



**HAL**  
open science

# De l'approche corrélative à l'expérimentation : impact de l'urbanisation et des cocktails de polluants sur l'écologie et la physiologie des oiseaux

Agnès Saulnier

## ► To cite this version:

Agnès Saulnier. De l'approche corrélative à l'expérimentation : impact de l'urbanisation et des cocktails de polluants sur l'écologie et la physiologie des oiseaux. Médecine humaine et pathologie. Université de Strasbourg, 2022. Français. NNT : 2022STRAJ015 . tel-03719610

**HAL Id: tel-03719610**

**<https://theses.hal.science/tel-03719610v1>**

Submitted on 11 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.

ECOLE DOCTORALE Vie et Santé (ED414)

IPHC, Département Ecologie, Physiologie & Ethologie (UMR 7178)

**Thèse** présentée par :

**Agnès Saulnier**

Soutenue le : **08 Avril 2022**

Pour l'obtention du grade de : Docteur de l'université de Strasbourg

Discipline : Science du Vivant

Spécialité : Ecophysiologie et Ecotoxicologie

---

**De l'approche corrélative à l'expérimentation :  
Impact de l'urbanisation et des cocktails de polluants  
sur l'écologie et la physiologie des oiseaux**

---

THESE dirigée par :

Dr. MASSEMIN Sylvie

Maître de conférences, Université de Strasbourg

Et Co-Encadrée par :

Dr. BLEU Josefa

Maître de conférences, Université de Strasbourg

RAPPORTEURS EXTERNES :

Pr. GASPARINI Julien

Professeur, Sorbonne Université, Paris

Pr. VOITURON Yann

Professeur, Université de Lyon 1

EXAMINATRICE INTERNE

Dr. HABOLD Caroline

Directrice de recherche CNRS, IPHC-DEPE, Strasbourg



# Remerciements

---

Alors que ce travail s'achève il est temps pour moi de remercier l'ensemble des personnes qui ont contribué à faire de cette thèse (et de ce manuscrit) plus qu'une possibilité mais belle et bien une réalité.

Bien entendu mes premiers remerciements vont à mes encadrantes de thèse, Sylvie et Josefa qui m'ont accordé leur confiance pour mener à bien ce projet et qui ont été d'un encouragement et d'un optimiste sans faille quand parfois j'en manquais face aux aléas de la recherche. Sylvie, si on m'avait dit en 2015 que ce stage (ou plutôt cette épreuve du feu) me mènerait là où j'en suis aujourd'hui je ne l'aurais probablement pas cru. Merci de m'avoir donné ma chance à l'époque, tu m'as fait découvrir le monde de la recherche, l'écologie mais surtout la réalité du terrain. Josefa, une fois n'est pas coutume je vous vouvoierais dans ces remerciements pour vous témoigner tout le respect que j'ai pour vous. Un grand merci pour tous ces échanges scientifiques et personnels et vos conseils avisés. Tu as été d'une incroyable patience face à mes questionnements statistiques incessants et mes remises en question méthodologiques. Mon seul regret est de ne pas avoir vu les terribles WASP écraser le Captain Jo lors d'un duel au sommet !

Je remercie mon jury de thèse, Yann Voituron, Julien Gasparini et Caroline Hibold, qui ont accepté d'accorder de leur temps pour relire et juger ce travail. Caroline, merci de m'avoir accueilli au DEPE pendant toutes ces années.

Je remercie également les membres de mon comité de suivi de thèse, Bruno Faivre, Renaud Scheifler et Yves Handrich pour leur graaaande patience quand je partais dans tous les sens et de la bienveillance de leurs conseils.

Ce travail de thèse n'aurait pas pu être ce qu'il est sans l'aide de Sandrine, merci pour avoir partagé avec-moi ton incroyable savoir et de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux, que dis-je fabuleux de la biologie moléculaire. Merci pour tes anecdotes, pour ta bonne humeur et de m'avoir rappelé de penser à manger quand j'oubliais ! Merci d'avoir été une oreille attentive à mes questionnements et une source de conseils inépuisable et merci d'avoir été partante dans tous mes projets scientifiques farfelus.

Merci également aux chimistes : merci Anne, Pascale et Islah de m'avoir initié aux arts mystiques de l'ICP-MS et d'avoir été d'une grande aide pendant mes manips, face aux cocktails récalcitrants et pour l'écriture de mes manuscrits. Merci à Mireille, Maurice et Emilio également pour avoir répondu présents lors de l'écriture des manuscrits et leurs précieux conseils.

De manière générale, je souhaiterais remercier l'ensemble des personnes du DEPE qui m'ont accueillies les bras ouverts durant ces années de thèse. Merci à François pour les jeux de plateaux dont je n'ai toujours pas compris les règles (ni quels étaient mes pions). Merci également à la (dream) team mésange, Pierre et Gildas et l'ensemble des personnes qui ont contribué à collecter les données mésanges sur le terrain sans lesquelles ce travail n'aurait pas pu se faire. Je tiens également à remercier les animaliers, Aurélie et David, et Hélène pour leur aide avec les diamants mandarins, sans votre aide je serais probablement encore dans une courette à courir après les oiseaux avec mon épuisette. Merci à Asltolfo pour m'avoir aidé pour la mesure du

métabolisme chez le diamant, et pour tes conseils et ton aide sur les manips, mais également pour nos grandes discussions sur les techniques d'aquarelles. Je suis toujours aussi nulle mais j'ai la chance de pouvoir admirer certaines de tes œuvres tous les jours ! Merci JP pour tes BOOOONJOUR dans toutes les langues et tes jeux de mots indéchiffrables. Merci à Nico et Robin, Cédric et Marie pour les déjeuners partagés, la TEAM ADAGE pour les réunions d'équipe/goûters, et à tous les autres, Alex et Isabelle pour leur aide pour la calo et mes manips, ... Merci également à la « force vive » du DEPE pour les moments de bonne humeur, de tournages ratés et réussis, de pique-niques sur l'herbe et d'olympiade épique.

Un grand merci aux colocs du plus beau bureau du Labo ! Lison et Antonin, vous savez à quel point je suis ingrate et asociale et que ces mots me coûtent. Antonin merci pour ta bonne humeur et ta mauvaise humeur parfois, ta ribambelle de stagiaires et les truffes au chocolat belge. En revanche je ne te remercie pas pour les grillons de l'enfer. Vous voir vous disputailier avec Lison a été une grande source de divertissement. Lison, après deux ans dans le même master il a fallu une thèse pour qu'on apprenne à se connaître ! Merci pour nos discussions existentielles et de m'avoir aidé à garder le cap pendant l'écriture de ce manuscrit ! Et je tiens également à te remercier de m'avoir introduite au monde fascinant de la mycologie.

Un grand merci à ma famille pour leur soutien inconditionnel durant toutes ces années, merci à mes parents de m'avoir permis de faire de longues études, si j'en suis là c'est grâce à vous. Alors effectivement parfois je sais que vous ne comprenez pas toujours ce que je fais, mais au moins j'ai le mérite de vous faire rire quand je vous parle de mon terrain. Merci à mon « petit » frère d'1m95 pour sa bonne humeur perpétuelle et oui promis je viens à Lyon dès que j'ai fini ! Merci à ma famille étendue, à mes amis, Nadège surtout, tu as été une bouée de sauvetage lors de mes moments de doutes et mes coups de mou.

Enfin, je me dis souvent que si j'en suis là aujourd'hui c'est dû à un peu de travail et à beaucoup de chance, la chance d'avoir rencontré des gens géniaux qui ont contribué à faire de moi celle que je suis aujourd'hui. Ma plus grande chance c'est toi Jul'. Parfois j'aimerais me voir avec tes yeux, merci pour toutes ces années, merci pour tes encouragements et ton soutien et surtout de m'avoir nourri pendant l'écriture de ce manuscrit. Banane.

La liste de ces remerciements est loin d'être exhaustive et à tous ceux que je n'ai pas cité, premièrement je suis désolée, et deuxièmement je vous adresse un profond et sincère Merci !

# Table des matières

---

<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des publications et communications</b> .....	<b>7</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>9</b>
1. L'urbanisation et ses caractéristiques.....	11
1.1. L'écologie urbaine, une discipline en expansion .....	11
1.2. Le milieu urbain, un milieu profondément transformé.....	12
1.3. Le cas particulier des polluants chimiques .....	13
2. Urbanisation et faune sauvage .....	18
2.1. Urbanisation et traits d'histoire de vie.....	19
2.2. Urbanisation et traits physiologiques.....	20
2.3. Urbanisation et traits morphologiques.....	25
3. Urbanisation, pace-of-life et qualité individuelle .....	26
4. Les limites des études corrélatives et l'importance de l'approche expérimentale.....	29
5. Présentation de cette étude .....	30
<b>Méthodes générales</b> .....	<b>35</b>
1. Modèles d'études.....	37
1.1. La mésange charbonnière, une espèce « modèle ».....	37
1.2. Le diamant mandarin, un « rat de laboratoire » à plumes .....	39
2. Approches corrélatives en milieu urbain.....	40
2.1. Présentation des sites d'étude .....	40
2.2. Caractérisation des sites d'études.....	42
3. Approches expérimentales en laboratoire .....	47
3.1. Conditions de captivité et conditions expérimentales.....	47
3.2. Choix des cocktails de métaux .....	48
4. Paramètres physiologiques étudiés .....	50
4.1. Mesure du statut oxydatif.....	50
4.2. Mesure des télomères .....	52
5. Autres paramètres mesurés .....	52
5.1. Métabolisme de repos et quotient respiratoire.....	52
5.2. La couleur du bec : .....	53
5.3. Test de performance de vol.....	54

<b>PARTIE 1 – APPROCHES CORRELATIVES : Impact de l’urbanisation sur la reproduction et la physiologie de la mésange charbonnière (<i>Parus major</i>)</b> .....	<b>57</b>
<b>Chapitre 1: Différences écologiques interannuelles entre ville et forêt : importance des paramètres environnementaux et météorologiques</b> .....	<b>59</b>
Résumé.....	59
Manuscrit 1 .....	60
<b>Chapitre 2 Conséquences physiologiques de la vie en ville de la naissance à la reproduction : études des variations interannuelles et du rôle de filtre du milieu urbain sur la qualité des individus</b> .....	<b>89</b>
2.1. Variations interannuelles des différences physiologiques entre mésanges urbaines et forestières .....	89
Résumé.....	89
Manuscrit 2 .....	90
2.2. Le milieu urbain exerce-t-il un rôle de filtre sur la qualité des individus ?.....	115
Résumé.....	115
Manuscrit 3.....	116
BOX1 .....	133
<b>Discussion partie 1</b> .....	<b>139</b>
<b>PARTIE 2 – APPROCHES EXPERIMENTALES : Impact des cocktails de micropolluants sur la physiologie du diamant mandarin (<i>Taenopygia guattata</i>)</b> .....	<b>147</b>
<b>Chapitre 3 Conséquences de l’exposition à de cocktails d’éléments traces métalliques représentatifs de l’exposition urbaine chez le diamant mandarin et rôle de la supplémentation en calcium</b> .....	<b>149</b>
3.1) Conséquences de l'exposition à un cocktail de métaux traces chez le diamant mandarin ( <i>Taenopygia guttata</i> ) et effet d'une supplémentation en calcium.....	149
Résumé.....	149
Manuscrit 4 - .....	150
3.2) Evaluation des conséquences de différents cocktails de métaux sur la physiologie des oiseaux.....	161
<b>Discussion partie 2</b> .....	<b>173</b>
<b>Discussion générale</b> .....	<b>181</b>
<b>Bibliographie</b> .....	<b>185</b>
<b>Annexes</b> .....	<b>219</b>
Annexe manuscrit 1 .....	221
Annexes manuscrit 2 .....	231
Annexes manuscrit 4 .....	236

