., 2014. Detection of Evolutionarily Distinct Avian Influenza A Viruses in Antarctica. *mBio* 5, e01098-14, [mBio.01098-14](https://doi.org/10.1128/mBio.01098-14)
- IFOP, 2020. Le baromètre d’image des agriculteurs Vague 20. IFOP pour Dimanche Ouest France.
- INAO, 2021. IGP Canard à foie gras du Sud-Ouest (Chalosse, Gascogne, Gers, Landes, Périgord, Quercy) [WWW Document]. INAO - Inst. Natl. Orig. Qual. URL <https://www.inao.gouv.fr/produit/12949> (accessed 11.6.21).
- INAO, 2019. Les produits sous signe d’identification de la qualité et de l’origine : chiffres-clés 2019. Institut National de l’Origine et de la Qualité.

- INAO, Chambre Régionale d'Agriculture Nouvelle-Aquitaine, DRAAF Nouvelle-Aquitaine, 2019. Mémento : Les signes officiels de la qualité et de l'origine en Nouvelle-Aquitaine, données 2017. INAO.
- INRAE, ENVT, ENSAT, ESA-Purpan, 2011. Avicampus [WWW Document]. Avicampus Site Groupe Avic. Cunic. Toulouse Agri Campus. URL <http://www.avicampus.fr/index.html> (accessed 11.7.21).
- International Committee on Taxonomy of Viruses, 2021. The ICTV Taxonomy Database [WWW Document]. Int. Comm. Taxon. Viruses ICTV. URL <https://ictv.global/taxonomy/> (accessed 10.19.21).
- IRQUALIM, INAO, Chambre Régionale d'Agriculture d'Occitanie, ODR-INRAE, DRAAF Occitanie, 2018. Observatoire économique des signes d'identification de la qualité et de l'origine en Occitanie, données 2016. INAO.
- Jackwood, M.W., de Wit, S.J., 2020. Chapter 4: Infectious Bronchitis, in: Swayne, D.E. (Ed.), Diseases of Poultry, 14th Edition. Wiley-Blackwell, pp. 167–188.
- Jackwood, M.W., Suarez, D.L., Hilt, D., Pantin-Jackwood, M.J., Spackman, E., Woolcock, P., Cardona, C., 2010. Biologic Characterization of Chicken-Derived H6N2 Low Pathogenic Avian Influenza Viruses in Chickens and Ducks. *Avian Dis.* 54, 120–125. <https://doi.org/10.1637/8987-070909-ResNote.1>
- Jahan, N.A., Lindsey, L.L., Kipp, E.J., Reinschmidt, A., Heins, B.J., Runck, A.M., Larsen, P.A., 2021. Nanopore-Based Surveillance of Zoonotic Bacterial Pathogens in Farm-Dwelling Peridomestic Rodents. *Pathogens* 10, 1183. <https://doi.org/10.3390/pathogens10091183>
- Jeliazkov, A., Mimet, A., Chargé, R., Jiguet, F., Devictor, V., Chiron, F., 2016. Impacts of agricultural intensification on bird communities: New insights from a multi-level and multi-facet approach of biodiversity. *Agric. Ecosyst. Environ.* 216, 9–22. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2015.09.017>
- Jeong, S., Lee, D.-H., Kim, Y.-J., Lee, S.-H., Cho, A.Y., Noh, J.-Y., Tseren-Ochir, E.-O., Jeong, J.-H., Song, C.-S., 2019. Influenza A(H6N5) Virus into Asia from North America by Wild Birds. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 3.
- Jetz, W., Wilcove, D.S., Dobson, A.P., 2007. Projected Impacts of Climate and Land-Use Change on the Global Diversity of Birds. *PLoS Biol.* 5, e157. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050157>
- Jiguet, F., 2020. The Fox and the Crow. A need to update pest control strategies. *Biol. Conserv.* 248, 108693. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108693>
- Jin, J.-H., Wang, J.-J., Ren, Y.-C., Liu, S., Li, J.-P., Hou, G.-Y., Liu, H.-L., Zhuang, Q.-Y., Wang, S.-C., Jiang, W.-M., Yu, X.-H., Yu, J.-M., Yuan, L.-P., Peng, C., Zhang, G.-Z., Chen, J.-M., 2021. A set of RT-PCR assays for detection of all known avian paramyxoviruses and application in surveillance of avian paramyxoviruses in China. *PeerJ* 9, e10748. <https://doi.org/10.7717/peerj.10748>
- Johnson, D.H., 2008. In Defense of Indices: The Case of Bird Surveys. *J. Wildl. Manag.* 72, 857–868. <https://doi.org/10.2193/2007-294>
- Jonassen, C.M., Kofstad, T., Larsen, I.-L., Lovland, A., Handeland, K., Follestad, A., Lillehaug, A., 2005. Molecular identification and characterization of novel coronaviruses infecting graylag geese (*Anser anser*), feral pigeons (*Columbia livia*) and mallards (*Anas platyrhynchos*). *J. Gen. Virol.* 86, 1597–1607. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80927-0>
- Jones, B.A., Grace, D., Kock, R., Alonso, S., Rushton, J., Said, M.Y., McKeever, D., Mutua, F., Young, J., McDermott, J., Pfeiffer, D.U., 2013. Zoonosis emergence linked to agricultural intensification and

environmental change. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 8399–8404. <https://doi.org/10.1073/pnas.1208059110>

- Jones, K.E., Patel, N.G., Levy, M.A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J.L., Daszak, P., 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993. <https://doi.org/10.1038/nature06536>
- Jost, L., 2006. Entropy and diversity. *Oikos* 113, 363–375. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0030-1299.14714.x>
- Kahya, S., Temelli, S., Eyigor, A., Carli, K.T., 2010. Real-time PCR culture and serology for the diagnosis of *Mycoplasma gallisepticum* in chicken breeder flocks. *Vet. Microbiol.* 144, 319–324. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.01.012>
- Kajtar, A., 2021. Environmental DNA Plumes: Linking Fish Farm eDNA to Microbial Communities and Novel Detection of Transgenic eDNA (MSc Thesis). University of Windsor, Windsor, Ontario, Canada.
- Kaleta, E.F., Baldauf, C., 1988. Newcastle Disease in Free-Living and Pet Birds, in: Alexander, D.J. (Ed.), *Newcastle Disease, Developments in Veterinary Virology*. Springer US, Boston, MA, pp. 197–246. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-1759-3_12
- Kaleta, E.F., Taday, E.M.A., 2003. Avian host range of *Chlamydophila* spp. based on isolation, antigen detection and serology. *Avian Pathol.* 32, 435–462. <https://doi.org/10.1080/03079450310001593613>
- Karesh, W.B., Dobson, A., Lloyd-Smith, J.O., Lubroth, J., Dixon, M.A., Bennett, M., Aldrich, S., Harrington, T., Formenty, P., Loh, E.H., Machalaba, C.C., Thomas, M.J., Heymann, D.L., 2012. Ecology of zoonoses: natural and unnatural histories. *The Lancet* 380, 1936–1945. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)61678-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)61678-X)
- Karunakaran, A.C., Murugkar, H.V., Kumar, M., Nagarajan, S., Tosh, C., Pathak, A., Mekhemadhom Rajendrakumar, A., Agarwal, R.K., 2019. Survivability of highly pathogenic avian influenza virus (H5N1) in naturally preened duck feathers at different temperatures. *Transbound. Emerg. Dis.* 66, 1306–1313. <https://doi.org/10.1111/tbed.13148>
- Karunakaran, D., Hinshaw, V., Poss, P., Newman, J., Halvorson, D., 1983. Influenza A Outbreaks in Minnesota Turkeys Due to Subtype H10N7 and Possible Transmission by Waterfowl. *Avian Dis.* 27, 357–366. <https://doi.org/10.2307/1590162>
- Khan, O.A., Shuaib, M.A., Rhman, S.S.A., Ismail, M.M., Hammad, Y.A., Baky, M.H.A., Fusaro, A., Salviato, A., Cattoli, G., 2009. Isolation and identification of highly pathogenic avian influenza H5N1 virus from Houbara bustards (*Chlamydotis undulata macqueenii*) and contact falcons. *Avian Pathol. J. WVPA* 38, 35–39. <https://doi.org/10.1080/03079450802609815>
- Kim, B.-Y., Lee, D.-H., Kim, M.-S., Jang, J.-H., Lee, Y.-N., Park, J.-K., Yuk, S.-S., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Choi, I.-S., Song, C.-S., 2012. Exchange of Newcastle disease viruses in Korea: The relatedness of isolates between wild birds, live bird markets, poultry farms and neighboring countries. *Infect. Genet. Evol.* 12, 478–482. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.004>
- Kim, L.M., King, D.J., Suarez, D.L., Wong, C.W., Afonso, C.L., 2007. Characterization of Class I Newcastle Disease Virus Isolates from Hong Kong Live Bird Markets and Detection Using Real-Time Reverse Transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1310–1314. <https://doi.org/10.1128/JCM.02594-06>

- Kim, L.M., Suarez, D.L., Afonso, C.L., 2008. Detection of a Broad Range of Class I and II Newcastle Disease Viruses Using a Multiplex Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assay. *J. Vet. Diagn. Invest.* 20, 414–425. <https://doi.org/10.1177/104063870802000402>
- King, J., Harder, T., Conraths, F.J., Beer, M., Pohlmann, A., 2021. The genetics of highly pathogenic avian influenza viruses of subtype H5 in Germany, 2006–2020. *Transbound. Emerg. Dis.* 68, 1136–1150. <https://doi.org/10.1111/tbed.13843>
- Knutie, S.A., Gotanda, K.M., 2018. A Non-invasive Method to Collect Fecal Samples from Wild Birds for Microbiome Studies. *Microb. Ecol.* 76, 851–855. <https://doi.org/10.1007/s00248-018-1182-4>
- Koch, G., Elbers, A.R.W., 2006. Outdoor ranging of poultry: a major risk factor for the introduction and development of High-Pathogenicity Avian Influenza. *NJAS - Wagening. J. Life Sci.* 54, 179–194. [https://doi.org/10.1016/S1573-5214\(06\)80021-7](https://doi.org/10.1016/S1573-5214(06)80021-7)
- Koethe, S., Ulrich, L., Ulrich, R., Amler, S., Graaf, A., Harder, T.C., Grund, C., Mettenleiter, T.C., Conraths, F.J., Beer, M., Globig, A., 2020. Modulation of lethal HPAIV H5N8 clade 2.3.4.4B infection in AIV pre-exposed mallards. *Emerg. Microbes Infect.* 9, 180–193. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1713706>
- Krawiec, M., Piasecki, T., Wieliczko, A., 2015. Prevalence of *Chlamydia psittaci* and Other *Chlamydia* Species in Wild Birds in Poland. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 15, 652–655. <https://doi.org/10.1089/vbz.2015.1814>
- Kreisinger, J., Čížková, D., Kropáčková, L., Albrecht, T., 2015. Cloacal Microbiome Structure in a Long-Distance Migratory Bird Assessed Using Deep 16sRNA Pyrosequencing. *PLOS ONE* 10, e0137401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0137401>
- Kuiken, T., Holmes, E.C., McCauley, J., Rimmelzwaan, G.F., Williams, C.S., Grenfell, B.T., 2006. Host Species Barriers to Influenza Virus Infections. *Science* 312, 394–397. <https://doi.org/10.1126/science.1122818>
- Kukielka, E., Barasona, J.A., Cowie, C.E., Drewe, J.A., Gortazar, C., Cotarelo, I., Vicente, J., 2013. Spatial and temporal interactions between livestock and wildlife in South Central Spain assessed by camera traps. *Prev. Vet. Med.* 112, 213–221. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2013.08.008>
- Kumari, P., Dong, K., Eo, K.Y., Lee, W.-S., Kimura, J., Yamamoto, N., 2019. DNA metabarcoding-based diet survey for the Eurasian otter (*Lutra lutra*): Development of a Eurasian otter-specific blocking oligonucleotide for 12S rRNA gene sequencing for vertebrates. *PLOS ONE* 14, e0226253. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226253>
- Lahournat, M., Jiguet, F., Villers, A., Eraud, C., Henry, P.-Y., 2021. Where do thrushes migrating to France come from? Within-France distribution and temporal changes over 70 years. *Eur. J. Wildl. Res.* 67, 1–14. <https://doi.org/10.1007/s10344-021-01525-y>
- Lancaster, J.E., 1976. A History of Newcastle Disease with Comments on its Economic Effects. *Worlds Poult. Sci. J.* 32, 167–175. <https://doi.org/10.1079/WPS19760001>
- Laroucau, K., de Barbeyrac, B., Vorimore, F., Clerc, M., Bertin, C., Harkinezhad, T., Verminnen, K., Obeniche, F., Capek, I., Bébéar, C., Durand, B., Zanella, G., Vanrompay, D., Garin-Bastuji, B., Sachse, K., 2009. Chlamydial infections in duck farms associated with human cases of psittacosis in France. *Vet. Microbiol., Special Issue: Chlamydioses* 135, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.048>

- Latorre-Margalef, N., Avril, A., Tolf, C., Olsen, B., Waldenström, J., 2016. How Does Sampling Methodology Influence Molecular Detection and Isolation Success in Influenza A Virus Field Studies? *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1147–1153. <https://doi.org/10.1128/AEM.03283-15>
- Latorre-Margalef, N., Tolf, C., Grosbois, V., Avril, A., Bengtsson, D., Wille, M., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., Olsen, B., Waldenström, J., 2014. Long-term variation in influenza A virus prevalence and subtype diversity in migratory mallards in northern Europe. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 281, 20140098. <https://doi.org/10.1098/rspb.2014.0098>
- Lauerma, L.H., 1998. Mycoplasma PCR assays, in: *Nucleic Acid Amplification Assays for Diagnosis of Animal Diseases*. American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians, pp. 41–48.
- Le Bouquin, S., Huneau-Salaün, A., Hamon, M., Moisson, M.-C., Scoizec, A., Niqueux, E., Schmitz, A., Briand, F.-X., Van De Wiele, A., Bronner, A., 2016. L'épisode d'influenza aviaire en France en 2015-2016 – Situation épidémiologique au 30 juin 2016. *Bull. Epidémiologique Santé Anim. Aliment. - DGAL - Anses* 1–7.
- Le Gall-Ladevèze, C., 2022. Oral & Article - Interaction écologiques et échanges infectieux à l'interface entre avifaune commensale et canards élevés en plein air - 14èmes JRA-JRFG, Tours, 09 & 10 mars 2022.
- Le Gall-Ladevèze, C., 2021a. ID 115. Evaluation of contact network between commensal wild birds and domestic poultry around a French duck farm - 69th WDA / 14th EWDA - Joint Virtual Conference - Cuenca, Spain August 31 - September 2 2021.
- Le Gall-Ladevèze, C., 2021b. ID 79. Detection of a novel *Mycoplasma gallisepticum*-like species in Common Starling (*Sturnus vulgaris*) around poultry farms in France - 69th WDA / 14th EWDA - Joint Virtual Conference - Cuenca, Spain August 31 - September 2 2021.
- Le Gall-Ladevèze, C., 2021c. 136 - Longitudinal surveillance of common viral and bacterial agents in commensal wild birds around a French duck farm - 18th Ecology and Evolution of Infectious Diseases (online) meeting – Montpellier, France June 14-17 2021.
- Le Gall-Ladevèze, C., Nouvel, L.-X., Souvestre, M., Croville, G., Hygonenq, M.-C., Guérin, J.-L., Le Loc'h, G., 2021. Detection of a novel enterotropic *Mycoplasma gallisepticum*-like in European starling (*Sturnus vulgaris*) around poultry farms in France. *Transbound. Emerg. Dis.* 0, 1–12. <https://doi.org/10.1111/tbed.14382>
- Lebarbenchon, C., Feare, C.J., Renaud, F., Thomas, F., Gauthier-Clerc, M., 2010. Persistence of Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses in Natural Ecosystems. *Emerg. Infect. Dis.* 16, 1057–1062. <https://doi.org/10.3201/eid1607.090389>
- Lee, D.-H., Bertran, K., Kwon, J.-H., Swayne, D.E., 2017. Evolution, global spread, and pathogenicity of highly pathogenic avian influenza H5Nx clade 2.3.4.4. *J. Vet. Sci.* 18, 269–280. <https://doi.org/10.4142/jvs.2017.18.S1.269>
- Lee, D.-H., Killian, M.L., Torchetti, M.K., Brown, I., Lewis, N., Berhane, Y., Swayne, D.E., 2019. Intercontinental spread of Asian-origin H7 avian influenza viruses by captive bird trade in 1990's. *Infect. Genet. Evol.* 73, 146–150. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2019.04.028>
- Lee, D.-H., Lee, H.-J., Lee, Y.-J., Kang, H.-M., Jeong, O.-M., Kim, M.-C., Kwon, J.-S., Kwon, J.-H., Kim, C.-B., Lee, J.-B., Park, S.-Y., Choi, I.-S., Song, C.-S., 2010. DNA Barcoding Techniques for Avian Influenza Virus Surveillance in Migratory Bird Habitats. *J. Wildl. Dis.* 46, 649–654. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-46.2.649>

