

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 bache 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 0,22 µm. 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 Columbides, 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 écouillons 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 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).

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. Épidémiologie 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. Épidémiologie 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, Thébaud A, Poisson S, Cléva D, Robineau J, et al. 2015. Pathog. Dis. 73(1):1–9

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.

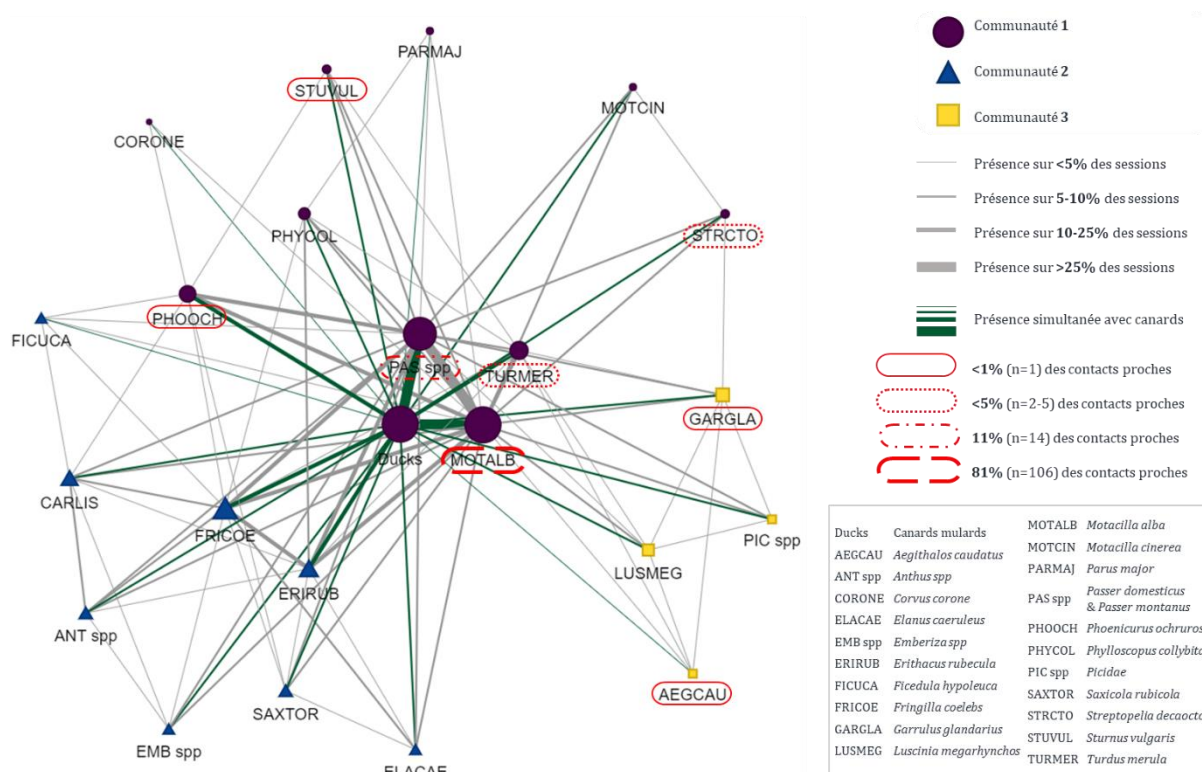


Tableau 1. Résultats des analyses PCR et ELISA par groupes d'espèces. Les groupes en gras sont ceux également observés en présence de canards sur l'étude écologique. Entre parenthèses sont indiqués les pourcentages de prévalences apparentes. Le groupe "autres" réunit les groupes d'espèces à moins de 30 individus, soit par ordre décroissant d'effectifs : *Picidés*, *Emberiza spp.*, *Sturnus vulgaris*, *Regulus spp.*, *Corvidés*, *Accipiter nisus*, *Charadriiformes*, *Alcedo atthis*, *Hirundinés*, *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		Positifs en PCR				Positifs en ELISA	
Groupe	Effectif (dont sérums)	VIA	Avula-virus	Corona-virus	Chlamy-dia	VIA	Avula-virus
Muscicapidés	289 (159)	1 (0,35)	0	0	0	5 (3,14)	0
Bubulcus ibis	206 (1)	1 (0,49)	0	0	0	0	0
Passer montanus	206 (156)	0	0	0	1 (0,49)	2 (1,28)	0
Passer domesticus	199 (173)	2 (1,01)	0	0	0	1 (0,58)	0
Fringillidés	186 (45)	1 (0,54)	0	0	1 (0,54)	0	0
Sylviidés	169 (76)	2 (1,18)	0	0	2 (1,18)	5 (6,6)	0
Aegithaloidés	142 (0)	0	0	0	3 (2,11)	na	na
Paridés	133 (37)	0	0	0	0	0	0
Turdidés	117 (100)	0	0	0	0	3 (3,0)	2 (2,0)
Motacilla spp.	91 (58)	1 (1,1)	0	0	2 (2,2)	5 (8,6)	1 (1,7)
Certhioidés	37 (7)	0	0	0	0	0	0
Prunella modularis	35 (30)	0	0	0	0	3 (10,0)	0
Anthus spp.	33 (22)	1 (3,0)	0	0	0	0	1 (4,5)
Autres	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	