# Liste des publications et communications

---

## Publications

### ❖ Article publié dans des revues internationales avec comité de lecture :

- **Saulnier, A.**, Bleu, J., Boos, A., El Masoudi, I., Ronot, P., Zahn, S., Del Nero, M. and Massemin, S. 2020. Consequences of trace metal cocktail exposure in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) and effect of calcium supplementation. - *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 193: 110357. (manuscrit 4)
- **Saulnier, A.**, Bleu, J., Lemonnier, G., Uhlrich, P., Zahn, S. and Massemin, S. 2022 Does the urban environment act as a filter on the individual quality of birds? *Birds* 3:84-98, Special issue « Feature paper of bird 2021 » (manuscrit 3)

### ❖ Articles en révision, soumis ou en cours de préparation

- **Saulnier, A.**, Bleu, J., Boos, A., Millet, M., Zahn, S., Ronot, P., El Masoudi, I., Del Nero, M. and Massemin, S. Reproductive differences between urban and forest birds across the years: importance of environmental and weather parameters. *Version en revision dans Urban Ecosystem* (manuscrit 1)
- **Saulnier, A.**, Bleu, J., Boos, A., Millet, M., Zahn, S., Ronot, P., El Masoudi, I., Del Nero, M. and Massemin, S. Inter-annual variation of physiological differences between urban and forest great tits. Version prête pour soumission dans *Comparative Biochemistry & Physiology : Part A* (manuscrit 2)
- **Saulnier, A.**, Massemin, S., Boos A., Mata, A., El Masoudi, I., Ronot, P., Zahn, S. and Bleu, J. Evaluation of physiological consequences of different metal cocktails in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*) (en *préparation*) (chapitre 3.2)
- **Saulnier, A.**, Bleu, J., Humann S., Mata, A., Lemonnier, G., Uhlrich, Zahn, S. and Massemin, S. Urbanisation et qualité spermatique chez la mésange charbonnière (en *préparation*) (Box 1)

## Communications scientifiques

### ❖ Congrès et séminaires

- Congrès EICTUS-2019 (European International Conference on Transforming Urban Systems) (Strasbourg, juin 2019): Poster, Saulnier, A., Bleu, J., Boos, A., El Masoudi, I., Ronot, P., Zahn, S., Del Nero, M. and Massemin, S. "Effects of trace metal elements cocktail on physiological stress in a passerine bird"
- Mini-Symposium of DEPE PhD Students (Strasbourg, Octobre 2018): Communication orale, Saulnier A., «Study of the ecotoxicological effects of micropollutant cocktails on birds using experimental and correlative approaches»
- Rencontres scientifiques IPHC/MARBEC « Mélanger pour mieux innover » (Strasbourg, Mars 2019) : Communication orale, Saulnier, A. & Massemin, S « De l'approche corrélatrice

à l'expérimentation : le cas de l'impact du gradient d'urbanisation sur l'écologie et la physiologie des oiseaux »

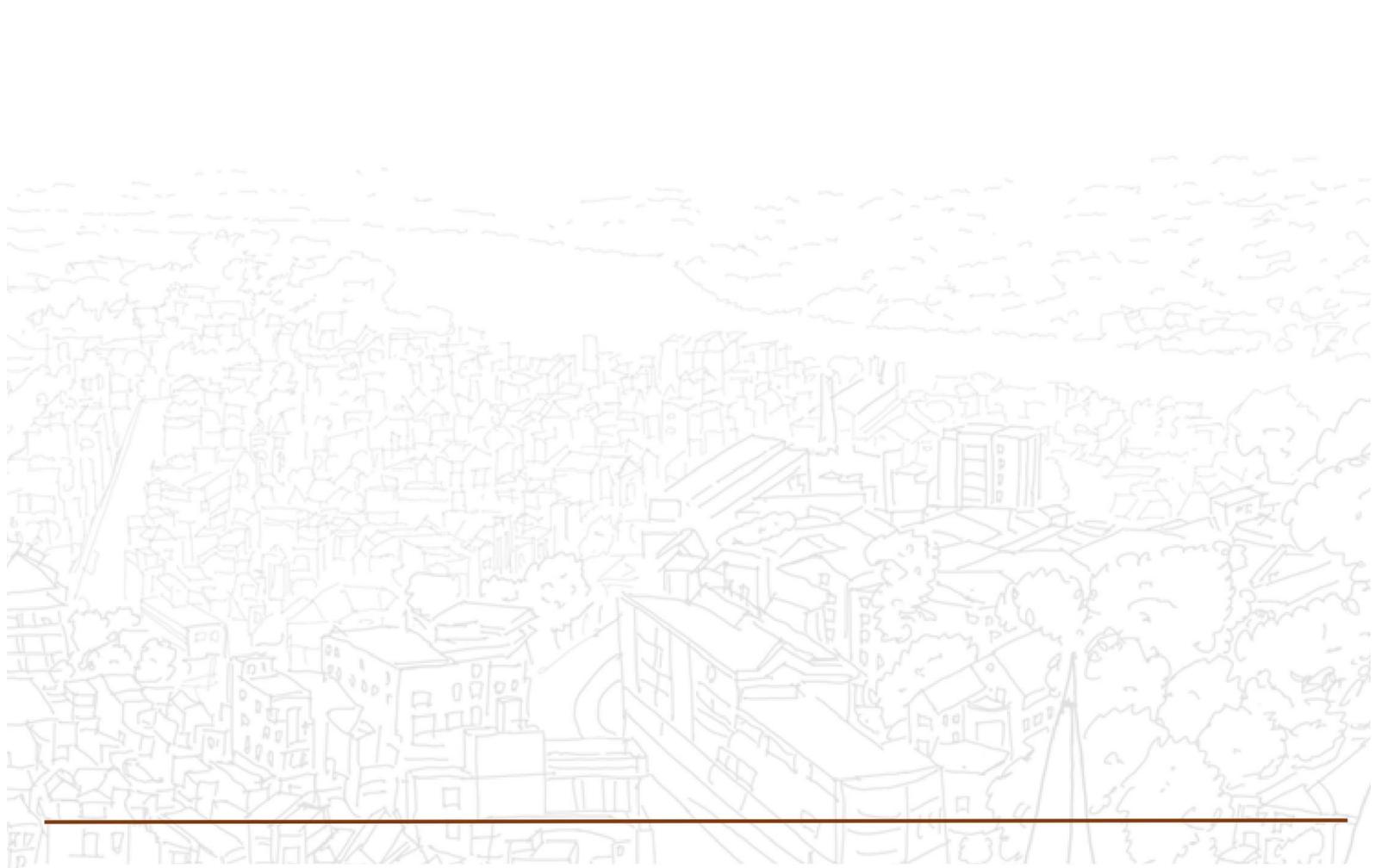
- 4ème colloque d'écophysiologie animale (Renne, Octobre 2019) : Communication orale, Saulnier, A., Bleu, J., Lemonnier, G., Uhlrich, P., Zahn, S. and Massemin, S. « Le milieu urbain exerce-t-il un rôle de filtre sur la qualité des individus »

❖ **Workshop**

- Parid meeting 2020 (Paris) « Does the urban environment act as a filter on the quality of individuals? »

### Communication grand public

- In Situ n°22 ZAEU : Massemin S., Saulnier A., Goury S., Bleu J., Lemonnier G., Uhlrich P. (In prep) « Urbanisation et qualité spermatique de la mésange charbonnière »



---

# INTRODUCTION

---





## 1. L'urbanisation est ses caractéristiques

### 1.1. L'écologie urbaine, une discipline en expansion

Alors que la population humaine mondiale ne cesse de croître, aucun écosystème ne semble épargné par la présence de l'Homme (Vitousek et al., 1997) et l'urbanisation est une des formes les plus extrêmes de transformation des habitats par les activités humaines. L'urbanisation se caractérise par un processus de densification de la population humaine et des structures associées aux activités de l'Homme (Johnson and Munshi-South, 2017). Ce processus de transformation irréversible des habitats ne cesse de s'accélérer chaque année avec l'augmentation de la population mondiale, et touche l'ensemble de la planète (Nations Unies 2018). Alors qu'en 1900 seulement 10% de la population humaine vivait en ville, on estime que ce chiffre atteint plus de 55% à l'heure actuelle. En France, ce chiffre monte même jusqu'à 81% en 2020 (INSEE 2020). Les changements environnementaux irréversibles qui en découlent bouleversent complètement les écosystèmes obligeant les espèces à s'adapter rapidement au remaniement total de leurs milieux de vie et à la présence omniprésente de l'Homme.

Malgré cette évidente transformation des écosystèmes, les premières considérations de l'impact de l'homme sur la nature sont relativement récentes et ne remontent qu'aux années 50-60 (McDonnell, 2011) avec notamment la publication de premières études démontrant l'impact des activités humaines sur les changements climatiques globaux et la production de CO<sub>2</sub> atmosphérique (Weart, 2003). Mais les habitats urbains étaient très peu étudiés, les villes étant considérées comme des écosystèmes morts et la présence d'animaux considérée comme fortuite ou transitoire (Sukopp, 1998). Ainsi, les scientifiques ne considéraient pas ces écosystèmes comme sujets de recherches légitimes (McDonnell, 2011; Miller and Hobbs, 2002). Il faudra attendre les années 90 pour voir une véritable reconnaissance de l'impact de l'Homme et de l'urbanisation sur les changements globaux, avec notamment la publication du premier rapport du GIEC (Groupe d'expertise intergouvernemental sur l'évolution du climat). Mais surtout, les années 90 voient également l'essor de l'écologie urbaine avec les premières études sur la distribution et l'abondance des organismes et la composition des communautés urbaines (Shochat et al., 2006). Puis, lors des années 2000, émergent des études mécanistiques visant à comprendre comment le milieu urbain impacte le fonctionnement des écosystèmes et la faune sauvage d'un point de vue comportemental, physiologique ou encore génétique (McDonnell 2011 ; Thompson et al. 2022).

L'étude des écosystèmes urbains est pourtant essentielle pour déterminer les facteurs de pressions anthropiques exercés sur la biodiversité et les mécanismes sous-jacents impactant la dynamique des populations, car ils représentent la forme la plus extrême des changements environnementaux liés à l'Homme (Likens, 1992). Les zones urbaines peuvent même être considérées comme un enjeu prioritaire pour le maintien de la biodiversité, empiétant chaque jour sur les habitats qui concentrent une part importante de la biodiversité (Barthlott et al. 1999, Pimentel et al. 1992). Selon une étude de McDonald (McDonald et al., 2008), l'urbanisation était impliquée dans le référencement d'au moins 8% des espèces sur liste rouge de l'IUCN (International Union for the Conservation of Nature) et ce chiffre augmente chaque année.

L'écologie urbaine a également une dimension sociétale, car la transformation du territoire s'est faite au prix de nombreux services écosystémiques. Les services écosystémiques désignent « l'ensemble des avantages fournis aux sociétés humaines par les écosystèmes naturels » (Daily et al., 1997). Une meilleure compréhension de la dynamique des écosystèmes urbains permet de réellement proposer des solutions aux décideurs, (Shochat, 2004) qui seront incluses dans les démarches d'urbanisme et le management des villes, contribuant à une restauration partielle de ces services écosystémiques en ville. Ce qui à long terme peut ainsi améliorer la qualité de vie des populations humaines (Miller, 2006).