- Lee, E.-K., Jeon, W.-J., Kwon, J.-H., Yang, C.-B., Choi, K.-S., 2009. Molecular epidemiological investigation of Newcastle disease virus from domestic ducks in Korea. *Vet. Microbiol.* 134, 241–248. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.08.020>
- Leempoel, K., Hebert, T., Hadly, E.A., 2020. A comparison of eDNA to camera trapping for assessment of terrestrial mammal diversity. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 287, 20192353. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.2353>
- Lewis, N.S., Javakhishvili, Z., Russell, C.A., Machabliashvili, A., Lexmond, P., Verhagen, J.H., Vuong, O., Onashvili, T., Donduashvili, M., Smith, D.J., Fouchier, R.A.M., 2013. Avian Influenza Virus Surveillance in Wild Birds in Georgia: 2009–2011. *PLOS ONE* 8, e58534. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0058534>
- Ley, D.H., Hawley, D.M., Geary, S.J., Dhondt, A.A., 2016. House Finch (*Haemorhous mexicanus*) Conjunctivitis, and *Mycoplasma* spp. Isolated from North American Wild Birds, 1994–2015. *J. Wildl. Dis.* 52, 669–673. <https://doi.org/10.7589/2015-09-244>
- Li, L., Bowman, A.S., DeLiberto, T.J., Killian, M.L., Krauss, S., Nolting, J.M., Torchetti, M.K., Ramey, A.M., Reeves, A.B., Stallknecht, D.E., Webby, R.J., Wan, X.-F., 2018. Genetic Evidence Supports Sporadic and Independent Introductions of Subtype H5 Low-Pathogenic Avian Influenza A Viruses from Wild Birds to Domestic Poultry in North America. *J. Virol.* 92. <https://doi.org/10.1128/JVI.00913-18>
- Li, M., Yin, X., Guan, L., Zhang, X., Deng, G., Li, T., Cui, P., Ma, Y., Hou, Y., Shi, J., Chen, H., 2019. Insights from avian influenza surveillance of chickens and ducks before and after exposure to live poultry markets. *Sci. China Life Sci.* 62, 854–857. <https://doi.org/10.1007/s11427-019-9522-7>
- Li, Z., Liu, P., Hou, J., Xu, G., Zhang, J., Lei, Y., Lou, Z., Liang, L., Wen, Y., Zhou, J., 2020. Detection of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia ibidis* in the Endangered Crested Ibis (*Nipponia nippon*). *Epidemiol. Infect.* 148, e1. <https://doi.org/10.1017/S0950268819002231>
- Liais, E., Croville, G., Mariette, J., Delverdier, M., Lucas, M.-N., Klopp, C., Lluch, J., Donnadieu, C., Guy, J.S., Corrand, L., Ducatez, M.F., Guérin, J.-L., 2014. Novel Avian Coronavirus and Fulminating Disease in Guinea Fowl, France - Volume 20, Number 1—January 2014 - *Emerging Infectious Diseases journal - CDC. Emerg. Infect. Dis.* 20, 105–108. <https://doi.org/10.3201/eid2001.130774>
- Lijtmaer, D.A., Kerr, K.C.R., Stoeckle, M.Y., Tubaro, P.L., 2012. DNA Barcoding Birds: From Field Collection to Data Analysis, in: Kress, W.J., Erickson, D.L. (Eds.), *DNA Barcodes*. Humana Press, Totowa, NJ, pp. 127–152. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_7
- Linnaeus University (SE), Erasmus Medical Centre (NL), Waldenström, J., Kuiken, T., Wille, M., 2017. Narrative overview on wild bird migration in the context of highly pathogenic avian influenza incursion into the European Union. *EFSA Support. Publ.* 22 pp. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2017.EN-1283>
- Lisovski, S., Dijk, J.G.B., Klinkenberg, D., Nolet, B.A., Fouchier, R.A.M., Klaassen, M., 2018. The roles of migratory and resident birds in local avian influenza infection dynamics. *J. Appl. Ecol.* 55, 2963–2975. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13154>
- Litt, J., Leterrier, C., Fortun-Lamothe, L., 2021. Conditions d'élevage des palmipèdes à foie gras : des demandes sociétales à une démarche de progrès. *INRAE Prod. Anim.* 33, 203–222. <https://doi.org/10.20870/productions-animales.2020.33.3.4500>

- Liu, K., Ding, P., Pei, Y., Gao, R., Han, W., Zheng, H., Ji, Z., Cai, M., Gu, J., Li, X., Gu, M., Hu, J., Liu, Xiaowen, Hu, S., Zhang, P., Wang, Xiaobo, Wang, Xiaoquan, Liu, Xiufan, 2021. Emergence of a novel reassortant avian influenza virus (H10N3) in Eastern China with high pathogenicity and respiratory droplet transmissibility to mammals. *Sci. China Life Sci.* <https://doi.org/10.1007/s11427-020-1981-5>
- Lohman, D.J., Prawiradilaga, D.M., Meier, R., 2009. Improved COI barcoding primers for Southeast Asian perching birds (Aves: Passeriformes). *Mol. Ecol. Resour.* 9, 37–40. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02221.x>
- Long, J.S., Mistry, B., Haslam, S.M., Barclay, W.S., 2019. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. *Nat. Rev. Microbiol.* 17, 67–81. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0115-z>
- Longbottom, D., Coulter, L.J., 2003. Animal Chlamydioses and Zoonotic Implications. *J. Comp. Pathol.* 128, 217–244. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2002.0629>
- Longbottom, D., Livingstone, M., Ribeca, P., Beeckman, D.S.A., van der Ende, A., Pannekoek, Y., Vanrompay, D., 2021. Whole genome de novo sequencing and comparative genomic analyses suggests that *Chlamydia psittaci* strain 84/2334 should be reclassified as *Chlamydia abortus* species. *BMC Genomics* 22, 159. <https://doi.org/10.1186/s12864-021-07477-6>
- Lubac, S., Musseau, R., Caparros, O., Artois, M., Bicout, D.J., 2012. Interactions entre l'avifaune sauvage et les élevages de volailles : quel risque épidémiologique vis à vis de l'Influenza aviaire ? *Innov. Agron.* 25, 299–312.
- Lwoff, A., 1957. The Concept of Virus. *Microbiology* 17, 239–253. <https://doi.org/10.1099/00221287-17-2-239>
- Lycett, S.J., Duchatel, F., Digard, P., 2019. A brief history of bird flu. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 374, 20180257. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0257>
- Lycett, S.J., Pohlmann, A., Staubach, C., Caliendo, V., Woolhouse, M., Beer, M., Kuiken, T., Global Consortium for H5N8 and Related Influenza Viruses, 2020. Genesis and spread of multiple reassortants during the 2016/2017 H5 avian influenza epidemic in Eurasia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 117, 20814–20825. <https://doi.org/10.1073/pnas.2001813117>
- Ma, Y., Marais, A., Lefebvre, M., Faure, C., Candresse, T., 2020. Metagenomic analysis of virome cross-talk between cultivated *Solanum lycopersicum* and wild *Solanum nigrum*. *Virology* 540, 38–44. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.11.009>
- Macowan, K.J., Randall, C.J., Brand, T.F., 1983. Cloacal infection with *Mycoplasma gallisepticum* and the effect of inoculation with H120 infectious bronchitis vaccine virus. *Avian Pathol.* 12, 497–503. <https://doi.org/10.1080/03079458308436194>
- Majaneva, M., Diserud, O.H., Eagle, S.H.C., Boström, E., Hajibabaei, M., Ekrem, T., 2018. Environmental DNA filtration techniques affect recovered biodiversity. *Sci. Rep.* 8, 4682. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23052-8>
- Marinova-Petkova, A., Georgiev, G., Petkov, T., Darnell, D., Franks, J., Kayali, G., Walker, D., Seiler, P., Danner, A., Graham, A., McKenzie, P., Krauss, S., Webby, R.J., Webster, R.G., 2016. Influenza surveillance on 'foie gras' duck farms in Bulgaria, 2008–2012. *Influenza Other Respir. Viruses* 10, 98–108. <https://doi.org/10.1111/irv.12368>
- Masson-Delmotte, V., Zhai, P., Pirani, A., Connors, S.L., Péan, C., Berger, S., Caud, N., Chen, Y., Goldfarb, L., Gomis, M.I., Huang, M., Leitzell, K., Lonnoy, E., Matthews, J.B.R., Maycock, T.K., Waterfield, T., Yelekçi, Ö., Yu, R., Zhou, B. (Eds.), 2021. *Climate Change 2021: The Physical Science Basis.*

Contribution of Working Group I to the Sixth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC. ed. Cambridge University Press.

- Mawdsley, J.L., Bardgett, R.D., Merry, R.J., Pain, B.F., Theodorou, M.K., 1995. Pathogens in livestock waste, their potential for movement through soil and environmental pollution. *Appl. Soil Ecol.* 2, 1–15. [https://doi.org/10.1016/0929-1393\(94\)00039-A](https://doi.org/10.1016/0929-1393(94)00039-A)
- Mercaldo-Allen, R., Clark, P., Liu, Y., Phillips, G., Redman, D., Auster, P.J., Estela, E., Milke, L., Verkade, A., Rose, J.M., 2021. Exploring video and eDNA metabarcoding methods to assess oyster aquaculture cages as fish habitat. *Aquac. Environ. Interact.* 13, 277–294. <https://doi.org/10.3354/aei00408>
- Mercat, M., Clermont, O., Massot, M., Ruppe, E., de Garine-Wichatitsky, M., Miguel, E., Valls Fox, H., Cornelis, D., Andremont, A., Denamur, E., Caron, A., 2016. *Escherichia coli* Population Structure and Antibiotic Resistance at a Buffalo/Cattle Interface in Southern Africa. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 1459–1467. <https://doi.org/10.1128/AEM.03771-15>
- Meyer, A., Dinh, T.X., Nhu, T.V., Pham, L.T., Newman, S., Nguyen, T.T.T., Pfeiffer, D.U., Vergne, T., 2017. Movement and contact patterns of long-distance free-grazing ducks and avian influenza persistence in Vietnam. *PLOS ONE* 12, e0178241. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0178241>
- Miłek, J., Blicharz-Domańska, K., 2018. Coronaviruses in avian species – review with focus on epidemiology and diagnosis in wild birds. *J. Vet. Res.* 62, 249–255. <https://doi.org/10.2478/jvetres-2018-0035>
- Mine, J., Uchida, Y., Sharshov, K., Sobolev, I., Shestopalov, A., Saito, T., 2019. Phylogeographic evidence for the inter- and intracontinental dissemination of avian influenza viruses via migration flyways. *PLOS ONE* 14, e0218506. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0218506>
- Mognard, E., 2011. Les trois traditions du foie gras dans la gastronomie française. *Anthropol. Food.* <https://doi.org/10.4000/aof.6789>
- Morand, S., 2020. Emerging diseases, livestock expansion and biodiversity loss are positively related at global scale. *Biol. Conserv.* 248, 108707. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108707>
- Morand, S., Lajaunie, C., 2018a. 3 - Loss of Biological Diversity and Emergence of Infectious Diseases, in: Morand, S., Lajaunie, C. (Eds.), *Biodiversity and Health*. Elsevier, pp. 29–47. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-115-4.50003-2>
- Morand, S., Lajaunie, C., 2018b. Anthropogenic Stress, in: *Biodiversity and Health*. Elsevier, pp. 63–81. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78548-115-4.50005-6>
- Morens, D.M., Fauci, A.S., 2020. Emerging Pandemic Diseases: How We Got to COVID-19. *Cell* 182, 1077–1092. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.08.021>
- Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Bestebroer, T.M., Guldemeester, J., Beyer, W.E.P., de Wit, E., Schutten, M., Rimmelzwaan, G.F., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., 2009. Practical Considerations for High-Throughput Influenza A Virus Surveillance Studies of Wild Birds by Use of Molecular Diagnostic Tests. *J. Clin. Microbiol.* 47, 666–673. <https://doi.org/10.1128/JCM.01625-08>
- Munster, V.J., Baas, C., Lexmond, P., Waldenström, J., Wallensten, A., Fransson, T., Rimmelzwaan, G.F., Beyer, W.E.P., Schutten, M., Olsen, B., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., 2007. Spatial, Temporal, and Species Variation in Prevalence of Influenza A Viruses in Wild Migratory Birds. *PLOS Pathog.* 3, e61. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030061>

- Munster, V.J., Fouchier, R.A.M., 2009. Avian influenza virus: Of virus and bird ecology. *Vaccine* 27, 6340–6344. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2009.02.082>
- Mupepele, A.-C., Keller, M., Dormann, C.F., 2021. European agroforestry has no unequivocal effect on biodiversity: a time-cumulative meta-analysis. *BMC Ecol. Evol.* 21, 193. <https://doi.org/10.1186/s12862-021-01911-9>
- Muradrasoli, S., Bálint, Á., Wahlgren, J., Waldenström, J., Belák, S., Blomberg, J., Olsen, B., 2010. Prevalence and Phylogeny of Coronaviruses in Wild Birds from the Bering Strait Area (Beringia). *PLoS ONE* 5, e13640. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013640>
- Napp, S., Alba, A., Rocha, A.I., Sánchez, A., Rivas, R., Majó, N., Perarnau, M., Massot, C., Miguel, E.S., Soler, M., Busquets, N., 2017. Six-year surveillance of Newcastle disease virus in wild birds in north-eastern Spain (Catalonia). *Avian Pathol.* 46, 59–67. <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1206177>
- Nemeth, N.M., Thomas, N.O., Orahod, D.S., Anderson, T.D., Oesterle, P.T., 2010. Shedding and serologic responses following primary and secondary inoculation of house sparrows (*Passer domesticus*) and European starlings (*Sturnus vulgaris*) with low-pathogenicity avian influenza virus. *Avian Pathol.* 39, 411–418. <https://doi.org/10.1080/03079457.2010.513043>
- Newton, I., 2007a. *The migration ecology of birds*. Elsevier/Acad. Press, Amsterdam.
- Newton, I., 2007b. Chapter 21 - Recent changes in bird migrations, in: *The Migration Ecology of Birds*. Elsevier/Acad. Press, Amsterdam, pp. 617–637.
- Nicita, A., 2008. *Avian Influenza And The Poultry Trade* (No. 4551), Policy Research Working Papers. The World Bank. <https://doi.org/10.1596/1813-9450-4551>
- Numberger, D., Dreier, C., Vullioud, C., Gabriel, G., Greenwood, A.D., Grossart, H.-P., 2019. Recovery of influenza A viruses from lake water and sediments by experimental inoculation. *PLoS ONE* 14, e0216880. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216880>
- Ocejo, M., Oporto, B., Hurtado, A., 2019. 16S rRNA amplicon sequencing characterization of caecal microbiome composition of broilers and free-range slow-growing chickens throughout their productive lifespan. *Sci. Rep.* 9, 2506. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-39323-x>
- OIE, 2021a. Chapter 10.4. Infection with high pathogenicity avian influenza viruses, in: *Terrestrial Animal Health Code*. p. 12.
- OIE, 2021b. Chapter 3.3.4. Avian influenza (including infection with high pathogenicity avian influenza viruses), in: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. p. 26.
- OIE, 2021c. Chapter 10.9. Infection with Newcastle disease virus, in: *Terrestrial Animal Health Code*. p. 10.
- OIE, 2021d. Chapter 3.3.14. Newcastle disease (infection with Newcastle disease virus), in: *Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals*. p. 10.
- OIE, 2021e. Chapter 10.1. Avian chlamydiosis, in: *Terrestrial Animal Health Code*. p. 2.
- OIE, 2021f. Chapter 10.5. Infection with *Mycoplasma gallisepticum* (Avian mycoplasmosis), in: *Terrestrial Animal Health Code*. p. 2.