### 1.2. Le milieu urbain, un milieu profondément transformé

Les écosystèmes urbains sont des systèmes complexes dans lesquels les caractéristiques biotiques et abiotiques sont modifiées au cours du temps par la densification des activités humaines (Dow, 2000). Bien entendu, l'intensité de l'urbanisation et la transformation des écosystèmes peuvent varier d'une ville à une autre et sera dépendante de paramètres tels que l'âge de la ville, les niveaux de développement et de richesse des populations qui y vivent, sa situation géographique, mais également l'historique des plans d'aménagement urbain (Dow, 2000). Néanmoins, certaines caractéristiques communes semblent émerger d'une ville à une autre, caractéristiques qui pourront être tour à tour bénéfiques ou néfastes à la biodiversité urbaine.

L'une des caractéristiques les plus marquées de l'habitat urbain est l'artificialisation du milieu. La construction des structures anthropiques telles que des bâtiments ou la voirie se font au détriment des espaces naturels et agricoles et ont pour seule vocation de pourvoir aux besoins des Hommes. Cette matrice artificielle conduit à une fragmentation importante des habitats, pouvant engendrer un isolement de certaines populations végétales et animales. Effectivement, le milieu urbain est caractérisé par une forte hétérogénéité spatiale : les habitats favorables à la flore et à la faune en ville ne sont alors présents que sous forme d'îlots séparés les uns des autres par des surfaces minéralisées (Davis and Glick, 1978), qui entravent considérablement le déplacement des individus. Cette fragmentation a donc un impact considérable chez les espèces à faible capacité de dispersion, la distance séparant deux patchs d'habitat favorable pouvant parfois être plus grande que leur capacité de dispersion (Johnson et al., 2017; Lizée et al., 2012). L'ensemble de ces structures anthropiques peuvent également constituer un risque de mortalité élevé pour la faune urbaine, avec par exemple des risques de collision avec les buildings pour les oiseaux (Nichols et al., 2018) et une augmentation des collisions avec les voitures chez les amphibiens et les mammifères (Coffin, 2007). Les habitats favorables étant rares, ils sont également soumis à une forte compétition pour l'accès aux ressources, comme les meilleurs sites de nidification chez les oiseaux (Han et al., 2019; Shochat et al., 2015a). Les espaces verts urbains, qui constituent souvent l'habitat le plus proche des habitats naturels en ville, sont également profondément transformés. Ces espaces sont souvent l'objet d'une gestion extensive, les communautés végétales étant surtout constituées d'espèces ornementales et exotiques offrant une qualité et une quantité de ressources réduites. Ce remaniement des communautés végétales peut affecter l'ensemble des niveaux trophiques supérieurs (Castro-Díez et al., 2016; Jesse et al., 2020) à commencer par les communautés d'invertébrés (Fenoglio et al., 2020).

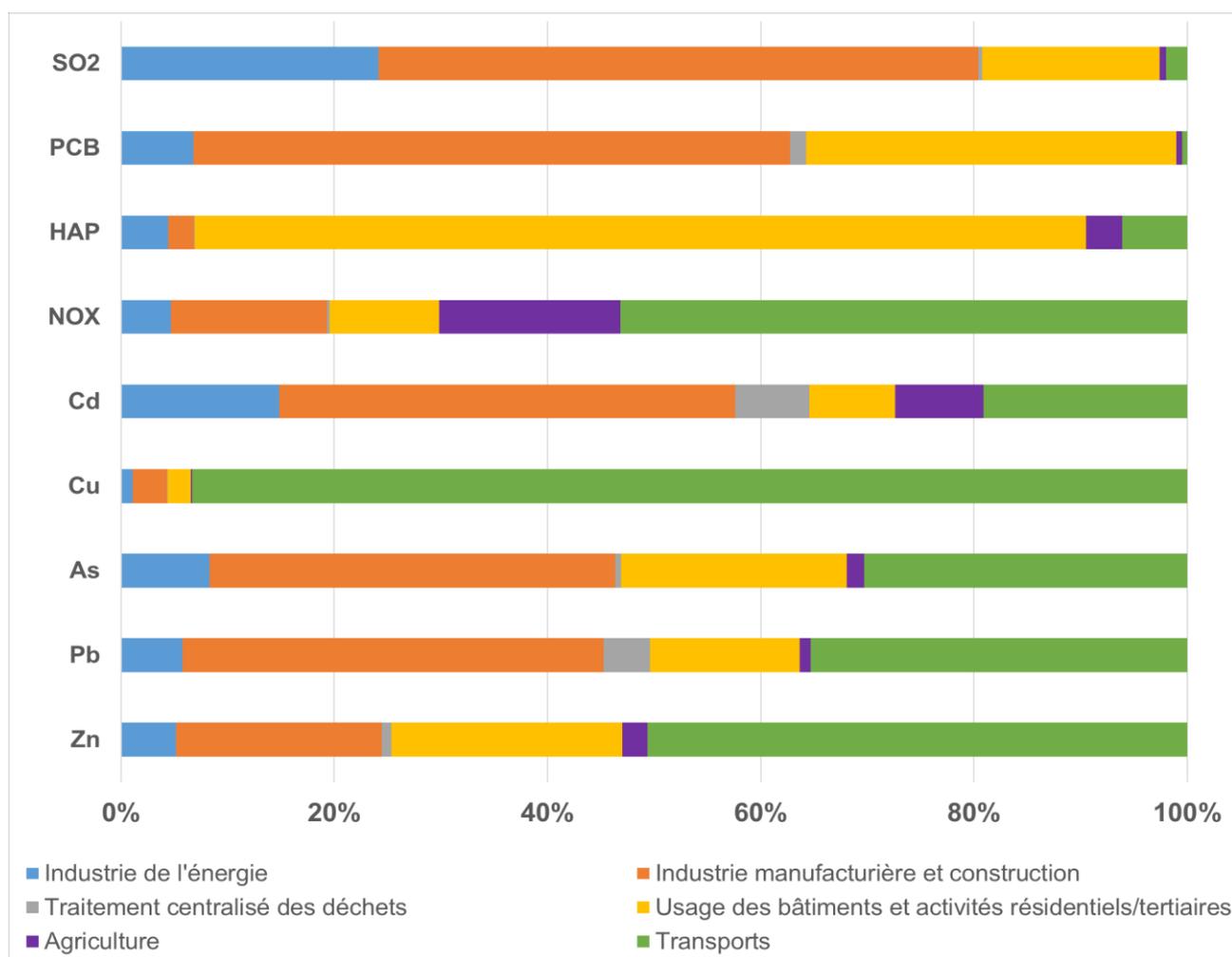
Mais tandis que la qualité/quantité des ressources végétales entraîne une chute des populations d'invertébrés, le milieu urbain offre à contrario une source inépuisable de nourriture d'origine anthropique, via la distribution volontaire de nourriture (*e.g.* mangeoire, distribution de pain) ou la présence de nombreux déchets. Cette nourriture anthropique constitue un apport au régime alimentaire de nombreuses espèces d'oiseaux, *e.g.* la mésange bleue *Cyanistes caeruleus* (Robb et al., 2008), et de mammifères, *e.g.* le renard *Vulpes vulpes*, (Handler et al., 2020) surtout pendant l'hiver. La nourriture anthropique est plus prévisible et souvent en plus grande quantité que la nourriture naturelle, mais sa présence est à double tranchant. D'une part, elle contribue à augmenter la productivité chez certaines espèces (Evans and Gawlik, 2020a; Harrison et al., 2010; Robb et al., 2008), voire à diminuer la pression de prédation, notamment la prédation au nid chez les oiseaux, en modifiant les relations prédateurs-proies par l'apport de ressources alternatives (Rodewald et al., 2011; Stracey, 2011). Mais, d'autre part, elle est souvent de moins bonne qualité que le régime naturel et peut générer des carences nutritionnelles (*e.g.* protéines, minéraux et acides gras essentiels) qui sont susceptibles d'impacter négativement la santé des individus (Bailly et al., 2017; Jarrett et al., 2020).

Le milieu urbain se caractérise également par une modification importante des caractéristiques abiotiques du milieu qui peuvent entraîner des répercussions plus ou moins négatives sur la faune urbaine. Par exemple, les spots lumineux et autres éclairages artificiels sont susceptibles d'attirer de nombreux insectes, facilitant leur capture par leurs prédateurs (Longcore and Rich, 2004). Mais, la pollution lumineuse qui en découle, tout comme la pollution sonore également associée aux activités humaines peuvent être un vecteur de stress important pour de nombreuses espèces, perturbant leur rythme circadien, la communication (p. sonore : Kempenaers et al., 2010; p.lumineuse : Leonard and Horn, 2012) , le comportement de recherche alimentaire (p.sonore : Quinn et al., 2006; p.lumineuse : Titulaer et al., 2012) ou encore leur reproduction (p. lumineuse : Dominoni et al., 2013; Welbers et al., 2017 ; p. sonore : Halfwerk et al., 2011). Les structures artificielles et les activités anthropiques comme le trafic routier ou l'industrie sont également responsables de l'apparition de variations microclimatiques à l'échelle des villes. En effet, on observe le plus souvent une augmentation des températures ambiantes en ville et l'apparition d'un phénomène d'îlot de chaleur urbain (ICU). Le phénomène d'ICU désigne une augmentation localisée des températures en milieu urbain due aux propriétés radiatives des surfaces bétonnées (Roth, 2012). Cette augmentation de température présente un avantage non négligeable pendant l'hiver augmentant la survie des individus notamment chez les ectothermes (Kaiser et al., 2016). Mais en été et/ou dans les régions à climat tropical, cet ICU peut engendrer ou accroître un stress thermique chez la faune sauvage (Kappes et al., 2012; Kleerekoper et al., 2012). De plus, l'augmentation des températures, ainsi que d'autres variations comme une perturbation de la circulation de l'air ou une diminution de l'humidité ambiante, contribuent également à augmenter l'impact de la pollution en ville en conduisant à une stagnation des polluants dans l'atmosphère (Ulpiani, 2021) .

### 1.3. Le cas particulier des polluants chimiques

Le trafic routier, la combustion d'énergies fossiles, le chauffage domestique, les activités industrielles et de nombreuses autres activités anthropiques vont conduire au relargage de

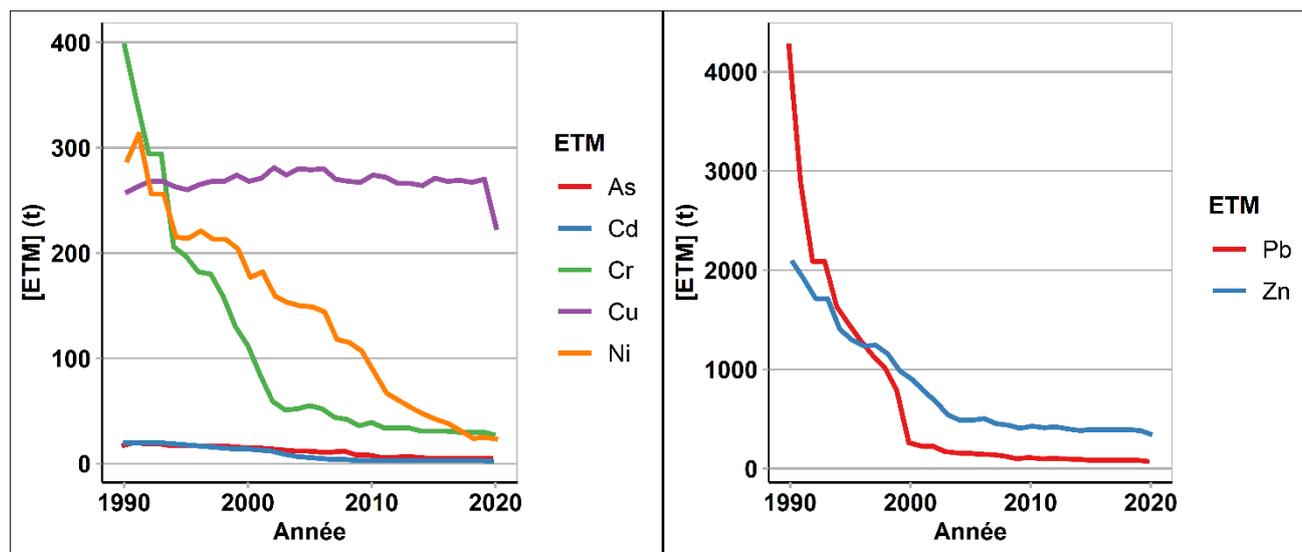
cocktails de polluants de différentes natures dans les écosystèmes (Fig.1). À titre d'exemple, les villes représentent seulement 2% de la surface du globe, pourtant elles sont responsables de la production de plus de 80% des gaz à effets de serre (Marzluff, 2001). Parmi les polluants majoritaires mesurés en ville, on trouve des polluants gazeux inorganiques tels que les oxydes d'azote (NO<sub>x</sub>) ou de soufre (SO<sub>x</sub>), des composés organiques volatils comme les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) ou des hydrocarbures halogénés, des polluants organiques persistants comme des polychlorobiphényle (PCB) ou les insecticides, et des éléments traces métalliques (ETM) comme le Pb, le Zn et le Cd et des métalloïdes comme l'As dont les sources sont extrêmement variées (Fig.1).



**Figure 1**- Sources d'émissions relatives des différents polluants dans l'environnement en 2020. Source CITEPA 2021

L'ensemble de ces polluants vont s'accumuler dans l'environnement et vont directement impacter la santé, la survie et la reproduction des organismes qui y seront exposés, l'Homme y compris (Jan et al., 2015). Les ETM représentent néanmoins une catégorie de polluants bien particulière. Les ETM, comme leur nom l'indique, sont naturellement présents à l'état de trace dans l'environnement et dans la croûte terrestre. Mais les activités anthropiques conduisent à

considérablement augmenter leurs concentrations environnementales. De plus, certains métaux tels que le Cu ou le Zn sont dits essentiels, c'est-à-dire qu'ils sont indispensables aux processus biologiques, le seuil de tolérance à leur exposition sera donc plus élevé, contrairement aux ETM et aux métalloïdes dits « non-essentiels » tels que le Pb, le Cd et l'As pour lesquels des taux d'expositions très faibles sont supportés. Par exemple, les valeurs seuils de toxicité chronique définies par l'OMS chez l'Homme pour le Cd et l'As sont de 0,001 mg.kg 1. j-1 et de 0,005 mg.kg-1. j-1 respectivement, alors que pour le Zn elle est de 0,3 mg.kg-1. j-1.

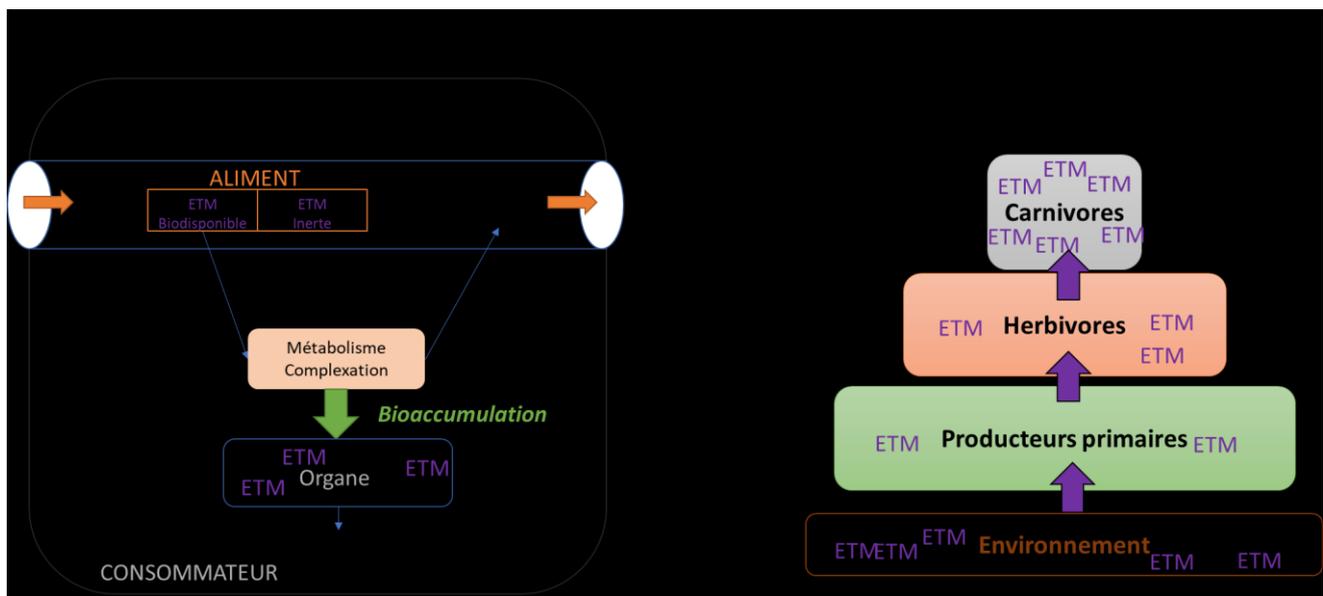


**Figure 2-** Evolution des émissions aériennes d'ETM en France métropolitaine entre 1990 et 2020 (en tonne).

Source : CITEPA 2021

Les taux d'émission de ces polluants ont considérablement diminué en ville avec l'amélioration des techniques industrielles, de l'automobile et les nombreuses directives françaises et européennes visant à interdire les composés les plus toxiques (CITEPA 2021, Fig. 2). Néanmoins, les concentrations dépassent très régulièrement les valeurs toxiques de références (valeurs au-dessus desquelles ces composés sont susceptibles d'induire des effets toxiques chez l'Homme)(CITEPA, 2021; Coudon et al., 2019). La plupart de ces polluants sont très persistants dans l'environnement du fait de leur forte stabilité et leur faible biodégradabilité. À titre d'exemple, de nombreux PCB ont un temps de demi-vie excédant des dizaines, voire des milliers d'années, ce qui fait que, malgré leur interdiction en France en 1987, ils sont toujours détectables dans l'air urbain (Coudon et al., 2019; Lévy et al., 2018). En revanche, les oxydes de soufre et d'azote sont beaucoup moins stables et ont un temps de demi-vie de seulement quelques heures (Ferm et al. 1998). La toxicité des polluants repose en partie sur leur biodisponibilité, c'est-à-dire leur capacité à être assimilé par les organismes vivants (Fig.3). Les polluants chimiques peuvent être assimilés par voie orale, aérienne et/ou percutanée plus ou moins efficacement selon le mode d'exposition. Par exemple, chez l'Homme, le taux d'absorption pulmonaire du chlorure de cadmium est presque de 100% alors que l'absorption intestinale de ce même composé est de l'ordre de 5% (INERIS 2014). La spéciation du composé, c'est-à-dire sa forme chimique (e.g l'état d'oxydation) et les molécules avec lesquelles il sera associé (e.g. carbonates

ou molécules organiques) joueront également un rôle dans son accumulation et sa toxicité. Par exemple, l'As sous forme organique (e.g. arsenobétaine et arsenolipides) est davantage assimilé que l'As inorganique, moins mobilisable dans l'environnement (Taylor et al., 2017). De plus, lorsque des composés tels que les PCB, les dioxines et les ETM sont assimilés, on peut observer des phénomènes de bioaccumulation (Fig. 3), c'est-à-dire une accumulation du composé chimique dans l'organisme, qui sera dépendant 1) de la forme du composé chimique et de sa capacité à diffuser à travers les membranes cellulaires ou à mobiliser les capacités de transport dans la cellule, 2) de leurs capacités d'accumulation dans certains organes spécifiques et 3) des cinétiques d'élimination de ces polluants (Franke et al., 1994). Par exemple, les ETM sous forme de cation tels que le  $Pb^{2+}$  et le  $Cd^{2+}$  vont interagir avec les métallothionéines, des protéines riches en cystéine, qui contribue au transport, à la régulation et à l'élimination des métaux. De plus, ces protéines étant majoritairement exprimées et produites dans le foie et les reins (Blalock et al., 1988; Jaishankar et al., 2014), les métaux vont avoir tendance à fortement s'accumuler dans ces organes. L'association de ces métaux avec le métabolisme du calcium entraîne également une augmentation de leur accumulation dans les os, surtout si l'exposition a lieu pendant l'ostéogenèse (Eeva and Lehtikoinen, 1996; Goyer, 1995; Six and Goyer, 1970).



**Figure 3** – Mécanismes de bioaccumulation et de bioamplification des ETM dans l'environnement.  
Figures adaptées de Amiard et al. 2011

Ce phénomène de bioaccumulation au sein des organismes va également engendrer une concentration de certains polluants le long des chaînes trophiques appelée bioamplification (Fig. 3), qui conduit à retrouver des concentrations plus élevées chez les prédateurs supérieurs. Les

polluants lipophiles tels que les DDT, les PCB ou le Hg font partie des polluants les plus bioamplifiés (Franke et al., 1994) mais on trouve également ce même phénomène pour certains métaux et/ou métalloïdes comme le Cd, le Cu, le Pb et l'As, notamment chez les oiseaux (Abbasi et al., 2015; Burger and Gochfeld, 2000).

Ainsi, avec les phénomènes de bioaccumulation et de bioamplification, un polluant détecté en faible concentration dans le milieu peut en réalité atteindre des valeurs très élevées dans les organismes, engendrant potentiellement des effets délétères pour leur santé. Au contraire, des fortes concentrations de polluants dans l'environnement ne sont pas forcément synonymes d'une toxicité accrue : si ce polluant est faiblement biodisponible, en étant présent par exemple sous une forme peu soluble ou associée à des composés les rendant inertes dans le sol, celui-ci ne rentrera pas dans la chaîne alimentaire et l'exposition des organismes sera relativement faible. Il est donc difficile de faire un lien entre la concentration d'un polluant mesurée dans l'environnement (air, eau, sols) et la concentration réelle à laquelle est exposé un organisme et la toxicité potentielle de ce polluant. Certains organismes, notamment les oiseaux, sont donc souvent utilisés en tant qu'espèces bioindicatrices concernant l'état de la pollution d'un milieu, car les concentrations relevées dans les tissus sont corrélées avec les concentrations des polluants biodisponibles mesurées dans la chaîne trophique. Par exemple, chez la mésange charbonnière, *Parus major*, les concentrations en Pb et en As mesurées dans les plumes et les fèces des poussins étaient corrélées positivement aux concentrations relevées dans les plantes et les proies prélevées sur le même site (Dauwe et al., 2004a; Eeva et al., 2020). En ville, le pigeon, *Columbia livia*, et le moineau, *Passer domesticus*, peuvent être utilisés comme espèces bioindicatrices pour la surveillance de la pollution urbaine (Dmowski, 1999; Herrera-Dueñas et al., 2014).