- OIE, 2021g. Chapter 3.3.5. Avian mycoplasmosis (*Mycoplasma gallisepticum*, *M. synoviae*), in: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. p. 18.
- OIE, 2021h. Chapter 10.2. Avian infectious bronchitis, in: Terrestrial Animal Health Code. p. 2.
- OIE, 2018a. Chapter 3.3.1. Avian chlamydiosis, in: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. p. 13.
- OIE, 2018b. Chapter 3.3.2. Avian infectious bronchitis, in: Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals. p. 14.
- Oliveros, C.H., Field, D.J., Ksepka, D.T., Barker, F.K., Aleixo, A., Andersen, M.J., Alström, P., Benz, B.W., Braun, E.L., Braun, M.J., Bravo, G.A., Brumfield, R.T., Chesser, R.T., Claramunt, S., Cracraft, J., Cuervo, A.M., Derryberry, E.P., Glenn, T.C., Harvey, M.G., Hosner, P.A., Joseph, L., Kimball, R.T., Mack, A.L., Miskelly, C.M., Peterson, A.T., Robbins, M.B., Sheldon, F.H., Silveira, L.F., Smith, B.T., White, N.D., Moyle, R.G., Faircloth, B.C., 2019. Earth history and the passerine superradiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116, 7916–7925. <https://doi.org/10.1073/pnas.1813206116>
- Olsen, B., Munster, V.J., Wallensten, A., Waldenstrom, J., Osterhaus, A.D.M.E., Fouchier, R.A.M., 2006. Global Patterns of Influenza A Virus in Wild Birds. *Science* 312, 384–388. <https://doi.org/10.1126/science.1122438>
- Onuma, M., Kakogawa, M., Yanagisawa, M., Haga, A., Okano, Tomomi, Neagari, Y., Okano, Tsukasa, Goka, K., Asakawa, M., 2017. Characterizing the temporal patterns of avian influenza virus introduction into Japan by migratory birds. *J. Vet. Med. Sci.* 79, 943–951. <https://doi.org/10.1292/jvms.16-0604>
- Opota, O., Jatou, K., Branley, J., Vanrompay, D., Erard, V., Borel, N., Longbottom, D., Greub, G., 2015. Improving the molecular diagnosis of *Chlamydia psittaci* and *Chlamydia abortus* infection with a species-specific duplex real-time PCR. *J. Med. Microbiol.* 64, 1174–1185. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.000139>
- PALSO, 2021. Canard à Foie Gras du Sud-Ouest [WWW Document]. Foie Gras Sud-Ouest IGP. URL <http://www.foie-gras-du-sud-ouest.fr/IGP/> (accessed 11.6.21).
- Pannwitz, G., Wolf, C., Harder, T., 2009. Active Surveillance for Avian Influenza Virus Infection in Wild Birds by Analysis of Avian Fecal Samples from the Environment. *J. Wildl. Dis.* 45, 512–518. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-45.2.512>
- Pantchev, A., Sting, R., Bauerfeind, R., Tyczka, J., Sachse, K., 2009. New real-time PCR tests for species-specific detection of *Chlamydophila psittaci* and *Chlamydophila abortus* from tissue samples. *Vet. J.* 181, 145–150. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.02.025>
- Patel, S., Waugh, J., Millar, C.D., Lambert, D.M., 2010. Conserved primers for DNA barcoding historical and modern samples from New Zealand and Antarctic birds. *Mol. Ecol. Resour.* 10, 431–438. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02793.x>
- Paul, M.C., Gilbert, M., Desvaux, S., Andriamanivo, H.R., Peyre, M., Khong, N.V., Thanapongtharm, W., Chevalier, V., 2014. Agro-environmental determinants of avian influenza circulation: a multisite study in Thailand, Vietnam and Madagascar. *PloS One* 9, e101958. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101958>
- Pauly, M., Snoeck, C.J., Phoutana, V., Keosengthong, A., Sausy, A., Khenkha, L., Nouanthong, P., Samountry, B., Jutavijittum, P., Vilivong, K., Hübschen, J.M., Black, A.P., Pommasichan, S., Muller, C.P., 2019.

Cross-species transmission of poultry pathogens in backyard farms: ducks as carriers of chicken viruses. *Avian Pathol.* 48, 503–511. <https://doi.org/10.1080/03079457.2019.1628919>

Pedersen, K., Marks, D.R., Afonso, C.L., Stopak, S.R., Williams-Coplin, D., Dimitrov, K.M., Miller, P.J., DeLiberto, T.J., 2016. Identification of Avian Paramyxovirus Serotype-1 in Wild Birds in the USA. *J. Wildl. Dis.* 52, 657. <https://doi.org/10.7589/2015-10-278>

Pennycott, T.W., 2016. Diseases of wild birds of the orders Passeriformes and Columbiformes - a review of conditions reported from the United Kingdom and an analysis of results from wild bird disease surveillance in Scotland 1994-2013 (PhD Thesis). University of Edinburgh.

Pereira, H.G., Tumova, B., Law, V.G., 1965. Avian Influenza A Viruses. *Bull. World Health Organ.* 32, 855–860.

Pérez-Ramírez, E., Rodríguez, V., Sommer, D., Blanco, J.M., Acevedo, P., Heffels-Redmann, U., Höfle, U., 2010. Serologic Testing for Avian Influenza Viruses in Wild Birds: Comparison of Two Commercial Competition Enzyme-Linked Immunosorbent Assays. *Avian Dis.* 54, 729–733. <https://doi.org/10.1637/8802-040109-ResNote.1>

Perkins, L.E.L., Swayne, D.E., 2002. Pathogenicity of a Hong Kong-origin H5N1 highly pathogenic avian influenza virus for emus, geese, ducks, and pigeons. *Avian Dis.* 46, 53–63. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2002\)046\[0053:POAHKO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2002)046[0053:POAHKO]2.0.CO;2)

Phouratsamay, A., 2018. Précision du statut des hérons garde-bœufs (*Bubulcus ibis*) présents dans le sud-ouest de la France en 2016 et 2017 vis-à-vis des virus de l'influenza aviaire, des virus de la maladie de Newcastle, de *Mycoplasma gallisepticum* et de *Chlamydia* spp. (Thèse d'exercice vétérinaire). Université Paul Sabatier Toulouse.

Pielou, E.C., 1966. The measurement of diversity in different types of biological collections. *J. Theor. Biol.* 13, 131–144. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(66\)90013-0](https://doi.org/10.1016/0022-5193(66)90013-0)

Pigot, A.L., Sheard, C., Miller, E.T., Bregman, T.P., Freeman, B.G., Roll, U., Seddon, N., Trisos, C.H., Weeks, B.C., Tobias, J.A., 2020. Macroevolutionary convergence connects morphological form to ecological function in birds. *Nat. Ecol. Evol.* 4, 230–239. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-1070-4>

Poveda, J.B., Carranza, J., Miranda, A., Garrido, A., Hermoso, M., Fernandez, A., Domenech, J., 1990. An epizootiological study of avian mycoplasmas in Southern Spain. *Avian Pathol.* 19, 627–633. <https://doi.org/10.1080/03079459008418718>

Prentice, J.C., Fox, N.J., Hutchings, M.R., White, P.C.L., Davidson, R.S., Marion, G., 2019. When to kill a cull: factors affecting the success of culling wildlife for disease control. *J. R. Soc. Interface* 16. <https://doi.org/10.1098/rsif.2018.0901>

Pyankova, O.G., Susloparov, I.M., Moiseeva, A.A., Kolosova, N.P., Onkhonova, G.S., Danilenko, A.V., Vakalova, E.V., Shendo, G.L., Nekeshina, N.N., Noskova, L.N., Demina, J.V., Frolova, N.V., Gavrilo, E.V., Maksyutov, R.A., Ryzhikov, A.B., 2021. Isolation of clade 2.3.4.4b A(H5N8), a highly pathogenic avian influenza virus, from a worker during an outbreak on a poultry farm, Russia, December 2020. *Eurosurveillance* 26, 2100439. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2021.26.24.2100439>

R Core Team, 2019. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

- Rahman, A., Habib, M., Shabbir, M.Z., 2018. Adaptation of Newcastle Disease Virus (NDV) in Feral Birds and their Potential Role in Interspecies Transmission. *Open Virol. J.* 12, 52–68. <https://doi.org/10.2174/1874357901812010052>
- Rahman, M.M., Talukder, A., Chowdhury, M.M.H., Talukder, R., Akter, R., 2021. Coronaviruses in wild birds – A potential and suitable vector for global distribution. *Vet. Med. Sci.* 7, 264–272. <https://doi.org/10.1002/vms3.360>
- Ramey, A.M., Reeves, A.B., Lagassé, B.J., Patil, V., Hubbard, L.E., Kolpin, D.W., McCleskey, R.B., Repert, D.A., Stallknecht, D.E., Poulson, R.L., 2022. Evidence for interannual persistence of infectious influenza A viruses in Alaska wetlands. *Sci. Total Environ.* 803, 150078. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.150078>
- Ramírez-Martínez, L.A., Loza-Rubio, E., Mosqueda, J., González-Garay, M.L., García-Espinosa, G., 2018. Fecal virome composition of migratory wild duck species. *PLOS ONE* 13, e0206970. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206970>
- Raviv, Z., Kleven, S.H., 2009. The Development of Diagnostic Real-Time Taqman PCRs for The Four Pathogenic Avian Mycoplasmas. *Avian Dis.* 53, 103–107. <https://doi.org/10.1637/8469-091508-Reg.1>
- Réseau SAGIR, 2021. Influenza aviaire : retour sur l'épizootie de cet hiver 2020-2021. *SAGIR Infos - OFB* 8–10.
- Rohaim, M.A., El Naggat, R.F., Helal, A.M., Hussein, H.A., Munir, M., 2017. Reverse spillover of avian viral vaccine strains from domesticated poultry to wild birds. *Vaccine* 35, 3523–3527. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2017.05.033>
- Ruiz-Ripa, L., Gómez, P., Alonso, C.A., Camacho, M.C., Ramiro, Y., de la Puente, J., Fernández-Fernández, R., Quevedo, M.Á., Blanco, J.M., Báguena, G., Zarazaga, M., Höfle, U., Torres, C., 2020. Frequency and Characterization of Antimicrobial Resistance and Virulence Genes of Coagulase-Negative Staphylococci from Wild Birds in Spain. Detection of *tst*-Carrying *S. sciuri* Isolates. *Microorganisms* 8, 1317. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8091317>
- Sachse, K., Kuehlewind, S., Ruettinger, A., Schubert, E., Rohde, G., 2012. More than classical *Chlamydia psittaci* in urban pigeons. *Vet. Microbiol.* 157, 476–480. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.01.002>
- Sadonès, H., Hendrikx, P., Hars, J., Niqueux, É., Schmitz, A., Briand, F.-X., 2013. Influenza aviaire et Newcastle. *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment. - DGAL - Anses* 59, 54–59.
- Sawicka, A., Durkalec, M., Tomczyk, G., Kurska, O., 2020. Occurrence of *Mycoplasma gallisepticum* in wild birds: A systematic review and meta-analysis. *PLOS ONE* 15, e0231545. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0231545>
- Sawicka, A., Tomczyk, G., Kurska, O., Stenzel, T., Gyuranecz, M., 2021. Evidence of *Mycoplasma* spp. transmission by migratory wild geese. *Poult. Sci.* 101526. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101526>
- Sawicka-Durkalec, A., Kurska, O., Bednarz, Ł., Tomczyk, G., 2021. Occurrence of *Mycoplasma* spp. in wild birds: phylogenetic analysis and potential factors affecting distribution. *Sci. Rep.* 11, 17065. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-96577-0>

- Schäfer, W., 1955. Vergleichende sero-immunologische Untersuchungen über die Viren der Influenza und klassischen Geflügelpest. *Z. Für Naturforschung B* 10, 81–91. <https://doi.org/10.1515/znb-1955-0205>
- Scherer, A.L., Scherer, J. de F.M., Petry, M.V., Sander, M., 2011. Occurrence and interaction of wild birds at poultry houses in southern Brazil. *Rev. Bras. Ornitol. - Braz. J. Ornithol.* 19, 74–79.
- Schipper, J., Chanson, J.S., Chiozza, F., Cox, N.A., Hoffmann, M., Katariya, V., Lamoreux, J., Rodrigues, A.S.L., Stuart, S.N., Temple, H.J., Baillie, J., Boitani, L., Lacher, T.E., Mittermeier, R.A., Smith, A.T., Absolon, D., Aguiar, J.M., Amori, G., Bakkour, N., Baldi, R., Berridge, R.J., Bielby, J., Black, P.A., Blanc, J.J., Brooks, T.M., Burton, J.A., Butynski, T.M., Catullo, G., Chapman, R., Cokeliss, Z., Collen, B., Conroy, J., Cooke, J.G., da Fonseca, G.A.B., Derocher, A.E., Dublin, H.T., Duckworth, J.W., Emmons, L., Emslie, R.H., Festa-Bianchet, M., Foster, M., Foster, S., Garshelis, D.L., Gates, C., Gimenez-Dixon, M., Gonzalez, S., Gonzalez-Maya, J.F., Good, T.C., Hammerson, G., Hammond, P.S., Happold, D., Happold, M., Hare, J., Harris, R.B., Hawkins, C.E., Haywood, M., Heaney, L.R., Hedges, S., Helgen, K.M., Hilton-Taylor, C., Hussain, S.A., Ishii, N., Jefferson, T.A., Jenkins, R.K.B., Johnston, C.H., Keith, M., Kingdon, J., Knox, D.H., Kovacs, K.M., Langhammer, P., Leus, K., Lewison, R., Lichtenstein, G., Lowry, L.F., Macavoy, Z., Mace, G.M., Mallon, D.P., Masi, M., McKnight, M.W., Medellin, R.A., Medici, P., Mills, G., Moehlman, P.D., Molur, S., Mora, A., Nowell, K., Oates, J.F., Olech, W., Oliver, W.R.L., Oprea, M., Patterson, B.D., Perrin, W.F., Polidoro, B.A., Pollock, C., Powel, A., Protas, Y., Racey, P., Ragle, J., Ramani, P., Rathbun, G., Reeves, R.R., Reilly, S.B., Reynolds, J.E., Rondinini, C., Rosell-Ambal, R.G., Rulli, M., Rylands, A.B., Savini, S., Schank, C.J., Sechrest, W., Self-Sullivan, C., Shoemaker, A., Sillero-Zubiri, C., De Silva, N., Smith, D.E., Srinivasulu, C., Stephenson, P.J., van Strien, N., Talukdar, B.K., Taylor, B.L., Timmins, R., Tirira, D.G., Tognelli, M.F., Tsytsulina, K., Veiga, L.M., Vie, J.-C., Williamson, E.A., Wyatt, S.A., Xie, Y., Young, B.E., 2008. The Status of the World's Land and Marine Mammals: Diversity, Threat, and Knowledge. *Science* 322, 225–230. <https://doi.org/10.1126/science.1165115>
- Schmaltz, L., Quaintenne, G., Gaudard, C., Dalloyau, S., 2020. Comptage des oiseaux d'eau à la mi-janvier en France : Résultats 2020 du comptage Wetlands International. LPO BirdLife France - Service Connaissance, Wetlands International, Ministère de la Transition écologique et solidaire, Rochefort.
- Schmitz, A., Pertusa, M., Le Bouquin, S., Rousset, N., Ogor, K., LeBras, M.-O., Martenot, C., Daniel, P., Belen Cepeda Hontecillas, A., Scoizec, A., Morin, H., Massin, P., Grasland, B., Niqueux, E., Eterradosi, N., 2020. Natural and Experimental Persistence of Highly Pathogenic H5 Influenza Viruses in Slurry of Domestic Ducks, with or without Lime Treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 86, e02288-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.02288-20>
- Schoborg, R.V., 2011. Chlamydia persistence – a tool to dissect chlamydia–host interactions. *Microbes Infect.* 13, 649–662. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.03.004>
- Schülein, A., Ritzmann, M., Christian, J., Schneider, K., Neubauer-Juric, A., 2020. Exposure of wild boar to Influenza A viruses in Bavaria: Analysis of seroprevalences and antibody subtype specificity before and after the panzootic of highly pathogenic avian influenza viruses A (H5N8). *Zoonoses Public Health* 00, 1–13. <https://doi.org/10.1111/zph.12841>
- Schultz, M.T., Lance, R.F., 2015. Modeling the Sensitivity of Field Surveys for Detection of Environmental DNA (eDNA). *PLOS ONE* 10, e0141503. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0141503>
- Scientific Task Force on Avian Influenza and Wild Birds, UNEP/CMS, FAO, 2016. Statement on H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza (HPAI) in poultry and wild birds. United Nations Environment Programme/Convention on Migratory Species (UNEP/CMS) - e Food and Agriculture Organization (FAO).

- Scoizec, A., Niqueux, E., Thomas, R., Daniel, P., Schmitz, A., Le Bouquin, S., 2018. Airborne Detection of H5N8 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus Genome in Poultry Farms, France. *Front. Vet. Sci.* 5, 15. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00015>
- Scott, A.B., Phalen, D., Hernandez-Jover, M., Singh, M., Groves, P., Toribio, J.-A.L.M.L., 2018. Wildlife Presence and Interactions with Chickens on Australian Commercial Chicken Farms Assessed by Camera Traps. *Avian Dis.* 62, 65–72. <https://doi.org/10.1637/11761-101917-Reg.1>
- Scott, D.A., Rose, P.M., 1996. Atlas of Anatidae Populations in Africa and Western Eurasia, Wetlands International. ed, Wetlands International Publication. Wageningen, The Netherlands.
- Seamans, T., Gosser, A., 2016. Bird dispersal techniques, in: Wildlife Damage Management Technical Series. USDA, APHIS, WS National Wildlife Research Center, Ft. Collins, Colorado, p. 12pp. <https://doi.org/10.32747/2016.7207730.ws>
- Segovia, K.M., Stallknecht, D.E., Kapczynski, D.R., Stabler, L., Berghaus, R.D., Fotjik, A., Latorre-Margalef, N., França, M.S., 2017. Adaptive Heterosubtypic Immunity to Low Pathogenic Avian Influenza Viruses in Experimentally Infected Mallards. *PLOS ONE* 12, e0170335. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170335>
- Seidlerova, Z., Kubasova, T., Faldynova, M., Crhanova, M., Karasova, D., Babak, V., Rychlik, I., 2020. Environmental Impact on Differential Composition of Gut Microbiota in Indoor Chickens in Commercial Production and Outdoor, Backyard Chickens. *Microorganisms* 8, 767. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050767>
- Shafir, S.C., Fuller, T., Smith, T.B., Rimoin, A.W., 2012. A national study of individuals who handle migratory birds for evidence of avian and swine-origin influenza virus infections. *J. Clin. Virol.* 54, 364–367. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.05.001>
- Shahid, M.A., Abubakar, M., Hameed, S., Hassan, S., 2009. Avian influenza virus (H5N1); effects of physico-chemical factors on its survival. *Virol. J.* 6, 38. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-6-38>
- Sharples, E., Baines, S.J., 2009. Chlamydophila psittaci-positive cloacal PCR tests in wild avian casualties in the UK. *Vet. Rec.* 164, 16–17.
- Shi, W., Gao, G.F., 2021. Emerging H5N8 avian influenza viruses. *Science* 372, 784–786. <https://doi.org/10.1126/science.abg6302>
- Shivakoti, S., Ito, H., Otsuki, K., Ito, T., 2010. Characterization of H5N1 highly pathogenic avian influenza virus isolated from a mountain hawk eagle in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* 72, 459–463. <https://doi.org/10.1292/jvms.09-0478>
- Shriner, S.A., Root, J.J., 2020. A Review of Avian Influenza A Virus Associations in Synanthropic Birds. *Viruses* 12, 1209. <https://doi.org/10.3390/v12111209>
- Shriner, S.A., Root, J.J., Lutman, M.W., Kloft, J.M., VanDalen, K.K., Sullivan, H.J., White, T.S., Milleson, M.P., Hairston, J.L., Chandler, S.C., Wolf, P.C., Turnage, C.T., McCluskey, B.J., Vincent, A.L., Torchetti, M.K., Gidlewski, T., DeLiberto, T.J., 2016. Surveillance for highly pathogenic H5 avian influenza virus in synanthropic wildlife associated with poultry farms during an acute outbreak. *Sci. Rep.* 6, 36237. <https://doi.org/10.1038/srep36237>
- Sid, H., Hartmann, S., Petersen, H., Ryll, M., Rautenschlein, S., 2016. Mycoplasma gallisepticum modifies the pathogenesis of influenza A virus in the avian tracheal epithelium. *Int. J. Med. Microbiol.* 306, 174–186. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.04.001>

- Slusher, M.J., Wilcox, B.R., Lutrell, M.P., Poulson, R.L., Brown, J.D., Yabsley, M.J., Stallknecht, D.E., 2014. Are passerine birds reservoirs for influenza A viruses? *J. Wildl. Dis.* 50, 792–809. <https://doi.org/10.7589/2014-02-043>
- Snow, D.W., Perrins, C.M., Gillmor, R., 1998. *The birds of the western palaeartic*. Vol. 2, Passerines, Concise Edition. ed. Oxford University Press, Oxford.
- Soos, C., Padilla, L., Iglesias, A., Gottdenker, N., Bédon, M.C., Rios, A., Parker, P.G., 2008. Comparison of pathogens in broiler and backyard chickens on the Galapagos islands: implications for transmission to wildlife. *The Auk* 125, 445–455. <https://doi.org/10.1525/auk.2008.06235>
- Sørensen, J.T., Edwards, S., Noordhuizen, J., Gunnarsson, S., 2006. Animal production systems in the industrialised world. *Rev. Sci. Tech. OIE* 25, 493–503. <https://doi.org/PMID:17094692>
- Souvestre, M., Delpont, M., Guinat, C., Dumat, C., Guichard, L., Manis, L., Duret, H., Guérin, J.-L., Le Loc'h, G., 2021. Backyard poultry flocks in France: A diversity of owners and biosecurity practices. *Prev. Vet. Med.* 197, 105511. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2021.105511>
- Souvestre, M., Guinat, C., Niqueux, E., Robertet, L., Croville, G., Paul, M., Schmitz, A., Bronner, A., Eterradossi, N., Guérin, J.-L., 2019. Role of Backyard Flocks in Transmission Dynamics of Highly Pathogenic Avian Influenza A(H5N8) Clade 2.3.4.4, France, 2016–2017. *Emerg. Infect. Dis.* 25, 551–554. <https://doi.org/10.3201/eid2503.181040>
- Spackman, E., Pedersen, J.C., McKinley, E.T., Gelb, J., 2013. Optimal specimen collection and transport methods for the detection of avian influenza virus and Newcastle disease virus. *BMC Vet. Res.* 9, 35. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-35>
- Spekreijse, D., Bouma, A., Koch, G., Stegeman, A., 2013. Quantification of dust-borne transmission of highly pathogenic avian influenza virus between chickens. *Influenza Other Respir. Viruses* 7, 132–138. <https://doi.org/10.1111/j.1750-2659.2012.00362.x>
- Sraka, B., 2004. Détection et quantification du portage de *Chlamydophila psittaci* chez le canard mulard en gavage : enquête de prévalence (Thèse d'exercice vétérinaire). Université de Toulouse, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, Toulouse, France.
- Ssematimba, A., Hagenaars, T.J., de Wit, J.J., Ruiterkamp, F., Fabri, T.H., Stegeman, J.A., de Jong, M.C.M., 2013. Avian influenza transmission risks: analysis of biosecurity measures and contact structure in Dutch poultry farming. *Prev. Vet. Med.* 109, 106–115. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2012.09.001>
- Ssematimba, A., Malladi, S., Hagenaars, T.J., Bonney, P.J., Weaver, J.T., Patyk, K.A., Spackman, E., Halvorson, D.A., Cardona, C.J., 2019. Estimating within-flock transmission rate parameter for H5N2 highly pathogenic avian influenza virus in Minnesota turkey flocks during the 2015 epizootic. *Epidemiol. Infect.* 147. <https://doi.org/10.1017/S0950268819000633>
- Stevens, J., Blixt, O., Tumpey, T.M., Taubenberger, J.K., Paulson, J.C., Wilson, I.A., 2006. Structure and Receptor Specificity of the Hemagglutinin from an H5N1 Influenza Virus. *Science* 312, 404–410. <https://doi.org/10.1126/science.1124513>
- Stoffolano, J.G., Jr, Geden, C.J., 1987. Succession of Manure Arthropods at a Poultry Farm in Massachusetts, USA, With Observations on *Carcinops Pumilio* (Coleoptera: Histeridae) Sex Ratios, Ovarian Condition, And Body Size1. *J. Med. Entomol.* 24, 212–220. <https://doi.org/10.1093/jmedent/24.2.212>

- Stubbs, E.L., 1948. Fowl pest, in: *Diseases of Poultry*. Iowa State University Press, Ames, Iowa, pp. 603–614.
- Suarez, D.L., Miller, P.J., Koch, G., Mundt, E., Rautenschlein, S., 2020. Chapter 3: Newcastle Disease, Other Avian Paramyxoviruses, and Avian Metapneumovirus Infections, in: Swayne, D.E. (Ed.), *Diseases of Poultry*, 14th Edition. Wiley-Blackwell, pp. 111–166.
- Sumithra, T.G., Chaturvedi, V.K., Susan, C., Siju, S.J., Rai, A.K., Harish, C., Sunita, S.C., 2013. Mycoplasmosis in wildlife: a review. *Eur. J. Wildl. Res.* 59, 769–781. <https://doi.org/10.1007/s10344-013-0769-9>
- Sun, J., Zhao, L., Li, X., Meng, W., Chu, D., Yang, X., Peng, P., Zhi, M., Qin, S., Fu, T., Li, J., Lu, S., Wang, W., He, X., Yu, M., Lv, X., Ma, W., Liao, M., Liu, Z., Zhang, G., Wang, Y., Li, Y., Chai, H., Lu, J., Hua, Y., 2020. Novel H5N6 avian influenza virus reassortants with European H5N8 isolated in migratory birds, China. *Transbound. Emerg. Dis.* 67, 648–660. <https://doi.org/10.1111/tbed.13380>
- Swayne, D.E. (Ed.), 2008. *Avian influenza*, 1st ed. ed. Blackwell Publishing Ltd., Ames, Iowa.
- Swayne, D.E., Suarez, D.L., 2000. Highly pathogenic avian influenza. *Rev. Sci. Tech. OIE* 19, 463–482.
- Szymańska-Czerwińska, M., Mitura, A., Niemczuk, K., Zaręba, K., Jodełko, A., Pluta, A., Scharf, S., Vitek, B., Aaziz, R., Vorimore, F., Laroucau, K., Schnee, C., 2017. Dissemination and genetic diversity of chlamydial agents in Polish wildfowl: Isolation and molecular characterisation of avian *Chlamydia abortus* strains. *PLOS ONE* 12, e0174599. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174599>
- Taberlet, P., Bonin, A., Zinger, L., Coissac, E., 2018. *Environmental DNA: For Biodiversity Research and Monitoring*. Oxford University Press.
- Taberlet, P., Prud'Homme, S.M., Campione, E., Roy, J., Miquel, C., Shehzad, W., Gielly, L., Rioux, D., Choler, P., Clément, J.-C., Melodelima, C., Pompanon, F., Coissac, E., 2012. Soil sampling and isolation of extracellular DNA from large amount of starting material suitable for metabarcoding studies. *Mol. Ecol.* 21, 1816–1820. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05317.x>
- Tamminga, S., 2003. Pollution due to nutrient losses and its control in European animal production. *Livest. Prod. Sci.* 84, 101–111. <https://doi.org/10.1016/j.livprodsci.2003.09.008>
- Tanikawa, T., Sakuma, S., Yoshida, E., Tsunekuni, R., Nakayama, M., Kobayashi, S., 2021. Comparative susceptibility of the common teal (*Anas crecca*) to infection with high pathogenic avian influenza virus strains isolated in Japan in 2004–2017. *Vet. Microbiol.* 263, 109266. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2021.109266>
- Taubenberger, J.K., Kash, J.C., Morens, D.M., 2019. The 1918 influenza pandemic: 100 years of questions answered and unanswered. *Sci. Transl. Med.* 11, eaau5485. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aau5485>
- Taubenberger, J.K., Morens, D.M., 2009. Pandemic influenza – including a risk assessment of H5N1. *Rev. Sci. Tech. Int. Off. Epizoot.* 28, 187–202.
- Tavares, E.S., Baker, A.J., 2008. Single mitochondrial gene barcodes reliably identify sister-species in diverse clades of birds. *BMC Evol. Biol.* 8, 81. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-8-81>
- Taylor, L.H., Latham, S.M., Woolhouse, M.E., 2001. Risk factors for human disease emergence. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 356, 983–989. <https://doi.org/10.1098/rstb.2001.0888>