L'exposition aux polluants et l'augmentation de leurs concentrations dans les tissus auront des effets délétères pour la survie et la santé des organismes. Chez l'Homme, l'exposition aux polluants chimiques est un facteur reconnu dans l'apparition de nombreuses maladies telles que la maladie de Parkinson (Karri et al., 2016), les problèmes cardiovasculaires ou l'asthme (Lodovici and Bigagli, 2011). Chez l'oiseau, il a été montré que l'accumulation d'ETM non-essentiels dans les tissus peut également entraîner des lésions inflammatoires conduisant à des dysfonctionnements d'organes comme le rein et le foie (Koivula and Eeva, 2010), mais également diminuer le succès reproducteur en altérant la fonction des organes reproducteurs, ou la qualité des gamètes (Dauwe et al., 2004b; Vallverdú-Coll et al., 2016). La plupart des pathologies liées aux polluants qui sont observées chez l'Homme et l'animal sont d'ailleurs médiées par l'impact qu'ils peuvent avoir sur la balance oxydative des individus (détaillée plus loin) (Koivula and Eeva, 2010; Lodovici and Bigagli, 2011; Vos, 1972). Avec la bioaccumulation et la bioamplification, une exposition à de faibles concentrations de polluants, si elle est chronique, peut se révéler tout autant délétère à long terme pour l'organisme qui va les stocker qu'une exposition aiguë (Vos, 1972) .

## 2. Urbanisation et faune sauvage

Les caractéristiques biotiques et abiotiques du milieu urbain engendrent un véritable clivage chez les espèces qui sont confrontées à ce nouveau milieu. Ces espèces se divisent en 3 catégories : 1) les « urban exploiters », des espèces urbanophiles parfaitement adaptées à la vie en ville dont l'abondance augmente avec l'expansion des villes et qui sont dépendantes de la présence de l'Homme, 2) les « urban avoiders » qui seront complètement urbanophobes et dont les populations déclineront en ville, leur présence n'étant plus que sporadique en ville et liée à des phénomènes d'immigrations depuis le milieu naturel et 3) les espèces dites « urban adapters » présentes à la fois en ville et en milieu naturel, qui comme leur nom l'indique, s'adaptent au milieu urbain et peuvent en tirer profit sans pour autant en être dépendantes (Kark et al., 2007). L'urbanisation croissante des habitats engendre la disparition de nombreuses espèces natives de végétaux et d'animaux au profit d'espèces invasives ou exotiques qui sont les mêmes d'un site à l'autre, entraînant ainsi une homogénéisation biotique des communautés urbaines et une perte de la biodiversité globale (Ferenc et al., 2013; McKinney, 2006). Les espèces qui persistent en villes présentent généralement des caractéristiques similaires comme un régime alimentaire omnivore et opportuniste, une tolérance au stress et à la compétition ou encore une plus grande sédentarité (Crocchi et al., 2008; Francis and Chadwick, 2012; Patankar et al., 2021).

Chez les espèces qui persistent en ville et notamment chez les « urban adapter », on observe très souvent des différences phénotypiques entre les populations naturelles et les populations urbaines. Ces différences phénotypiques concernent tous les traits physiologiques, morphologiques et reproducteurs qui vont impacter l'histoire de vie des individus. Les traits d'histoire de vie désignent l'ensemble des événements importants au cours de la vie d'un individu, tel que sa vitesse de croissance, la taille et l'âge à maturité sexuelle, l'espérance de vie et les paramètres reproductifs, tels que la phénologie, la fréquence de reproduction et le nombre de jeunes produits. L'organisme faisant face à une disponibilité limitée en ressources (énergie, temps, nutriments) dans son environnement, il ne lui sera pas possible d'allouer à la fois de l'énergie ou du temps à sa croissance, sa reproduction et à sa survie (Stearns, 1976). À titre d'exemple, lorsqu'on augmente artificiellement l'effort reproducteur d'un individu, en manipulant la taille de nichée par exemple, on peut observer des conséquences négatives sur sa survie (Dijkstra et al., 1990). De la même manière, un challenge immunitaire provoqué par une exposition expérimentale à un xénobiotique entraîne des coûts somatiques plus importants et diminue le succès reproducteur d'un individu (Bonneaud et al., 2015). Il existe donc des relations négatives, ou compromis, entre les différents traits d'histoires de vie, comme l'énergie allouée à la maintenance somatique (e.g. maintien du statut oxydatif, mécanismes de réparations cellulaires, système immunitaire) et ceux associés à sa reproduction (e.g. le nombre de jeunes à l'envol, caractères sexuels secondaires).

Les différences de traits d'histoires de vies, de traits physiologiques et morphologiques liées à l'urbanisation sont observées chez de nombreux taxons. Mais leur interprétation est sujette à débat reflétant d'une part de potentiels mécanismes d'adaptations aux contraintes environnementales urbaines et d'autre part des conséquences négatives de l'exposition à ce

nouveau milieu pour la survie et la reproduction des individus. Les paragraphes ci-dessous illustrent certaines des différences phénotypiques qui peuvent exister entre les populations urbaines et naturelles chez les oiseaux, notre sujet d'étude, et les principales hypothèses qui semblent émerger pour expliquer ces différences. Une meilleure compréhension des mécanismes qui régissent ces différences phénotypiques pourrait fournir les clés nécessaires à l'endigement de la perte de biodiversité en ville.

### 2.1. Urbanisation et traits d'histoire de vie

L'impact du milieu urbain sur les traits d'histoire de vie des oiseaux se manifeste par une modification du succès reproducteur et de la phénologie des populations urbaines. La grande majorité des études indiquent une avancée de la reproduction en ville et des tailles de pontes plus petites (Chamberlain et al., 2009; Sepp et al., 2017). Le timing de la reproduction est crucial pour la réussite de la reproduction des individus, car il assure une synchronisation entre le pic de ressources et les besoins énergétiques des poussins (Visser et al., 2012, 2006). Cette synchronisation est dépendante des indices environnementaux comme la température ou la durée du jour (Charmantier et al., 2008; Visser et al., 2009). Mais les îlots de chaleurs urbains et les éclairages artificiels peuvent perturber la perception de ces indices environnementaux entraînant une potentielle désynchronisation pouvant réduire le succès reproducteur des individus. De manière générale, on observe également un succès reproducteur plus faible chez les populations urbaines, associé à une taille de ponte réduite et une diminution de la survie des poussins (Chamberlain et al., 2009). La taille de ponte plus faible observée en milieu urbain peut résulter d'un régime alimentaire sous-optimal en ville (Marciniak et al., 2007; Wawrzyniak et al., 2020, 2015a). Une réduction de la taille de ponte et de la taille de nichée peut également être considérée comme une optimisation de la reproduction, face à un environnement contraignant, les parents étant de toute manière dans l'incapacité d'élever plus de jeunes avec les ressources à disposition. De la même manière, l'asynchronie d'éclosion peut permettre un ajustement de la taille de nichée en réponse à la disponibilité alimentaire dans l'environnement à moindre coût pour les parents (Lack, 1954). Plus précisément, si les ressources se font rares les derniers poussins éclos, plus jeunes que leurs frères et sœurs, seront sous-nourris voir expulsés du nid au profit des poussins les plus vieux (Lebedeva, 1994). Mais si les ressources sont nombreuses, les parents accorderont un soin plus important à ces jeunes, qui pourront survivre, augmentant le succès reproducteur de parents (Hörak et al., 2002). Cependant, la réduction de la taille de nichée ne reflète pas nécessairement une diminution de l'effort reproducteur, elle peut aussi refléter un investissement différent dans la reproduction.

L'investissement parental dans la reproduction passe par la taille de nichée, mais aussi par la qualité des œufs produits et par les soins parentaux (incubation et élevage des jeunes). Il est possible que les adultes urbains allouent différemment leurs ressources en réduisant le nombre d'œufs et de descendants produits, mais en augmentant l'investissement accordé à chacun de ces descendants afin d'optimiser leur qualité et leur survie future (McNamara and Houston, 1996). Plusieurs études suggèrent en effet un meilleur soin parental chez les individus urbains (e.g chez la mésange charbonnière, Isaksson and Andersson, 2007 ; chez le merle noir, Ibáñez-

Álamo and Soler, 2010 ), mais elles ne font pas l'unanimité (Strasser and Heath, 2013; Titulaer et al., 2012). Au contraire, les contraintes environnementales peuvent altérer les comportements parentaux. La fragmentation de l'habitat peut par exemple entraîner un coût énergétique accru lié à la recherche alimentaire, mais également à une perte de coordination et à une diminution de la fréquence de nourrissage des poussins (Baldan and Ouyang, 2020) . Par ailleurs, en ce qui concerne la qualité des œufs, les femelles sont capables de moduler le poids des œufs et leur teneur en antioxydant, en hormones androgènes ou en acide gras ce qui peut entraîner des conséquences sur le développement des embryons (Giordano, 2014; Marshall and Uller, 2007; Ruuskanen and Hsu, 2018). Il a été montré que la qualité des œufs en ville était parfois plus faible qu'en milieu rural (Isaksson et al., 2008; Toledo et al., 2016), même si cela n'est pas systématiquement observé (Bailly et al., 2016). Finalement, si certaines études tendent à valider cette hypothèse avec un succès d'envol similaire, voir meilleur chez les poussins urbains (Sepp et al., 2017), la mortalité des poussins reste importante même avec une taille de ponte plus faible en ville (Chamberlain et al., 2009).

La disponibilité alimentaire est un facteur clé de la productivité des oiseaux en ville (Chamberlain et al., 2009; Seress et al., 2020; Sumasgutner et al., 2014). Chez des passereaux comme la mésange bleue ou la mésange charbonnière, les chenilles constituent des proies indispensables pour le développement des poussins (Naef-Daenzer et al., 2000). Or, une étude menée chez la mésange bleue a montré que ces proies ne représentaient plus que 44% du régime alimentaire des poussins urbains contre 81% en forêt (Jarrett et al., 2020). Mais d'autres contraintes environnementales comme l'exposition à la pollution chimique/lumineuse/sonore peuvent avoir un impact sur la santé des individus, conduisant à une mortalité accrue chez les poussins et à une diminution du succès reproducteur chez les adultes notamment en modulant le statut physiologique des individus.

### 2.2. Urbanisation et traits physiologiques

L'étude des traits physiologiques est indispensable pour comprendre les mécanismes de réponse et d'adaptation de la faune sauvage à un environnement contraignant (Chown and Gaston, 2008; Isaksson, 2015). De manière intéressante, les réponses physiologiques des individus urbains sont très contrastées et semblent dépendantes de la ville, de l'étude ou de l'espèce considérée. Par exemple, dans certaines études chez le moineau domestique, on observe une augmentation des niveaux de corticostérone (une hormone du stress) avec le degré d'urbanisation du milieu (e.g. Beaugeard et al., 2019) alors que d'autres présentent au contraire peu de différences entre les populations urbaines et rurales (Bókony et al., 2012; Meillère et al., 2016), les individus semblant tolérer de plus grands niveaux de dérangement. On observe également des phénomènes similaires pour d'autres traits physiologiques tels que l'immunité ou le statut oxydatif des individus (Sepp et al., 2017). Certaines études montrent peu d'effets du milieu urbain sur le statut oxydatif des individus (Isaksson 2010; Giraudeau and McGraw 2014 chez le Roselin familial *Haemorrhous mexicanus*; Salmón et al. 2018a chez la mésange charbonnière) tandis que d'autres semblent présenter des effets marqués (Herrera-Dueñas et al., 2014 chez le merle *Turdus merula*; Giraudeau et al., 2015 chez le Roselin familial).