- Terregino, C., Beato, M.S., Bertoli, E., Mancin, M., Capua, I., 2009. Unexpected heat resistance of Italian low-pathogenicity and high-pathogenicity avian influenza A viruses of H7 subtype to prolonged exposure at 37°C. *Avian Pathol.* 38, 519–522. <https://doi.org/10.1080/03079450903350244>
- The Global Consortium for H5N8 and Related Influenza Viruses, 2016. Role for migratory wild birds in the global spread of avian influenza H5N8. *Science* 354, 213–217. <https://doi.org/10.1126/science.aaf8852>
- Thomas, N.J. (Ed.), 2007. *Infectious diseases of wild birds*. Blackwell Publ, Ames, Iowa.
- Thomazelli, L.M., Araújo, J. de, Fabrizio, T., Walker, D., Reischak, D., Ometto, T., Barbosa, C.M., Petry, M.V., Webby, R.J., Durigon, E.L., 2017. Novel avian paramyxovirus (APMV-15) isolated from a migratory bird in South America. *PLOS ONE* 12, e0177214. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177214>
- Thornton, P.K., 2010. Livestock production: recent trends, future prospects. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* 365, 2853–2867. <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0134>
- Tiensen, T., Nielen, M., Vernooij, H., Songserm, T., Kalpravidh, W., Chotiprasatintara, S., Chaisingh, A., Wongkasemjit, S., Chanachai, K., Thanapongtham, W., Srisuvan, T., Stegeman, A., 2007. Transmission of the Highly Pathogenic Avian Influenza Virus H5N1 within Flocks during the 2004 Epidemic in Thailand. *J. Infect. Dis.* 196, 1679–1684. <https://doi.org/10.1086/522007>
- Tolf, C., Latorre-Margalef, N., Wille, M., Bengtsson, D., Gunnarsson, G., Grosbois, V., Hasselquist, D., Olsen, B., Elmberg, J., Waldenström, J., 2013. Individual Variation in Influenza A Virus Infection Histories and Long-Term Immune Responses in Mallards. *PLoS ONE* 8, e61201. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061201>
- Torremorell, M., Alonso, C., Davies, P.R., Raynor, P.C., Patnayak, D., Torchetti, M., McCluskey, B., 2016. Investigation into the Airborne Dissemination of H5N2 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus During the 2015 Spring Outbreaks in the Midwestern United States. *Avian Dis.* 60, 637–643. <https://doi.org/10.1637/11395-021816-Reg.1>
- Torrontegi, O., Alvarez, V., Acevedo, P., Gerrickagoitia, X., Höfle, U., Barral, M., 2019. Long-term avian influenza virus epidemiology in a small Spanish wetland ecosystem is driven by the breeding Anseriformes community. *Vet. Res.* 50. <https://doi.org/10.1186/s13567-019-0623-5>
- Tsukamoto, K., Imada, T., Tanimura, N., Okamatsu, M., Mase, M., Mizuhara, T., Swayne, D., Yamaguchi, S., 2007. Impact of Different Husbandry Conditions on Contact and Airborne Transmission of H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus to Chickens. *Avian Dis.* 51, 129–132. [https://doi.org/10.1637/0005-2086\(2007\)051\[0129:IODHCO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1637/0005-2086(2007)051[0129:IODHCO]2.0.CO;2)
- UICN France, MNHN, LPO BirdLife France, SEOF, ONCFS, 2016. *La Liste rouge des espèces menacées en France - Chapitre Oiseaux de France métropolitaine*. Paris, France.
- Uno, Y., Soda, K., Tomioka, Y., Ito, T., Usui, T., Yamaguchi, T., 2020. Pathogenicity of clade 2.3.2.1 H5N1 highly pathogenic avian influenza virus in American kestrel (*Falco sparverius*). *Avian Pathol.* 49, 515–525. <https://doi.org/10.1080/03079457.2020.1787337>
- Ushio, M., Fukuda, H., Inoue, T., Makoto, K., Kishida, O., Sato, K., Murata, K., Nikaido, M., Sado, T., Sato, Y., Takeshita, M., Iwasaki, W., Yamanaka, H., Kondoh, M., Miya, M., 2017. Environmental DNA enables detection of terrestrial mammals from forest pond water. *Mol. Ecol. Resour.* 17, e63–e75. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12690>

- Ushio, M., Murata, K., Sado, T., Nishiumi, I., Takeshita, M., Iwasaki, W., Miya, M., 2018. Demonstration of the potential of environmental DNA as a tool for the detection of avian species. *Sci. Rep.* 8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22817-5>
- Valdez-Gómez, H.E., Navarro-López, R., Vázquez-Mendoza, L.F., Zalapa-Hernández, M., Guerrero-Hernández, I., Fonseca-Delgado, V., 2017. Risk factors for the transmission of infectious diseases agents at the wild birds -commercial birds interface. A pilot study in the region of the altos de Jalisco, Mexico. *Bull. Académie Vét. Fr.* 142. <https://doi.org/10.4267/2042/62332>
- Valentin, R.E., Fonseca, D.M., Nielsen, A.L., Leskey, T.C., Lockwood, J.L., 2018. Early detection of invasive exotic insect infestations using eDNA from crop surfaces. *Front. Ecol. Environ.* 16, 265–270. <https://doi.org/10.1002/fee.1811>
- Van De Wiele, A., Humeau, A., Bronner, A., Guillemain, M., Le Loc'h, G., Guérin, J.-L., Cauchard, J., Mercier, A., Calavas, D., 2017. Épisode H5N8 d'influenza aviaire en France en 2016-2017 : quel rôle pour la faune sauvage ? *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment. - DGAL - Anses* 27–31.
- van der Kolk, J.H., 2019. Role for migratory domestic poultry and/or wild birds in the global spread of avian influenza? *Vet. Q.* 39, 161–167. <https://doi.org/10.1080/01652176.2019.1697013>
- van Kuppeveld, F.J.M., Johansson, K.-E., Galama, J.M.D., Kissing, J., Bölske, G., van der Logt, J.T.M., Melchers, W.J.G., 1994. Detection of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures by a Mycoplasma Group-Specific PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 149–152.
- VanderWaal, K.L., Atwill, E.R., Isbell, L.A., McCowan, B., 2014. Quantifying microbe transmission networks for wild and domestic ungulates in Kenya. *Biol. Conserv.* 169, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2013.11.008>
- Vanrompay, D., 2020. Chapter 24: Avian Chlamydiosis, in: Swayne, D.E. (Ed.), *Diseases of Poultry*, 14th Edition. Wiley-Blackwell, pp. 1086–1108.
- Veen, J., Brouwer, J., Atkinson, P., Bilgin, C., Blew, J., Eksioğlu, S., Hoffmann, M., Nardelli, R., Spina, F., Tendi, C., Delany, S., 2007. Ornithological data relevant to the spread of Avian Influenza in Europe (phase 2): further identification and first field assessment of Higher Risk Species. Wetlands International, Wageningen, The Netherlands.
- Velkers, F.C., Manders, T.T.M., Vernooij, J.C.M., Stahl, J., Slaterus, R., Stegeman, J.A., 2020. Association of wild bird densities around poultry farms with the risk of highly pathogenic avian influenza virus subtype H5N8 outbreaks in the Netherlands, 2016. *Transbound. Emerg. Dis.* 68, 76–87. <https://doi.org/10.1111/tbed.13595>
- Venkataraman, S., Prasad, B.V.L.S., Selvarajan, R., 2018. RNA Dependent RNA Polymerases: Insights from Structure, Function and Evolution. *Viruses* 10, 76. <https://doi.org/10.3390/v10020076>
- Vergne, T., Gubbins, S., Guinat, C., Bauzile, B., Delpont, M., Chakraborty, D., Gruson, H., Roche, B., Andraud, M., Paul, M., Guérin, J.-L., 2021. Inferring within-flock transmission dynamics of highly pathogenic avian influenza H5N8 virus in France, 2020. *Transbound. Emerg. Dis.* 1–5. <https://doi.org/10.1111/tbed.14202>
- Verhagen, J.H., Fouchier, R.A.M., Lewis, N., 2021. Highly Pathogenic Avian Influenza Viruses at the Wild–Domestic Bird Interface in Europe: Future Directions for Research and Surveillance. *Viruses* 13, 212. <https://doi.org/10.3390/v13020212>
- Verhagen, J.H., van der Jeugd, H.P., Nolet, B.A., Slaterus, R., Kharitonov, S.P., de Vries, P.P., Vuong, O., Majoor, F., Kuiken, T., Fouchier, R.A., 2015. Wild bird surveillance around outbreaks of highly

pathogenic avian influenza A(H5N8) virus in the Netherlands, 2014, within the context of global flyways. *Eurosurveillance* 20. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2015.20.12.21069>

Vestheim, H., Jarman, S.N., 2008. Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples – a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Front. Zool.* 5, 12. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-5-12>

Vorimore, F., Aaziz, R., de Barbeyrac, B., Peuchant, O., Szymańska-Czerwińska, M., Herrmann, B., Schnee, C., Laroucau, K., 2021. A New SNP-Based Genotyping Method for *C. psittaci*: Application to Field Samples for Quick Identification. *Microorganisms* 9, 625. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9030625>

Vorimore, F., Hsia, R., Huot-Creasy, H., Bastian, S., Deruyter, L., Passet, A., Sachse, K., Bavoil, P., Myers, G., Laroucau, K., 2013. Isolation of a New *Chlamydia* species from the Feral Sacred Ibis (*Threskiornis aethiopicus*): *Chlamydia ibidis*. *PLoS ONE* 8, e74823. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0074823>

Vorimore, F., Thébault, A., Poisson, S., Cléva, D., Robineau, J., de Barbeyrac, B., Durand, B., Laroucau, K., 2015. *Chlamydia psittaci* in ducks: a hidden health risk for poultry workers. *Pathog. Dis.* 73, 1–9. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftu016>

Wageningen Bioveterinary Research, Elbers, A.R.W., 2021. Risk of airborne transmission of avian influenza from wild waterfowl to poultry negligible. Wageningen Bioveterinary Research, Wageningen, The Netherlands.

Walley, K., Parrott, P., Custance, P., Meledo-Abraham, P., Bourdin, A., 2015. A review of French consumers purchasing patterns, perceptions and decision factors for poultry meat. *Worlds Poult. Sci. J.* 71, 5–14. <https://doi.org/10.1017/S004393391500001X>

Wan, X.-F., Dong, L., Lan, Y., Long, L.-P., Xu, C., Zou, S., Li, Z., Wen, L., Cai, Z., Wang, W., Li, X., Yuan, F., Sui, H., Zhang, Y., Dong, J., Sun, S., Gao, Y., Wang, M., Bai, T., Yang, L., Li, D., Yang, W., Yu, H., Wang, S., Feng, Z., Wang, Y., Guo, Y., Webby, R.J., Shu, Y., 2011. Indications that Live Poultry Markets Are a Major Source of Human H5N1 Influenza Virus Infection in China. *J. Virol.* 85, 13432–13438. <https://doi.org/10.1128/JVI.05266-11>

Welch, C.N., Shittu, I., Abolnik, C., Solomon, P., Dimitrov, K.M., Taylor, T.L., Williams-Coplin, D., Goraichuk, I.V., Meseko, C.A., Ibu, J.O., Gado, D.A., Joannis, T.M., Afonso, C.L., 2019. Genomic comparison of Newcastle disease viruses isolated in Nigeria between 2002 and 2015 reveals circulation of highly diverse genotypes and spillover into wild birds. *Arch. Virol.* <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04288-9>

Whitman, A.A., Iii, J.M.H., Brokaw, N.V.L., 1997. A Comparison of Two Bird Survey Techniques Used in a Subtropical Forest. *The Condor* 99, 955. <https://doi.org/10.2307/1370146>

WHO, 2020. Cumulative number of confirmed human cases for avian influenza A(H5N1) reported to WHO, 2003-2020. World Health Organization.

Wiethoelter, A.K., Beltrán-Alcrudo, D., Kock, R., Mor, S.M., 2015. Global trends in infectious diseases at the wildlife–livestock interface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 112, 9662–9667. <https://doi.org/10.1073/pnas.1422741112>

Wille, M., Avril, A., Tolf, C., Schager, A., Larsson, S., Borg, O., Olsen, B., Waldenström, J., 2015. Temporal dynamics, diversity, and interplay in three components of the virodiversity of a Mallard

population: Influenza A virus, avian paramyxovirus and avian coronavirus. *Infect. Genet. Evol.* 29, 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.11.014>

- Wille, M., Holmes, E.C., 2020a. Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses. *FEMS Microbiol. Rev.* 44, 631–644. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa026>
- Wille, M., Holmes, E.C., 2020b. Wild birds as reservoirs for diverse and abundant gamma- and deltacoronaviruses. *FEMS Microbiol. Rev.* fuaa026. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuaa026>
- Wille, M., Shi, M., Klaassen, M., Hurt, A.C., Holmes, E.C., 2019. Virome heterogeneity and connectivity in waterfowl and shorebird communities. *ISME J.* <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0458-0>
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Lam, C.S.F., Lai, K.K.Y., Huang, Y., Lee, P., Luk, G.S.M., Dyrting, K.C., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2009. Comparative Analysis of Complete Genome Sequences of Three Avian Coronaviruses Reveals a Novel Group 3c Coronavirus. *J. Virol.* 83, 908–917. <https://doi.org/10.1128/JVI.01977-08>
- Woo, P.C.Y., Lau, S.K.P., Lam, C.S.F., Lau, C.C.Y., Tsang, A.K.L., Lau, J.H.N., Bai, R., Teng, J.L.L., Tsang, C.C.C., Wang, M., Zheng, B.-J., Chan, K.-H., Yuen, K.-Y., 2012. Discovery of Seven Novel Mammalian and Avian Coronaviruses in the Genus Deltacoronavirus Supports Bat Coronaviruses as the Gene Source of Alphacoronavirus and Betacoronavirus and Avian Coronaviruses as the Gene Source of Gammacoronavirus and Deltacoronavirus. *J. Virol.* 86, 3995–4008. <https://doi.org/10.1128/JVI.06540-11>
- World Bank, 2012. *People, Pathogens and Our Planet: The Economics of One Health* (No. 69145- GLB), People, Pathogens and Our Planet. World Bank, Washington, DC.
- Wu, T., Perrings, C., Shang, C., Collins, J.P., Daszak, P., Kinzig, A., Minter, B.A., 2019. Protection of wetlands as a strategy for reducing the spread of avian influenza from migratory waterfowl. *Ambio.* <https://doi.org/10.1007/s13280-019-01238-2>
- Xiang, B., Han, L., Gao, P., You, R., Wang, F., Xiao, J., Liao, M., Kang, Y., Ren, T., 2017. Spillover of Newcastle disease viruses from poultry to wild birds in Guangdong province, southern China. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* 55, 199–204. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.09.020>
- Xie, Y., Wang, J., Yang, J., Giesy, J.P., Yu, H., Zhang, X., 2017. Environmental DNA metabarcoding reveals primary chemical contaminants in freshwater sediments from different land-use types. *Chemosphere* 172, 201–209. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.12.117>
- Xin, L., Bai, T., Zhou, J.F., Chen, Y.K., Li, X.D., Zhu, W.F., Li, Y., Tang, J., Chen, T., Qin, K., Shi, J.H., Gao, R.B., Wang, D.Y., Chen, J.M., Shu, Y.L., 2015. Seropositivity for Avian Influenza H6 Virus among Humans, China. *Emerg. Infect. Dis.* 21, 1267–1269. <https://doi.org/10.3201/eid2107.150135>
- Yamaji, R., Saad, M.D., Davis, C.T., Swayne, D.E., Wang, D., Wong, F.Y.K., McCauley, J.W., Peiris, J.S.M., Webby, R.J., Fouchier, R.A.M., Kawaoka, Y., Zhang, W., 2020. Pandemic potential of highly pathogenic avian influenza clade 2.3.4.4 A(H5) viruses. *Rev. Med. Virol.* 30, e2099. <https://doi.org/10.1002/rmv.2099>
- Yamamoto, Y., Nakamura, K., Yamada, M., Mase, M., 2013. Pathogenesis in Eurasian Tree Sparrows Inoculated with H5N1 Highly Pathogenic Avian Influenza Virus and Experimental Virus Transmission from Tree Sparrows to Chickens. *Avian Dis.* 57, 205–213.

- Yang, J., Wang, Z., Du, Y., Jia, Y., Wang, L., Xu, S., Zhu, Q., 2019. Clade 2.3.2.1 H5N1 avian influenza viruses circulate at the interface of migratory and domestic birds around Qinghai Lake in China. *Vet. Microbiol.* 235, 234–242. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.07.009>
- Yang, L., Zhu, W., Li, X., Bo, H., Zhang, Y., Zou, S., Gao, R., Dong, J., Zhao, X., Chen, W., Dong, L., Zou, X., Xing, Y., Wang, D., Shu, Y., 2017. Genesis and Dissemination of Highly Pathogenic H5N6 Avian Influenza Viruses. *J. Virol.* 91. <https://doi.org/10.1128/JVI.02199-16>
- Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., Madden, T.L., 2012. Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC Bioinformatics* 13, 134. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-13-134>
- Yin, S., Xu, Y., Batbayar, N., Takekawa, J.Y., Si, Y., Prosser, D.J., Newman, S.H., Prins, H.H.T., Boer, W.F. de, 2021. Do contrasting patterns of migration movements and disease outbreaks between congeneric waterfowl species reflect differing immunity? *Geospatial Health* 16. <https://doi.org/10.4081/gh.2021.909>
- Yoo, D.-S., Lee, K., Beatriz, M.L., Chun, B.C., Belkhiria, J., Lee, K.-N., 2021. Spatio-temporal risk assessment for avian influenza outbreak based on the dynamics of habitat suitability for wild birds. *Transbound. Emerg. Dis.* <https://doi.org/10.1111/tbed.14376>
- Ypma, R.J.F., Jonges, M., Bataille, A., Stegeman, A., Koch, G., van Boven, M., Koopmans, M., van Ballegooijen, W.M., Wallinga, J., 2013. Genetic Data Provide Evidence for Wind-Mediated Transmission of Highly Pathogenic Avian Influenza. *J. Infect. Dis.* 207, 730–735. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis757>
- Zanetti, F., Berinstein, A., Pereda, A., Taboga, O., Carrillo, E., 2005. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Newcastle disease virus isolates from healthy wild birds. *Avian Dis.* 49, 546–550. <https://doi.org/10.1637/7381-051605R.1>
- Zhang, W., Ricketts, T.H., Kremen, C., Carney, K., Swinton, S.M., 2007. Ecosystem services and dis-services to agriculture. *Ecol. Econ.* 64, 253–260. <https://doi.org/10.1016/j.ecolecon.2007.02.024>
- Zhou, Z., Qiu, Y., Ge, X., 2021. The taxonomy, host range and pathogenicity of coronaviruses and other viruses in the Nidovirales order. *Anim. Dis.* 1, 5. <https://doi.org/10.1186/s44149-021-00005-9>
- Zhuang, Q.-Y., Wang, K.-C., Liu, S., Hou, G.-Y., Jiang, W.-M., Wang, S.-C., Li, J.-P., Yu, J.-M., Chen, J.-M., 2015. Genomic Analysis and Surveillance of the Coronavirus Dominant in Ducks in China. *PLoS ONE* 10, e0129256. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129256>

~ ~ ~



Liste des valorisations

- Le Gall-Ladevèze, C., 2021a. Poster ID 115. Evaluation of contact network between commensal wild birds and domestic poultry around a French duck farm. 69th WDA / 14th EWDA - Joint Virtual Conference - Cuenca, Spain August 31 - September 2 2021. [https://www.cuenca2020.com/static/upload/ow111/events/ev320/Site/files/Libro Abstracts Cuenca virtual v21.pdf](https://www.cuenca2020.com/static/upload/ow111/events/ev320/Site/files/Libro_Abstracts_Cuenca_virtual_v21.pdf)
- Le Gall-Ladevèze, C., 2021b. Poster ID 79. Detection of a novel *Mycoplasma gallisepticum*-like species in Common Starling (*Sturnus vulgaris*) around poultry farms in France. 69th WDA / 14th EWDA - Joint Virtual Conference - Cuenca, Spain August 31 - September 2 2021. [https://www.cuenca2020.com/static/upload/ow111/events/ev320/Site/files/Libro Abstracts Cuenca virtual v21.pdf](https://www.cuenca2020.com/static/upload/ow111/events/ev320/Site/files/Libro_Abstracts_Cuenca_virtual_v21.pdf)
- Le Gall-Ladevèze, C., 2021c. Poster 136 - Longitudinal surveillance of common viral and bacterial agents in commensal wild birds around a French duck farm. 18th Ecology and Evolution of Infectious Diseases (online) meeting - Montpellier, France June 14-17 2021. <https://www.eeidconference2021.org/room-3/>
- Le Gall-Ladevèze, C., Nouvel, L.-X., Souvestre, M., Croville, G., Hygonenq, M.-C., Guérin, J.-L., Le Loc'h, G., 2021. Detection of a novel enterotropic *Mycoplasma gallisepticum*-like in European starling (*Sturnus vulgaris*) around poultry farms in France. *Transbound. Emerg. Dis.* 0, 1–12. <https://doi.org/10.1111/tbed.14382>
- Le Gall-Ladevèze, C., 2022. Oral & Article - Interaction écologiques et échanges infectieux à l'interface entre avifaune commensale et canards élevés en plein air. 14èmes JRA-JRFG, Tours, 09 & 10 mars 2022.
- Le Gall-Ladevèze, C., Guinat, C., Fiévet, P., Vollot, B., Guérin, J.-L., Cappelle, J., Le Loc'h, G., in review. Quantification and characterisation of commensal wild birds and their interactions with domestic ducks on a free-range farm in southwest France. *Scientific Reports*.
- Le Gall-Ladevèze, C., Vollot, B., Lèbre, L., Guérin, J.-L., Cappelle, J., Le Loc'h, G., in prep. Surveillance of common viral and bacterial agents to assess transmission routes of Avian Influenza Viruses at the wild-domestic interface on a free-range duck farm.

~ ~ ~

Annexes

A. Indices de reproduction pour l'avifaune

Ces codes utilisés à l'échelle internationale sont basés sur ceux définis par le European Bird Census Council (EBCC), le plus élevé indiquant une probabilité plus forte de reproduction en cours pour l'espèce. Synthèse issue de Faune-France (<https://www.faune-france.org/>).

Échelle de probabilité	Code	Indice observé sur le terrain
Nidification possible	1	Espèce observée durant la saison de reproduction dans un habitat favorable à la nidification
	2	Mâle chanteur (ou cris de nidification) en période de reproduction
Nidification probable	3	Couple observé dans un habitat favorable durant la saison de reproduction
	4	Comportement territorial (chant, querelles avec des voisins, etc.) observé sur un même territoire 2 journées différentes à 7 jours ou plus d'intervalle. Observation simultanée de deux mâles chanteurs ou plus sur un même site
	5	Parades nuptiales ou accouplement ou échange de nourriture entre adultes
	6	Fréquentation d'un site de nid potentiel (distinct d'un site de repos)
	7	Signes ou cris d'inquiétude d'un individu adulte
	8	Présence de plaques incubatrices. (Observation sur un oiseau en main)
	9	Construction d'un nid, creusement d'une cavité
Nidification certaine	10	Adulte feignant une blessure ou cherchant à détourner l'attention
	11	Nid utilisé récemment ou coquilles vides (œuf pondu pendant l'enquête)
	12	Jeunes fraîchement envolés (espèces nidicoles) ou poussins (espèces nidifuges)
	13	Adulte entrant ou quittant un site de nid (incluant les nids situés trop haut ou les cavités et nichoirs, le contenu du nid n'ayant pu être examiné) ou adulte en train de couvrir
	14	Adulte transportant des sacs fécaux ou de la nourriture pour les jeunes
	15	Nid avec adulte vu couvant ou contenant des œufs
	16	Nid avec jeune(s) (vu ou entendu)

C. Poster en conférence : Identification et description d'un nouveau mycoplasme à l'interface avifaune-élevages

envt national veterinary school Toulouse

Detection of a novel enterotropic *Mycoplasma gallisepticum*-like in European Starling (*Sturnus vulgaris*) around poultry farms in France



Chloé Le Gall-Ladevèze¹ (chloe.legall-ladeveze@envt.fr), Laurent-Xavier Nouvel¹, Marie Souvestre¹, Guillaume Croville¹, Marie-Claude Hygonenq¹, Jean-Luc Guérin¹, Guillaume Le Loc'h¹
 1. IHAP, ENVT, INRAE, Université de Toulouse, Toulouse, France

Introduction

The role of **commensal wild birds** in the introduction and dissemination of pathogens between poultry farms comes regularly in question. **Southwest France** is of particular interest for the study of **wild-domestic bird interface**, as the region stands in second place for poultry production in the country, with various species (Galliformes and Anseriformes) and a high density of farms following high quality standards that imply several months of **outdoor breeding**.

Mycoplasma gallisepticum (MG) is a **common pathogen** of Galliformes which induces chronic respiratory syndromes of high economic and sanitary impact. **Long persistence** in a **broad range of hosts** and consistent **environmental survival** make MG a **good marker for infectious transmissions** at the wild-domestic bird interface. Therefore, presence and diversity of MG strains were studied in various domestic and wild birds in southwest France.

What is the **prevalence and strain distribution** of *Mycoplasma gallisepticum* in commensal **wild birds** and sympatric **domestic poultry** in southwest France?

Methods

- 1 **Sampling** : oropharyngeal & cloacal swabs in wild and free-range domestic birds (Figure 1)
- 2 **rtPCR screening** : MG 16S rRNA target (MG14F/MG13R), confirmation by *mgc2* gene target (*mgc2-2F/mgc2-2R*)
- 3 **Mycoplasma culture** : isolation of atypical strain (16S+/*mgc2*-)
- 4 **High-throughput sequencing** : Nanopore & Illumina on isolated strain for whole genome sequence
- 5 **rtPCR design & screening** : *"mgc2-like"* gene target, confirmation and prevalence of sequenced strain

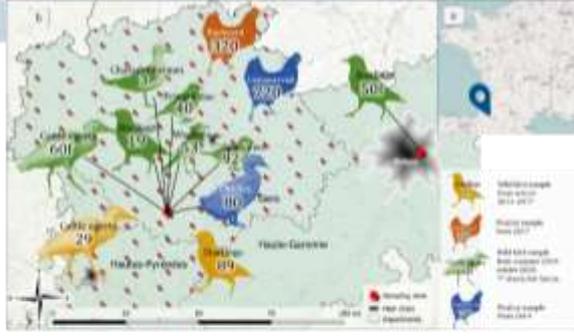


Figure 1. a- Location (blue pin) of the studied duck farm; b- Map of sampling distribution in species group, space and time

Results

MG rtPCR screening:
 • High prevalence of MG 16S in starling cloacal swabs
 • No *mgc2*-positive (Table 1)

Isolation & sequencing from starling swabs:
 • New species of Mycoplasma
 • Close but different from MG (Figure 2)

Table 1. PCR results and corresponding pooled prevalence estimates for each group of birds sampled. Colored frames highlight results of Starling Mycoplasma detections: red for starlings, yellow for other species.

Species	Area	Period	MG 16S rRNA (MG14F/MG13R)			MG <i>mgc2</i> (mgc2-2F/mgc2-2R)			Starling Mycoplasma (MG14F/MG13R)			Pathogenicity (MG14F/MG13R)		
			Number of samples	MG 16S rRNA positive	Prevalence	Number of samples	MG <i>mgc2</i> positive	Prevalence	Number of samples	Starling Mycoplasma positive	Prevalence	Number of samples	Pathogenicity positive	Prevalence
Starling	Southwest France	Spring 2019	6/19	15/38	0.41	0/19	0/19	0/19	15/19	0.79	0/19	0/19	0.00	
		Spring 2020	5/5	5/4	0.24	0/5	0/5	0/5	5/5	1.00	0/5	0/5	0.00	
		Spring 2021	5/2	5/2	0.29	0/5	0/5	0/5	5/2	0.71	0/2	0/2	0.00	
Cattle egret	Southwest France	Spring 2019	1/5	5/5	0.20	0/5	0/5	0/5	5/1	0.24	0/5	0/5	0.00	
		Spring 2021	8/2	8/2	0.12	0/8	0/8	0/8	8/2	0.40	0/2	0/2	0.00	
Guillemot	Southwest France	Spring 2019	8/2	8/2	0.12	0/8	0/8	0/8	8/2	0.40	0/2	0/2	0.00	
		Spring 2021	8/2	8/2	0.12	0/8	0/8	0/8	8/2	0.40	0/2	0/2	0.00	
Magpie	Southwest France	Spring 2019	5/14	1/14	0.07	0/14	0/14	0/14	5/14	0.36	0/14	0/14	0.00	
		Spring 2021	8/2	8/2	0.12	0/8	0/8	0/8	8/2	0.40	0/2	0/2	0.00	
Spurwing	Southwest France	Spring 2019	8/2	8/2	0.12	0/8	0/8	0/8	8/2	0.40	0/2	0/2	0.00	
		Spring 2021	8/2	8/2	0.12	0/8	0/8	0/8	8/2	0.40	0/2	0/2	0.00	
Redpoll	Southwest France	Spring 2019	11/14	7/14	0.50	0/14	0/14	0/14	11/14	0.79	0/14	0/14	0.00	
		Spring 2021	8/2	8/2	0.12	0/8	0/8	0/8	8/2	0.40	0/2	0/2	0.00	
Free range commercial chicken	Southwest France	Spring 2019	8/14	8/14	0.57	0/14	0/14	0/14	8/14	0.57	0/14	0/14	0.00	
		Spring 2021	8/2	8/2	0.12	0/8	0/8	0/8	8/2	0.40	0/2	0/2	0.00	

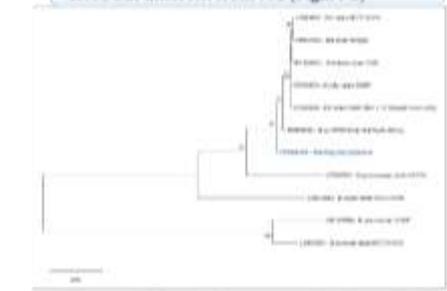


Figure 2. Maximum likelihood phylogenetic tree based on 16S rRNA sequences of Starling Mycoplasma (in blue) and various reference strains.

rtPCR screening on "mgc2-like" target:
 • Presence confirmed in starling cloaca and few other sympatric wild species (Table 1)
 • No detection in urban-wintering starlings
 • No detection in domestic chickens or ducks in contact with positive starlings

Conclusions

By searching for MG in wild birds, we **did not find MG** but a **new species** in the "MG-like" group that was isolated, described and fully sequenced. The **new mycoplasma is atypical** as it shows a **strong cloacal tropism** and its maintenance host seems to be **rural European Starling** with limited transmission to other species, in particular to poultry.