Le statut oxydatif en particulier semble être un marqueur clé pour comprendre l'impact des facteurs de stress urbains sur la santé des individus, mais également comment ceux-ci parviennent à s'adapter à la vie en ville (Isaksson, 2015). L'oxygène et le métabolisme oxydatif mitochondrial sont essentiels au fonctionnement des cellules eucaryotes et la survie des individus. Mais, lorsqu'il est dérégulé, ce même métabolisme peut également conduire à des problèmes de santé et impacter la survie et la reproduction des individus (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009). Le statut oxydatif d'un individu est donc un marqueur important concernant son état de santé à un temps donné, et à une échelle temporelle plus grande, son espérance de vie (Bize et al., 2008; Pamplona and Costantini, 2011; Sild, 2011).

### *Mécanismes du stress oxydatif*

Le statut oxydatif résulte d'un équilibre entre les espèces réactives pro-oxydantes et les antioxydants dont le rôle est de neutraliser ces espèces réactives. Ces espèces réactives pro-oxydantes sont des molécules chimiques dérivées de l'oxygène (espèces réactives de l'oxygène ou ERO) ou d'autres éléments par exemple l'azote (espèce réactive de l'azote ou NRS). Certaines de ces espèces sont qualifiées de radicaux libres, comme l'anion super oxyde ( $^{\circ}\text{O}_2^-$ ) ou le radical hydroxyle ( $^{\circ}\text{OH}$ ), et se caractérisent par la présence d'un ou plusieurs électrons non appariés ce qui les rend extrêmement instables et hautement réactives (Limón-Pacheco and Gonsebatt, 2009). Mais parmi les ERO, on compte également des molécules oxydantes non-radicalaires, comme le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), qui seront beaucoup plus stables que les espèces radicalaires et qui peuvent diffuser entre les cellules et initier la production de ROS dans d'autres cellules propageant ainsi la cascade oxydative (Costantini, 2008).

Les ERO sont majoritairement produits par la chaîne respiratoire de transport des électrons (ERC) au niveau de la mitochondrie. La production d'espèces réactives est un sous-produit du métabolisme de production de l'ATP et résulte d'une fuite d'électrons au niveau des complexes I et III de la ERC qui vont réduire l'oxygène en  $^{\circ}\text{O}_2^-$ . L' $^{\circ}\text{O}_2^-$  est considéré comme le premier ERO généré et va entraîner la formation des autres ERO par des réactions secondaires (Fig. 4). *In vitro*, la production d' $^{\circ}\text{O}_2^-$  représente 1-2% de l'utilisation de l'oxygène au niveau des mitochondries (Balaban et al., 2005). En condition non pathologique, les ERO jouent un rôle essentiel dans différents processus biologiques. Ils interviennent par exemple comme messagers secondaires dans le contrôle de gènes impliqués dans les mécanismes de différenciation cellulaire et d'apoptose (Dröge, 2002). Ils jouent également un rôle dans la médiation des processus inflammatoires et de l'immunité avec par exemple la production massive de ERO par les macrophages après phagocytose pour stimuler la production de protéases et éliminer le pathogène (Dröge and Dröge, 2002; Monaghan et al., 2009). Mais ces ERO « utiles » ne représentent que 10% de l'ensemble des ERO produits (Monaghan et al., 2009). La majeure partie de ces ERO, s'ils ne sont pas neutralisés, peut entraîner de nombreux dégâts oxydatifs macromoléculaires par oxydation des protéines, des lipides et de l'ADN. Au niveau de l'ADN par exemple, on peut observer une oxydation des guanines, des cassures au niveau des simples et doubles brins ou des erreurs de réplifications pouvant aboutir à des mutations (Gonzalez-Hunt et al., 2018). L'attaque des protéines et des lipides, en plus d'entraîner leur dénaturation et de

stimuler leur élimination, peut aussi générer de nouveaux ERO et des métabolites réactifs de l'oxygène (ROM) amplifiant et propageant ainsi le stress oxydatif. C'est le cas de la peroxydation des acides gras insaturés, qui entraîne la formation d'aldéhydes réactifs (ex. : les malodialdéhydes) et de lipides hydroperoxydes (Fig.4). Les dommages oxydatifs, s'ils ne sont pas corrigés, peuvent à terme engendrer la sénescence et l'apoptose des cellules (Monaghan et al., 2009). Le stress oxydatif est également impliqué dans des phénomènes d'inflammations en stimulant la production de cytokines pro-inflammatoires qui peuvent être à l'origine de lésions tissulaires ou de pathologies auto-immunes. Chez l'Homme, le stress oxydatif est un facteur associé à de nombreuses pathologies comme le diabète, l'athérosclérose ou la fibrose pulmonaire idiopathique (Forman and Zhang, 2021). Chez les vertébrés non-humains, certaines études mettent en évidence une corrélation négative avec le succès reproducteur des individus, notamment à cause d'une diminution de la qualité des gamètes (Mora et al., 2017; Vallverdú-Coll et al., 2016), mais ils semblent également impacter la survie des individus via les mécanismes de sénescence et d'immunité (Marasco et al., 2017).

Pour lutter contre le stress oxydatif, les organismes disposent d'un ensemble de défenses antioxydantes (AOX) qui sera capable de retarder ou d'inhiber de manière significative l'oxydation d'un substrat (Gutteridge, 1994) soit 1) via la réduction de la concentration des espèces réactives et des molécules pro-oxydantes par des échanges d'électrons comme c'est le cas pour le glutathion (GSH), la vitamine E, l'acide urique, les caroténoïdes et les flavonoïdes (Koivula and Eeva, 2010) ; ou leur captation et leur élimination, soit par 2) complexation protéique comme avec la métallothionéine capable de capter les métaux pro-oxydants les rendant inertes et facilitant leur excrétion ou 3) par réaction catalytique par des enzymes antioxydantes telles que la superoxyde dismutase (SOD) qui catalyse la transformation de  $^{\circ}\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}_2$  et en eau et la catalase (CAT) qui catalyse la conversion de  $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  (Limón-Pacheco and Gonsébat, 2009)(Fig. 4). Certains de ces antioxydants sont d'origine endogène comme les enzymes antioxydantes et le GSH, mais d'autres comme les caroténoïdes, les vitamines et les flavonoïdes sont d'origine exogène et dépendent des apports alimentaires. Les défenses antioxydantes d'un individu et sa capacité à résister aux dégâts oxydatifs seront donc à la fois dépendantes de son efficacité de production d'antioxydant et de la qualité de l'environnement dans lequel il évolue.

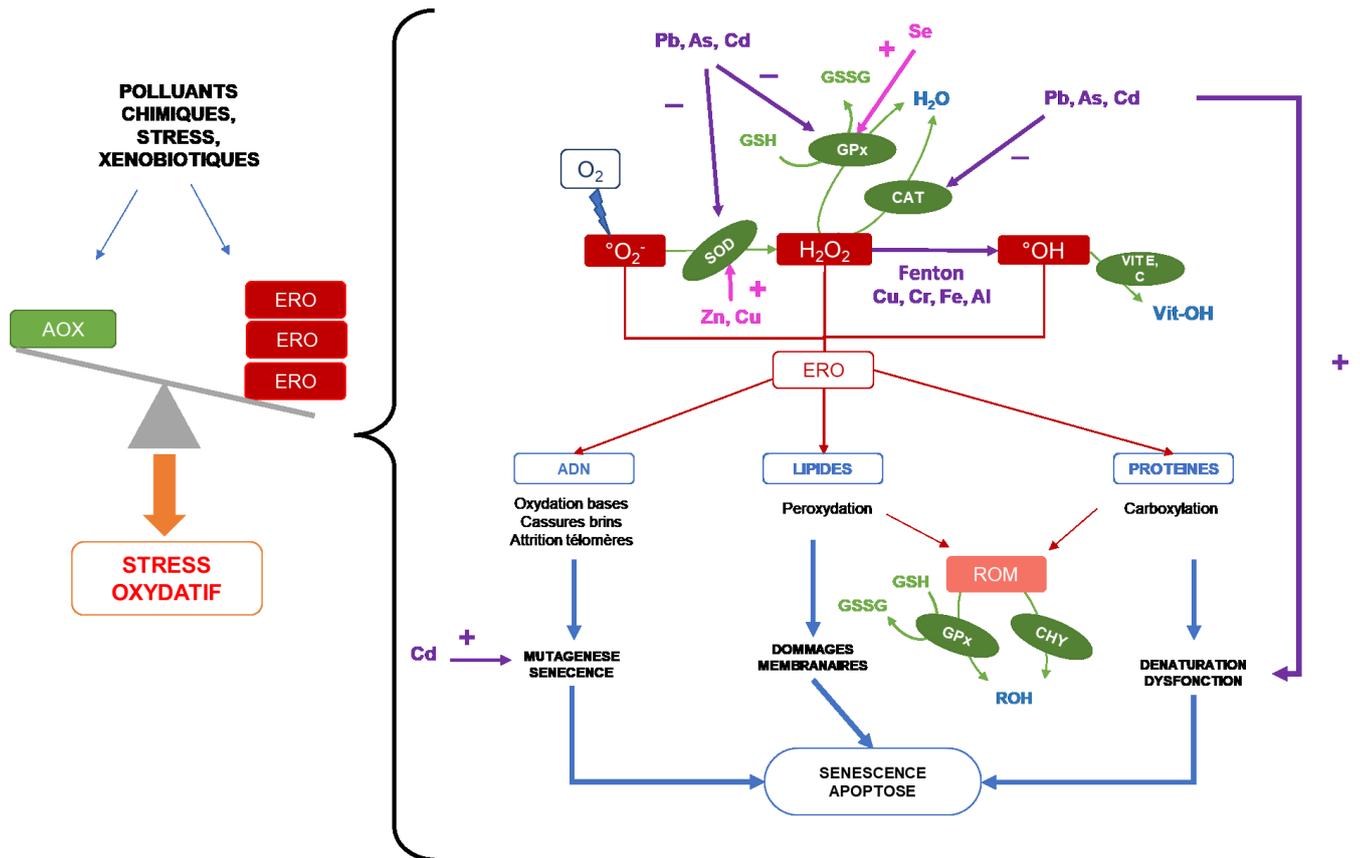
### *Stress oxydatif et urbanisation*

Le statut oxydatif des individus est fortement influencé par leur environnement. Des paramètres externes tels que les UV, la radioactivité ou l'exposition à de nombreux polluants chimiques contribuent à augmenter la production de ERO de manière significative. La toxicité des polluants chimiques repose d'ailleurs en grande partie sur leur rôle dans le dysfonctionnement de la balance oxydative (Isaksson, 2015, 2010). Des études ont révélé une corrélation positive entre l'apparition de dégâts oxydatifs et l'exposition à différentes catégories de polluants chez l'oiseau en ville (Costantini et al., 2014; Espín et al., 2014b; Isaksson, 2010; Kamiński et al., 2007; Salmón et al., 2018a) ou à proximité de sites industriels (Rainio et al., 2013; Stauffer et al., 2017), ce qui se traduit par une augmentation des dommages oxydatifs et/ou l'augmentation des défenses

antioxydantes. Par exemple, une augmentation des concentrations sanguines en Pb et en Cd est corrélée à une augmentation de la concentration en lipides et en protéines oxydées et une augmentation des capacités antioxydantes plasmatiques (Kurhalyuk et al., 2009).