Detection of this mycoplasma in other hosts reveals **infection flow** in the commensal avian community of poultry farms. Its closeness with MG raises **cross-testing issues** with standard PCR on outdoor farms, and make it a potential participant in **mycoplasma gene transfer** at the wild-domestic interface.

Acknowledgements All technical helpers in samplings and analyses: Albert Phouratsamay, Emma Hourantier, Adam Ibenyeni, Benjamin Voliot.
Funding "Chaire de Biosécurité Aviaire", funded by the Direction Générale de l'Alimentation, Ministère de l'Agriculture et de l'Alimentation, France. FEDER/Région Occitanie Recherche et Sociétés 2018 - AI-TRACK financial support. ONT sequencing performed in the framework of the FIELD project funded by the France Futur Elevage Carnot Institute.

D. Poster en conférence : Évaluation de la circulation de VIA et autres agents infectieux à l'interface avifaune-élevages

Longitudinal surveillance of common viral and bacterial agents in commensal wild birds around a French duck farm



Chloé Le Gall-Ladevèze¹, Benjamin Vollot², Laëtitia Lèbre¹, Jean-Luc Guérin¹, Julien Cappelle³, Guillaume Le Loc'h¹
 chloe.legall-ladeveze@envt.fr

1. IHAP, ENVT, INRAE, Université de Toulouse, Toulouse, France
2. Independent researcher
3. ASTRE, Cirad, INRAE, Montpellier, France

Introduction

Recent outbreaks of highly pathogenic avian influenza in Europe have questioned the epidemiological role of commensal wild birds in introduction and dissemination of pathogens between poultry farms. South-West France is of particular interest for the study of wild-domestic bird interface, as it stands in second place for poultry production in the country, with various species (Galliformes and Anseriformes) and a high density of outdoor breeding farms.

As avian influenza viruses (AIV) present short excretion times, other avian infectious agents with broad host spectrum may be used as transmission markers. The aim of this study was to evaluate the prevalence and dynamics of four common avian infectious agents in the two sympatric compartments (namely domestic and commensal wild birds) in South-West France.

Methods

A longitudinal surveillance study was implemented around a typical free-range duck farm in South-West France (Figure 1), from April 2019 through March 2021 (Table 1):

- **Captured passerines**
 1731 individuals: blood and swabs
 11 campaigns: 10-256 individuals, median 184
- **Cattle egrets**
 207 fresh faeces under night roosts
 5 times during winter: 25-70 individuals, median 30
- **Domestic ducks on the farm**
 Swabs from 100 individuals
 5 occasions (+5 for AIV surveillance): 20 individuals
- **Environmental samples**
 Mud and wipes in 24 duck parks (occupied)
 7 campaigns contemporary of wild bird captures

- (RT)qPCR for AIV, avulaviruses (NDV), Chlamydiaceae and coronaviruses (pools of 5)
- ELISA serologies for AIV and NDV
- Identification of detected agents



Table 1. Sampling distribution along the study time. In *italic orange*: only regulatory AIV surveillance samples.

Year	2019											2020											2021		
	1	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
Month	1	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3	
Week	17	23	24	31	35	37	37	47	45	48	53	5	9	9	15	21	24	24	26	31	3	9	12		
Passerines				184	256		240	184		225	141		168					225	47			51	10		
Egrets							30	30											70	25	50				
Ducks	20	<i>20</i>																							
Parks							4	2		2	4		2					4	4						

E. Article de conférence : Analyse des contacts et des agents infectieux à l'interface avifaune-élevage

INTERACTION ECOLOGIQUES ET ECHANGES INFECTIEUX A L'INTERFACE ENTRE AVIFAUNE COMMENSALE ET CANARDS ELEVES EN PLEIN AIR

Le Gall-Ladevèze Chloé¹, Guinat Claire^{2,3}, Fiévet Pierre⁴, Vollot Benjamin⁵, Lèbre Laëtitia¹, Guérin Jean-Luc¹, Cappelle Julien^{6,7}, Le Loc'h Guillaume¹

¹ IHAP, ENVT, INRAE, Université de Toulouse - 23 chemin des Capelles - 31076 TOULOUSE, France,

² D-BSSE, ETH Zürich - Mattenstrasse 26 - 4058 BASEL, Switzerland

³ SIB - Quartier Sorge, Bâtiment Amphipole - 1015 LAUSANNE, Switzerland

⁴ ENVT - 23 chemin des Capelles - 31076 TOULOUSE, France

⁵ Independent researcher - 195 chemin d' Aimargues - 30670 AIGUES-VIVES, France

⁶ ASTRE, CIRAD, INRAE, Université de Montpellier - TA A-117/E, Campus international de Baillarguet - 34398 MONTPELLIER, France

⁷ CIRAD, UMR ASTRE - TA A-117/E, Campus international de Baillarguet - 34398 MONTPELLIER, France

chloe.legall-ladeveze@envt.fr

RÉSUMÉ

Les épizooties récentes d'influenza aviaire hautement pathogène touchant particulièrement les élevages de canards en plein air du Sud-Ouest de la France ont amené à questionner le rôle épidémiologique de l'avifaune fréquentant ces élevages. Autour d'un élevage de canards gras, nous avons observé l'avifaune sur les parcours extérieurs afin de quantifier et qualifier les occasions de contacts avec les canards, et nous avons collecté des prélèvements biologiques sur l'avifaune, les parcours et les canards afin de comparer leur profil microbiologique et rechercher de possibles échanges infectieux par l'étude de marqueurs robustes. Les interactions avec les canards et leur environnement étaient largement dominées en fréquence et proximité par les bergeronnettes grises (*Motacilla alba*) et les moineaux (*Passer domesticus*, *P. montanus*), permettant d'éventuelles transmissions infectieuses directes et indirectes. Le profil microbiologique des parcours était semblable à celui des canards, révélant de nombreux lots excréteurs de virus influenza faiblement pathogènes, ainsi que de *Chlamydia psittaci* et de gammacoronavirus de canards. Dans l'avifaune, les niveaux d'excrétion et de séropositivité faibles et sporadiques n'ont pas permis de montrer un risque d'infection majoré pour certaines espèces ou périodes. En outre, aucune identification virale ou bactérienne de l'avifaune n'était commune avec l'élevage, suggérant l'absence d'échanges infectieux. Il semble donc que l'avifaune commensale ne joue qu'un rôle épidémiologique mineur pour les élevages de canards en plein air, mais les contacts intenses observés ne permettent pas d'exclure les échanges.

ABSTRACT

Ecological and infectious monitoring at the interface between commensal wild birds and free-range ducks

Recent epizooties of highly pathogenic avian influenza that particularly affected free-range duck farms in southwest France raised questions as to the epidemiological role of wild birds visiting these farms. On a 'foie gras' duck farm, we observed wild birds on outdoor foraging areas so as to quantify and qualify occasions of contacts with ducks. We also collected biological samples from wild birds, foraging areas and ducks so as to compare microbiological patterns and look for possible infectious exchanges via the study of robust markers. Interactions with ducks and their environment were vastly dominated in frequency and proximity by white wagtails (*Motacilla alba*) and sparrows (*Passer domesticus*, *P. montanus*), allowing possible direct and indirect infectious transmission pathways. Microbiological profile of foraging areas was similar to the one of ducks, showing that numerous flocks excreted low pathogenic avian influenza viruses, as well as *Chlamydia psittaci* and duck gammacoronavirus. In wild birds, low and sporadic excretion and seropositivity levels did not allow to show any increased infection risk for certain species or times. Moreover, no viral or bacterial identification was similar in wild birds and the farm, suggesting the absence of infectious exchanges. It seems then that commensal wild birds only play a minor epidemiological role for free-range duck farms, but observed intense contacts do not allow to rule out exchanges.

INTRODUCTION

Les épizooties récurrentes d'influenza aviaire hautement pathogène (IAHP) rapportées en Europe ces derniers hivers ont particulièrement affecté la filière palmipèdes gras du Sud-Ouest de la France. Ce bassin d'élevage étant caractérisé par une forte densité spatiale et de longues durées de plein air intégral, l'exposition à l'avifaune sauvage a donc été questionnée puis étudiée vis-à-vis du risque influenza aviaire (Anses 2016; Van De Wiele et al. 2017). Mais ces études réalisées souvent tardivement sur les élevages foyers, par recherche virale directe uniquement, ou bien en ciblant des espèces peu observées sur les élevages n'ont pas permis de détecter d'éventuelles circulations virales faibles à modérées, la fenêtre d'excrétion ne durant que quelques jours après exposition chez les espèces terrestres peu réceptives. Afin de lever ces écueils et d'optimiser les chances de détection d'échanges infectieux à l'interface sauvage-domestique, nos objectifs étaient donc : (i) d'affiner l'étude écologique et comportementale des oiseaux fréquentant un élevage de canards gras du Sud-Ouest, afin (ii) de cibler une surveillance infectieuse multimodale basée sur la recherche directe et sérologique de virus influenza A (VIA), et de marqueurs d'échanges infectieux plus persistants.

1. MATERIELS ET METHODES

1.1. Site d'étude et dispositif expérimental de terrain

L'étude s'est concentrée sur un élevage de canards mulards du Gers, typique de la filière foie gras du Sud-Ouest et foyer d'IAHP en 2017. Le site est distant de zones humides particulières, et géré en agroforesterie avec des arbres et haies fruitières sur et autour des parcours extérieurs.

Deux jours consécutifs par mois de juillet 2020 à juin 2021 (hormis février et mai), des observations standardisées de l'avifaune présente sur les parcours ont été réalisées par la même personne. Chaque jour, quatre sessions d'observation étaient réparties équitablement du lever au coucher du soleil, en tournant entre trois parcours différents sélectionnés aléatoirement en début de visite. Les sessions d'observation consistaient en 30 min de balayage aux jumelles des parcours, notant pour chaque oiseau sauvage présent : son espèce, son comportement et son environnement direct (type de sol, perchoir, proximité inférieure à 1 m avec un canard).

Séparément des observations, de juillet 2019 à mars 2021, 12 sessions de prélèvements sur l'avifaune ont été réalisées. Celles-ci ont consisté en des captures au filet japonais (filets fins tendus entre de grandes perches verticales) en de multiples zones de l'élevage, ciblant essentiellement l'avifaune

commensale de petite taille. Sur les individus capturés, une bague d'identification individuelle a été posée, et des écouvillons oropharyngés et cloacaux ont été prélevés. Sur les individus d'au moins 11 g, 100 µL de sang ont aussi été prélevés sur tubes secs. Durant les hivers 2019-2020 et 2020-2021, des fèces fraîches de hérons garde-bœufs (*Bubulcus ibis*) ont été collectées par écouvillons sur une bâche au sol sous le dortoir voisin (2 km) occupé par le groupe observé sur l'élevage en hiver.

A la fin de chacune des sessions de captures sur l'élevage, des prélèvements environnementaux d'eau (abreuvoirs, flaques) et de chiffonnettes sur surfaces horizontales dégagées (matériel, béton) ont été réalisés sur les parcours de tous les lots présents.

Enfin, à cinq occasions les prélèvements sur lots de canards prêts à engraisser pour autocontrôles de VIA ont été doublés, permettant d'obtenir des écouvillons cloacaux et trachéaux de 20 individus sur ces lots. A ceux-ci, s'ajoutent sept lots dont les résultats d'analyse officielle des autocontrôles de VIA ont été obtenus, sans les écouvillons associés.

1.2. Analyse des données d'observation

L'ensemble des données d'observation (87 sessions) a été utilisé pour dénombrer la richesse en espèces à chaque mois de visite. Les données des parcours en présence de canards (34 sessions) ont été ensuite utilisées pour caractériser les profils de co-occurrence des différentes espèces ou groupes d'espèces de l'avifaune, par une méthode d'analyse de réseau. Les espèces ont alors été regroupées en communautés de liens plus denses par un algorithme de cheminement aléatoire le long des liens. Ces mêmes données ont été utilisées pour décrire la distribution des comportements individuels des espèces majoritaires en présence des canards.

1.3. Traitement et analyse des prélèvements biologiques et environnementaux

Les écouvillons ont été traités par lots de cinq (mêmes mois, espèce, âge et type d'écouvillon) à l'aide d'un kit d'extraction et purification d'ARN et ADN. Les prélèvements environnementaux ont été pré-traités par saturation de sels phosphatés puis le surnageant a été filtré à 0,22µm. La membrane de chaque filtre a ensuite été broyée avec une solution isotonique, et les surnageants de broyats ont été regroupés par date et pour chaque parcours, puis traités de la même manière que les surnageants des écouvillons afin de purifier les acides nucléiques.

Pour les recherches directes d'agents infectieux, les acides nucléiques ainsi extraits ont été analysés par différentes RT-qPCR ou qPCR large spectre adaptées en chimie SYBR Green. Les cibles étaient : l'ensemble des AIV (amorces "gène M" M52C/M253R, protocole Croville et al., 2018), l'ensemble des avulavirus dont virus de la maladie de Newcastle (NDV) (amorces AVU-RUB-

F1/AVU-RUB-R (Tong et al. 2008)), l'ensemble des coronavirus (amorces AC-CoV-F/AC-CoV-R (Chamings et al. 2018)), et l'ensemble des bactéries du genre *Chlamydia* (amorces Ch23S-F/Ch23S-R (Ehrlich et al. 2006)). Tout échantillon positif ou douteux a été vérifié par électrophorèse sur gel et séquençage Sanger du produit amplifié. Les AIV et chlamydia ont été plus spécifiquement identifiés, les premiers par séquençage et typage du gène HA, et les seconds par typages multi-locus et séquençage du plasmide au LNR de l'Anses à Maisons-Alfort. Les échantillons positifs aux VIA non typables par séquençage ont été testés pour les sous-types H6, H5 et H7 (RT-qPCR spécifiques).

Les sérums ont été analysés pour recherche d'anticorps anti-VIA et anti-NDV, grâce à des kits commerciaux ELISA compétition multi-espèces ID Screen® FLUACA et ID Screen® NDVC respectivement (Innovative Diagnostics, Grabels, France). Les résultats douteux selon les indications du fabricant ont été considérés faiblement positifs. Les sérums positifs aux VIA ont été ensuite analysés par un kit ELISA ID Screen® FLUACH5 (Innovative Diagnostics, Grabels, France) ciblant les anticorps anti-VIA de sous-type H5.

2. RESULTATS ET DISCUSSION

Un total de 42 espèces sauvages (Passériformes principalement) a été observé sur les parcours extérieurs de l'élevage au cours des 87 sessions d'observation sur 10 mois. Les richesses en espèces sur les parcours ont varié entre 14 et 20 au long des visites. En présence de canards domestiques sur les parcours (34 sessions), un total de 25 espèces sauvages a été observé. Le réseau formé par leurs co-occurrences cumulées sur l'ensemble des sessions, estimant ainsi de potentiels contacts indirects (Figure 1) montre une forte hétérogénéité des fréquences d'observation. Ainsi un trio d'espèces apparaît largement plus que les autres : les bergeronnettes grises (*Motacilla alba*), les moineaux (*Passer domesticus* et *P. montanus*) et les canards, associées deux par deux sur 82% à 94% des sessions d'observation. Les fréquences d'associations suivantes sont inférieures à 25% des sessions. Trois communautés de liens plus denses ont été identifiées (Figure 1), comprenant respectivement 11, 8 et 4 espèces : canards domestiques et espèces sauvages plus intensément en lien avec eux (communauté 1) ; espèces observées strictement en automne-hiver et en printemps-été (communautés 2 et 3, respectivement). Ces résultats d'observation contrastent avec d'autres contextes d'élevages européens et français où les bergeronnettes sont plus rares, tandis qu'en général les Columbidae, étourneaux et Corvidés sont plus abondants (Bicout et al. 2011; Veen et al. 2007). Parmi les 25 espèces sauvages observées sur les parcours occupés par des canards, 9 ont parfois été observées à moins d'un

mètre de ceux-ci (131 observations individuelles) (Figure 1). Parmi ces contacts rapprochés favorisant d'éventuelles transmissions infectieuses directes, 81% impliquaient des bergeronnettes grises, et seulement 11% les deux espèces de moineaux, les autres espèces comptant chacune moins de 5 observations de contacts rapprochés (Figure 1). Pour ce qui est des comportements individuels favorables aux échanges infectieux indirects, les bergeronnettes grises se démarquaient encore largement par leur observation plus fréquente que d'autres sur le sol dégradé par les canards (52% des observations contre 6,6% pour les moineaux et 21,8% pour tout le reste). De plus, les bergeronnettes grises et moineaux ont été les seules espèces observées pénétrant dans les bâtiments (3 et 9 observations respectivement), ou bien perchées sur les abreuvoirs (22 et 6 observations, ainsi qu'une tourterelle turque).

Un total de 1936 individus sauvages a été prélevé en 12 visites, représentant 62 espèces de 24 familles et 10 ordres taxonomiques, dont une majorité de Passériformes (Tableau 1). Neuf d'entre eux (passereaux capturés et une fiente de héron garde-bœufs) se sont révélés positifs pour la présence de VIA (0,46%) en RT-qPCR. Les prélèvements positifs présentaient de très faibles charges virales (Ct tous supérieurs à 33 cycles) qui n'ont pas permis de séquencer ou de détecter de sous-types H5, H6 ou H7 par RT-qPCR et seule une séquence dégradée a été obtenue à partir de la fiente de héron. Celle-ci a été prélevée durant l'épizootie de VIA H5N8 dans les élevages de la zone en 2021, mais la séquence était proche de sous-types H5 faiblement pathogènes. En sérologies, 25 des 910 sérums prélevés (2,75%) étaient positifs aux anticorps anti-VIA (Tableau 1), dont 2 du même individu à un mois d'intervalle. Parmi les 25 séropositifs, 5 étaient faiblement positifs (pourcentages de compétition entre 45% et 50%) et tous les autres bien positifs (pourcentages de compétition entre 9% et 43%, médiane de 31%). La proportion de séropositivité dans la population n'a pas varié significativement durant la période d'étude, et tous étaient séronégatifs pour le sous-type H5. En parallèle, 9 des 23 lots de canards (39%) prélevés par écouvillons ou dans l'environnement de leurs parcours se sont révélés positifs aux VIA. Les deux modes de prélèvement étaient concordants dans leurs résultats et dans les niveaux de charges virales plutôt moyens à faibles (Ct entre 31 et 35 cycles). Deux étaient positifs en juin 2019 à un sous-type H7 faiblement pathogène, tandis que les sept autres (deux saisons d'automne-hiver) étaient positifs au sous-type H6. Un lot en février 2020 a en parallèle présenté un sous-type H11. Ces détections de VIA en élevage de canards gras sont relativement similaires à ce qui est observé habituellement en Europe (Gonzales et al. 2010). Concernant les avulavirus, aucune détection n'a été obtenue par RT-qPCR dans l'avifaune ou les lots de canards, et seuls quatre sérums de l'avifaune

(0,44%) étaient positifs pour les anticorps anti-NDV durant les deux hivers, dont deux du même individu à un mois d'intervalle. Parmi les quatre séropositifs, deux étaient faibles (pourcentages de compétition de 66% et 70%) et deux bien positifs (pourcentages de compétition de 56% et 41%). Cela concorde avec la faible circulation actuelle de ces virus en France, en particulier en élevage (Huneau-Salaün et al. 2020). Aucun coronavirus n'a été détecté dans l'avifaune par RT-qPCR, tandis que cinq lots de canards (29%) étaient positifs de façon moyenne à faible (Ct entre 32 et 38 cycles) par écouvillons cloacaux et/ou par l'environnement aux deux saisons d'automne-hiver. Les séquences analysées étaient toutes très proches de l'espèce *Duck coronavirus 2714* isolée dans les Anatidés sauvages et domestiques (Chen et al. 2013). Enfin, neuf individus ont été positifs aux chlamydia par qPCR dans l'avifaune (0,46%). Malgré de faibles charges infectieuses dans les échantillons (Ct supérieurs à 34 cycles sauf un de 27 cycles), quatre souches ont pu être identifiées comme des souches aviaires de *Chlamydia abortus*. Les écouvillons de canards mulards ainsi que leur environnement étaient plus infectés avec huit lots positifs (47%), tous durant les deux saisons d'automne-hiver. Les charges bactériennes plus importantes (Ct entre 30 et 36 cycles) ont permis d'identifier sur la quasi-totalité d'entre eux des *C. psittaci* de génotype GR9, circulant habituellement chez les canards gras (Vorimore et al. 2015). Trois parcours de l'hiver 2020 étaient aussi porteurs de *C. abortus*, en parallèle ou non de *C. psittaci*, mais les souches n'ont pas pu être identifiées avec précision

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Anses. 2016. Saisine n° 2016-SA-0059
- Bicout JD, Artois M, Musseau R, Caparros O, Lubac S. 2011. 9èmes JRA, Tours, France
- Chamings A, Nelson TM, Vibin J, Wille M, Klaassen M, Alexandersen S. 2018. *Sci. Rep.* 8(5980):1–10
- Chen G-Q, Zhuang Q-Y, Wang K-C, Liu S, Shao J-Z, et al. 2013. *PLoS ONE.* 8(8):e72918
- Croville G, Foret C, Heuillard P, Senet A, Delpont M, et al. 2018. *Avian Pathol.* 47(3):253–60
- Ehrlich R, Slickers P, Goellner S, Hotzel H, Sachse K. 2006. *Mol. Cell. Probes.* 20(1):60–63
- Gonzales JL, Elbers ARW, Bouma A, Koch G, De Wit JJ, Stegeman JA. 2010. *Influenza Other Respir. Viruses.* 4(2):91–99
- Guinat C, Artois J, Bronner A, Guérin JL, Gilbert M, Paul MC. 2019. *Sci. Rep.* 9(6177):1–9
- Huneau-Salaün A, Schmitz A, Scoizec A, Briand F-X, Van De Wiele A, et al. 2020. *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment. - DGAL - Anses.* 91:1–7
- Tong S, Chern S-WW, Li Y, Pallansch MA, Anderson LJ. 2008. *J. Clin. Microbiol.* 46(8):2652–58
- Van De Wiele A, Humeau A, Bronner A, Guillemain M, Le Loc'h G, et al. 2017. *Bull. Épidémiologique Santé Anim. Aliment. - DGAL - Anses,* pp. 27–31
- Veen J, Brouwer J, Atkinson P, Bilgin C, Blew J, et al. 2007. *Wetlands International, Wageningen, The Netherlands*
- Vorimore F, Thébault A, Poisson S, Cléva D, Robineau J, et al. 2015. *Pathog. Dis.* 73(1):1–9

et aucun écouvillon de ces lots n'a pu être analysé pour identifier un possible portage concomitant chez les canards.

CONCLUSION

La domination massive des bergeronnettes grises et des deux espèces de moineaux dans les observations en présence des canards sur parcours, ainsi que leurs comportements individuels particulièrement proches des canards et de leurs zones de concentration, forment des conditions particulièrement favorables à d'éventuels échanges infectieux directs et indirects. Cependant, des mesures d'éloignement strictes pour ces petites espèces peu farouches sont difficilement compatibles avec l'élevage en plein air. Par ailleurs, l'avifaune commensale semblerait très rarement infectée par des agents pourtant identifiés abondamment chez les canards mulards et dans leur environnement. En outre, les très faibles charges infectieuses que nous avons trouvées dans l'avifaune limiteraient en situations de contact leur capacité de transmission infectieuse en direction des oiseaux d'élevage. L'avifaune commensale ne semble donc pas jouer un rôle majeur dans l'épidémiologie des agents infectieux des élevages de canards en plein air, en comparaison des voies de circulation infectieuse liées à la biosécurité intra-filière (Guinat et al. 2019).

Figure 1. Réseau des co-occurrences d'espèces sauvages en présence de canards, cumulées sur l'année. Chaque nœud correspond à une espèce ou groupe d'espèces, de taille proportionnelle au nombre d'espèces liées.

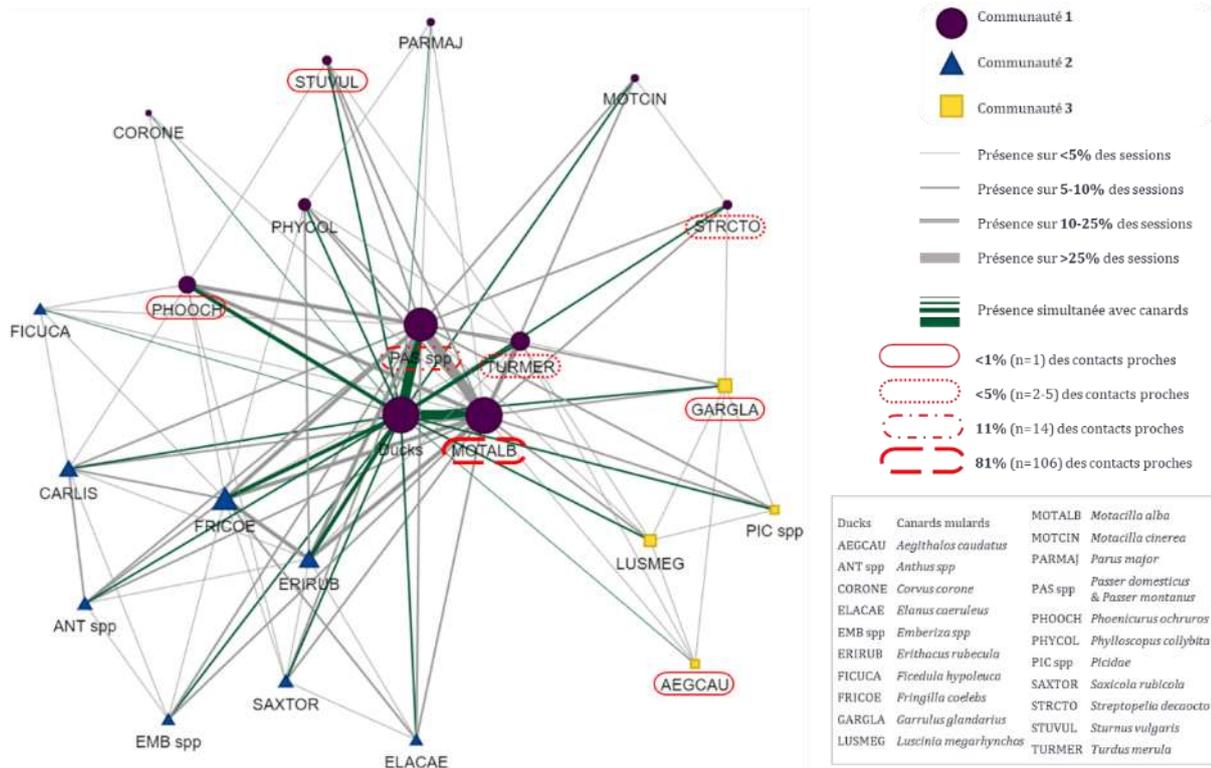


Tableau 1. Résultats des analyses PCR et ELISA par groupes d'espèces. Les groupes en gras sont ceux également observés en présence de canards sur l'étude écologique. Entre parenthèses sont indiqués les pourcentages de prévalences apparentes. Le groupe "autres" réunit les groupes d'espèces à moins de 30 individus, soit par ordre décroissant d'effectifs : *Picidés*, *Emberiza spp.*, *Sturnus vulgaris*, *Regulus spp.*, *Corvidés*, *Accipiter nisus*, *Charadriiformes*, *Alcedo atthis*, *Hirundinidés*, *Streptopelia decaocto*, *Phasianus colchicus*, *Asio otus* et *Upupa epops*. La prévalence chez les canards mulards est calculée à l'échelle du lot, c'est-à-dire réunissant écouvillons et environnement d'un même lot.

Espèces prélevées	Effectif (dont sérums)	Positifs en PCR				Positifs en ELISA	
		VIA	Avula-virus	Corona-virus	Chlamy-dia	VIA	Avula-virus
<i>Muscicapidés</i>	289 (159)	1 (0,35)	0	0	0	5 (3,14)	0
<i>Bubulcus ibis</i>	206 (1)	1 (0,49)	0	0	0	0	0
<i>Passer montanus</i>	206 (156)	0	0	0	1 (0,49)	2 (1,28)	0
<i>Passer domesticus</i>	199 (173)	2 (1,01)	0	0	0	1 (0,58)	0
<i>Fringillidés</i>	186 (45)	1 (0,54)	0	0	1 (0,54)	0	0
<i>Sylviidés</i>	169 (76)	2 (1,18)	0	0	2 (1,18)	5 (6,6)	0
<i>Aegithaloidés</i>	142 (0)	0	0	0	3 (2,11)	na	na
<i>Paridés</i>	133 (37)	0	0	0	0	0	0
<i>Turdidés</i>	117 (100)	0	0	0	0	3 (3,0)	2 (2,0)
<i>Motacilla spp.</i>	91 (58)	1 (1,1)	0	0	2 (2,2)	5 (8,6)	1 (1,7)
<i>Certhioidés</i>	37 (7)	0	0	0	0	0	0
<i>Prunella modularis</i>	35 (30)	0	0	0	0	3 (10,0)	0
<i>Anthus spp.</i>	33 (22)	1 (3,0)	0	0	0	0	1 (4,5)
<i>Autres</i>	93 (46)	0	0	0	0	1 <i>Accipiter nisus</i> (25)	0
Total avifaune	1936 (910)	9 (0,46)	0	0	9 (0,46)	25 (2,75)	4 (0,44)
Lots de canards	17 (23 pour VIA)	9 (39)	0	5 (29)	8 (47)	na	