Les NO<sub>x</sub>, les SO<sub>x</sub> et les HAP sont des molécules pro-oxydantes qui une fois dans l'organisme vont être capables d'oxyder directement d'autres molécules (ADN, lipides protéines), notamment celles en charge de leur détoxification, facilitant ainsi la propagation du stress oxydatif (Jan et al., 2015; Lodovici and Bigagli, 2011). Mais ces polluants et notamment les HAP comme le benzène peuvent également engendrer des dysfonctionnements de la chaîne de transport des électrons et stimuler la production de ERO via cette voie métabolique (Lodovici and Bigagli, 2011). Quant aux ETM, leur mode d'action dépendra du type de métal auquel les individus seront confrontés : certains d'entre eux, tels que le Cu, qualifiés de redox actifs, vont générer la production de ROS via la réaction de Fenton ou la réaction de Pseudo-Fenton durant laquelle les ions métalliques réagiront avec le H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> qui sera transformé en ion hydroxyde (OH<sup>-</sup>) et en radical hydroxyle (°OH) (Fig. 4). Mais d'autres ETM comme le Pb, le Hg ou le Cd vont réduire les défenses antioxydantes en inactivant les enzymes comme la SOD ou la glutathion peroxydase (GPx), et en réduisant les antioxydants circulants comme le GSH ou la métallothionéine (Koivula and Eeva, 2010).

D'autres facteurs peuvent également influencer le statut oxydatif des individus en milieu urbain. Le régime alimentaire peut être un facteur clé de la résistance au stress oxydatif (Costantini, 2014; Pamplona and Costantini, 2011). Certains antioxydants tels que la vitamine E ou les caroténoïdes ne pouvant pas être synthétisés dans les cellules, leur apport ne peut se faire que via le régime alimentaire de l'individu. Or, ces composés semblent être déficitaires en ville (Isaksson and Andersson, 2007). La biodisponibilité d'autres minéraux essentiels comme le calcium (Shriver et al., 2020) peuvent également diminuer avec l'acidification des sols et la pollution (Scheuhammer, 1991) conduisant à des carences chez les oiseaux urbains (Bailly et al., 2017). Le métabolisme du calcium par exemple joue un rôle essentiel dans les processus d'accumulation de toxicité de certains ETM non essentiels. Une carence en Ca peut notamment stimuler l'absorption et l'accumulation des ETM dans les tissus (Dauwe et al., 2006; Scheuhammer, 1996). La composition en acides gras essentiels de la nourriture trouvée en ville varie par rapport à celle de la nourriture en milieu rural/forêt. On observe notamment une teneur plus élevée en ville en longs acides gras polyinsaturés insaturés facilement oxydables (Isaksson et al., 2017; Toledo et al., 2016). Or, une teneur importante de ces acides gras est susceptible d'augmenter le métabolisme et donc la production de ERO au niveau des mitochondries (Andersson et al., 2018). La modulation de l'apport de ces acides gras dans le régime alimentaire, peut donc être un facteur clé de la résistance au stress oxydatif (Pamplona and Costantini, 2011; Pierce and McWilliams, 2014). Enfin, d'autres facteurs urbains liés aux activités humaines sont également susceptibles de provoquer une modification du statut oxydatif tels que la pollution sonore (Grunst et al., 2020; Injaian et al., 2018) ou la pollution lumineuse (Ouyang et al., 2015). Mais la présence de l'homme peut également engendrer une augmentation des taux de corticostérone (Müller et al., 2006), susceptibles d'augmenter le métabolisme des oiseaux. Or, une augmentation du métabolisme pourrait également conduire à une production accrue de ERO.



**Figure 4-** Schéma récapitulatif des mécanismes du stress oxydatif et de certains de ces effets et rôle des métaux et metalloïdes dans la médiation de ce stress. Figure adaptée de Ercal (2001) et Limón-Pacheco (2009). AOX : antioxydant, ERO: espèces réactives de l’oxygène,  $^{\circ}OH$  radical hydroxyle,  $H_2O_2$  : peroxyde d’hydrogène,  $^{\circ}O_2^-$ : ion superoxyde, ROM : métabolites réactifs de l’oxygène, ROH : groupement alcool stable, SOD : superoxyde dismutase, GSH/GSSG : glutathion libre/réduit, GPx : glutathion peroxydase, VIT E, C : vitamine E et C, VIT ROH : radical stable vitamine CHY : caroténoïdes, CAT : catalase, Cu : cuivre, Zn : zinc, Pb : plomb, Al : aluminium, Fe : fer, Cr : chrome.

### Téломères et urbanisation

L’un des mécanismes impliqués dans la relation négative entre le stress oxydatif et l’espérance de vie d’un individu est son impact sur les télomères. Les télomères sont des structures nucléoprotéiques situées à l’extrémité des chromosomes (Blackburn, 1991) dans les cellules eucaryotiques : la partie ADN de ces télomères est une séquence nucléotidique non codante, constituée d’un motif répété en ‘TTAGGG’, hautement conservé chez les vertébrés, et d’une partie protéique, un complexe Shelterine multiprotéique qui encapote l’ADN pour éviter que les télomères soient reconnus par les mécanismes de réparation de l’ADN comme étant une cassure double brin (Hug and Lingner, 2006). Les télomères ont un rôle essentiel dans le maintien de l’intégrité de l’information génétique et assurent également la stabilité des chromosomes durant les divisions cellulaires (Blackburn, 2005). Les mécanismes de réplication de l’ADN étant imparfaits, une perte d’une partie distale du brin 3’ d’ADN est observée à chaque cycle de réplication entraînant une attrition des télomères (Watson, 1972). Au bout d’un certain nombre

de divisions cellulaires, les télomères deviennent trop courts pour la fixation du complexe Shelterin ce qui est un signal d'entrée en sénescence et un arrêt de la prolifération cellulaire (Hayflick, 2003). L'entrée en sénescence des cellules est l'un des mécanismes qui rentrent dans le processus de vieillissement des organismes. Pour contrecarrer cette attrition des télomères, il existe une enzyme intervenant dans la restauration de ces télomères, la télomérase, dont l'activité sera finement régulée dans la cellule (Chan and Blackburn, 2004). En conséquence de cette réplication imparfaite, les télomères s'érodent naturellement avec l'âge chez de nombreuses espèces (Frenck et al., 1998; Tricola et al., 2018) et particulièrement durant la croissance où le taux de divisions cellulaires est très élevé, ce qui aura un impact à long terme (Geiger et al., 2012; Vedder et al., 2017). Mais la vitesse d'attrition des télomères est également dépendante des conditions environnementales. En ville, des facteurs tels que la pollution sonore (Meillère et al., 2015b), la pollution chimique (Stauffer et al., 2017) et une plus faible disponibilité en ressources alimentaires (Biard et al., 2017) entraîneront une attrition plus importante des télomères surtout lors d'une exposition précoce (Biard et al., 2017; Grunst et al., 2020; Meillère et al., 2015b; Salmón et al., 2016). Mais d'autres études ne montrent au contraire aucune différence sur ces paramètres, voire des télomères plus longs en ville (Salmón et al., 2017). Les effets de l'urbanisation sur ce paramètre semblent dépendants de l'intensité de l'urbanisation à laquelle les individus sont confrontés (Biard et al., 2017). Bien que certains polluants puissent endommager directement l'ADN, le stress oxydatif contribue grandement à cette attrition (Epel et al., 2004). La présence de nombreuses guanines dans la séquence des télomères les rend extrêmement vulnérables aux dommages oxydatifs (von Zglinicki, 2002). Le stress oxydatif peut également impacter les mécanismes de réparations de l'ADN avec une inhibition de l'activité de la télomérase (Borrás et al., 2004). L'augmentation de la production de ERO et la diminution en antioxydants augmentent la vitesse d'attrition des télomères. Ainsi, la longueur des télomères et leur dynamique d'attrition seront représentatives de la capacité d'un individu à réguler sa physiologie en réponse aux contraintes environnementales, mais également de l'investissement énergétique dans sa maintenance somatique (Blackburn and Epel, 2012; Pauliny et al., 2006) et de sa reproduction.

### 2.3. Urbanisation et traits morphologiques

Parmi les différences observées, les individus urbains sont souvent petits et plus légers que leurs congénères en milieu naturel. Ces différences semblent particulièrement marquées chez les espèces de passereaux tels que la mésange charbonnière (Biard et al., 2017; Caizergues et al., 2021) ou le moineau domestique (Liker et al., 2008; Meillère et al., 2017) même si ce pattern n'est pas présent dans l'ensemble des études (Evans et al., 2009; Sepp et al., 2017). Ces différences de taille touchent à la fois les poussins et les adultes et semblent dépendantes de l'intensité de l'urbanisation (Biard et al., 2017). De plus, une expérience de translocation de nichée (i.e. un échange de poussins entre des nichées de sites différents) chez le moineau domestique visant à distinguer les effets de l'habitat et de la génétique sur la taille, laisse suggérer que ce paramètre pourrait être en partie héréditaire (Seress et al., 2012). En effet, cette étude montre que les individus issus du milieu urbain et élevés en milieu rural étaient plus petits que leurs congénères issus du milieu rural. Ces différences de tailles sont également parfois associées à une condition corporelle plus faible chez les poussins (Liker et al., 2008) mais en

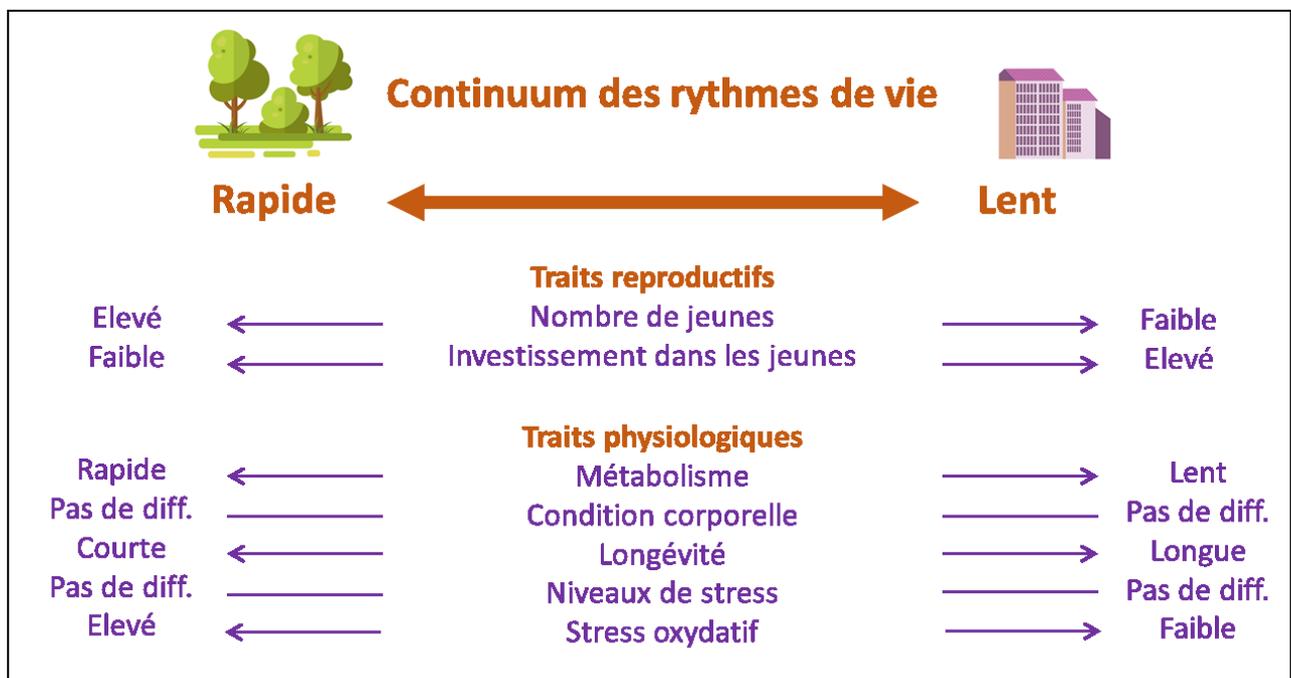
général pas chez les adultes (Meillère et al., 2015a; Sepp et al., 2017). Or, la condition corporelle d'un individu reflète son état nutritionnel. La question du caractère adaptatif de ce phénotype reste ouverte. Une hypothèse pour expliquer les différences de taille chez les endothermes est celle d'une réponse aux variations microclimatiques en lien avec les îlots de chaleurs urbains (Gardner et al., 2011). Effectivement, selon la règle de Bergmann, il existe une corrélation négative entre la température ambiante et la taille des individus reflétant une optimisation des coûts métaboliques liés à la thermorégulation (Gardner et al., 2011) (Gardner et al. 2011), Bergmann 1848). De plus, la plus grande prédictibilité des ressources en milieu urbain, liée à la présence de nourriture anthropique en quantité importante tout au long de l'année, réduit la nécessité d'avoir des réserves énergétiques comparé au milieu naturel où l'accessibilité aux ressources est fluctuante (Seress et al., 2012; Shochat, 2004). Une plus petite taille et une masse corporelle plus faible offrent également une meilleure manœuvrabilité et une plus grande vitesse de fuite face aux prédateurs tels que le chat domestique (Liker et al., 2008; MacLeod et al., 2006; Møller, 2008) dont la prévalence est plus forte en ville (Haskell et al., 2001; Sorace, 2002). A contrario, une plus petite taille peut également résulter de problèmes de croissance encore visibles à l'âge adulte. Si on considère qu'en milieu naturel, la taille et la masse à l'envol sont positivement corrélées au succès d'envol et à la survie des poussins (Hörak et al., 1999; Monticelli and Ramos, 2012) et peuvent conditionner l'entrée en reproduction et le succès reproducteur chez les jeunes adultes (Milenkaya et al., 2015), cette petite taille serait alors maladaptative. D'autant plus que pour une même espèce, il semble que ces différences morphologiques soient dépendantes de l'intensité de l'urbanisation (Meillère et al., 2017). Effectivement, des études corrélatives tendent à montrer que le milieu urbain ne satisfait pas de manière adéquate les besoins nutritionnels à la croissance des poussins, à la fois en termes de quantité et de qualité. Les populations d'arthropodes qui constituent la majeure partie du régime alimentaire des poussins de passereaux (Naef-Daenzer and Keller, 1999) sont largement diminuées en ville et souvent de moins bonne qualité en termes de composition protéique, minérale ou en antioxydant (Bailly et al., 2017; Isaksson and Andersson, 2007; Peach et al., 2015). De plus, l'exposition précoce à certains polluants urbains comme les ETM, contribue également à engendrer des retards de croissances parfois liés à un stress oxydatif accru.

### 3. Urbanisation, pace-of-life et qualité individuelle

Les divergences observées entre les populations urbaines et naturelles pourraient être la résultante d'un changement de stratégie d'histoire de vie des populations urbaines permettant leur maintien en ville. La stratégie d'histoire de vie d'un individu est la résultante du compromis d'allocation d'énergie permettant de maximiser l'aptitude phénotypique des individus (« fitness » en anglais ou encore valeur sélective), c'est-à-dire cette capacité à transmettre ses gènes à la génération suivante à travers son investissement dans la reproduction et la survie (Lindström, 1999). Il existe une grande variabilité de stratégies d'histoire de vie entre les espèces, qui se répartissent le long d'un continuum désigné comme étant le « pace of life » (« rythme de vie » en français) qui sépare les espèces à stratégie d'histoire de vie dite « rapide », ayant une faible longévité, mais un fort taux de fécondité, des espèces à stratégie « lente » avec une durée de vie longue et une faible fécondité. Les stratégies d'histoire de vie sous-entendent

une co-évolution de l'ensemble des traits d'histoire de vie et des traits physiologique avec l'environnement auquel les populations sont confrontées. Dans un environnement contraignant où les risques de mortalité extrinsèque sont accrus, les individus présentant un rythme rapide auront une valeur sélective plus grande par rapport aux autres individus, car ils seront capables de produire de nombreux descendants rapidement. Au contraire dans un environnement plus stable où le risque de mortalité extrinsèque est plus faible, les individus avec un rythme de vie lent, présentant une meilleure maintenance somatique et une reproduction réduite seront davantage sélectionnés (Hämäläinen et al., 2021). En milieu naturel, certaines études tendent également à mettre en évidence des syndromes comportementaux (Sih et al., 2004) qui seraient susceptibles de co-évoluer avec les traits d'histoires de vie et les traits physiologiques. Les syndromes comportementaux résultent d'une corrélation de plusieurs traits de caractère entre eux. Par exemple, l'agressivité est souvent associée à la témérité. Ainsi, des individus plus téméraires présenteront également un métabolisme plus élevé que les individus timides et auront un rythme de vie plus rapide (Réale et al., 2010).

Alors que la divergence de rythme de vie a été grandement étudiée à l'échelle des espèces, ce phénomène s'applique également à l'échelle intraspécifique (Martin et al., 2006; Niemelä et al., 2013). À ce titre, une hypothèse émerge selon laquelle les divergences phénotypiques observées entre les populations naturelles et urbaines de certaines espèces pourraient être associées à une divergence de pace of life en réponse à ce nouvel environnement urbain. Cette hypothèse avance que les populations urbaines présentent un rythme de vie plus lent que les populations naturelles notamment, car le milieu urbain représenterait un milieu plus stable et plus prévisible (nourriture, température) et offrirait des avantages tels qu'une pression parasitaire plus faible assurant une meilleure survie des individus (Charmantier et al., 2017; Sepp et al., 2017, Fig.5).

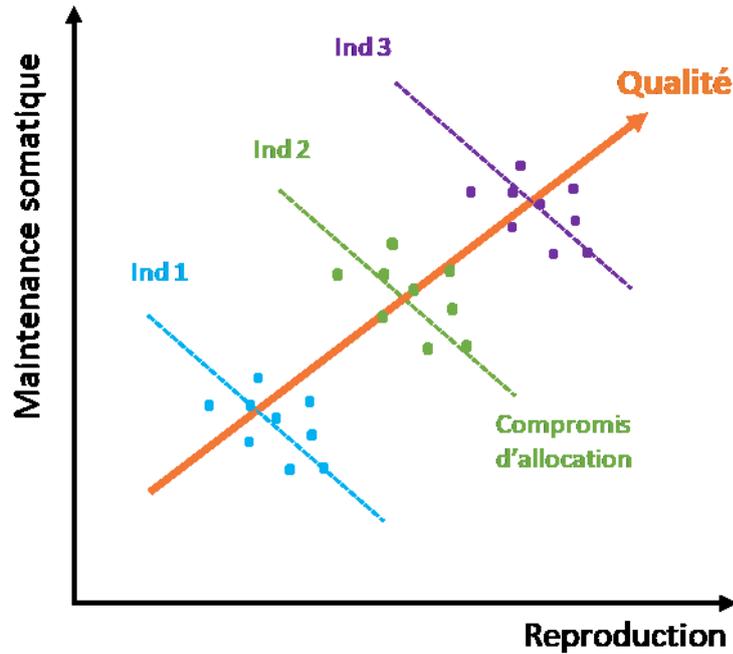


**Figure 5-** Variations prédites des traits reproductifs et physiologiques des individus urbain et forestier le long du continuum des rythmes de vie selon l'hypothèse des divergences d'histoire de vie. Figure adapté de Sepp et al.,

2018.

Paradoxalement, cette divergence de rythme de vie serait associée une sélection d'individus ayant une personnalité ou des traits comportementaux généralement associés à un rythme de vie rapide. En effet, les individus plus agressifs et plus audacieux seraient sélectionnés, car ces traits permettent de tolérer de plus grands niveaux de stress associés à la présence humaine (Sol et al., 2020).

L'hypothèse des rythmes de vies n'explique pas l'ensemble des patterns observés entre les populations urbaines et forestières. Alors que le milieu urbain semble avoir des conséquences négatives notables sur la santé et la survie des juvéniles, les effets sont beaucoup moins marqués à l'âge adulte, notamment chez certains reproducteurs. Ce pattern semble résulter d'un rôle de filtre du milieu urbain pour la survie et l'accès à la reproduction où seuls les individus de bonne qualité pourraient se maintenir et se reproduire en ville. En effet, certains individus plus efficaces dans leur acquisition en ressources peuvent allouer de l'énergie à la fois à leur maintenance somatique et à leur reproduction (Sudyka, 2019, Fig.6). La qualité individuelle sera donc définie comme un ensemble de traits biologiques positivement corrélé aux deux composantes de la fitness d'un individu à savoir les traits de maintenance somatiques et les traits reproducteurs (Wilson and Nussey, 2010). De ce fait, à l'échelle des populations, bien qu'il existe un compromis entre maintenance somatique et reproduction, une corrélation positive entre ces deux traits sera observée (Fig.6). À titre d'exemple, une corrélation positive entre la longueur des télomères, un paramètre qui représente l'investissement dans la maintenance somatique, et la taille de nichée a été observé chez l'étourneau, *Sturnus vulgaris* (Crisuolo et al., 2018). Il a été aussi montré que les coûts de reproduction peuvent être exacerbés chez les individus de faible qualité (e.g. Fay et al., 2016). L'environnement urbain étant un environnement contraignant pendant la reproduction pour les oiseaux insectivores, on peut s'attendre à un effet important de la différence de qualité individuelle dans ce type de milieu. La limitation des ressources favorise les individus de bonne qualité, capables de survivre et de se reproduire, par rapports aux individus de faible qualité, présentant des coûts de reproduction élevés, voire une mortalité importante, conduisant à une homogénéisation des phénotypes.



**Figure 6-** Représentation schématique du paradoxe existant pour la corrélation entre la maintenance somatique et la reproduction à l'échelle des populations. A l'échelle individuelle, une corrélation négative sera observée entre les traits reflétant le compromis d'allocations d'énergie (traits pointillés), mais à l'échelle interindividuelle avec les différences de qualité entre individu cette corrélation peut être positive (flèche orange). Schéma adapté de Sudyka et al., 2019 et van Noordwijk & De jong, 1986.

#### 4. Les limites des études corrélatives et l'importance de l'approche expérimentale

Les études corrélatives en milieu naturel posent néanmoins quelques limites. Seules les études corrélatives à long terme, ou du moins conduites sur plusieurs années, peuvent offrir une vision globale des divergences phénotypiques qui existent entre les populations urbaines et naturelles pour un site donné à cause de la grande variabilité temporelle des paramètres observés. Avec ce type d'étude, il est très difficile de distinguer l'effet propre à chaque facteur de stress sur le phénotype des individus, les facteurs pouvant être confondants. Par exemple, le trafic routier engendre à la fois une augmentation de la pollution sonore et de la pollution chimique. Dans une étude corrélative portant sur la relation entre la fitness et le trafic routier en ville, il est donc difficile de distinguer quel facteur impacte le plus les individus (Casasole et al., 2017). L'effet de ces facteurs peut également être modulé par d'autres facteurs environnementaux : par exemple, les effets d'une exposition aux métaux ou de l'éclairage artificiel sur le statut physiologique et la dépense énergétique des oiseaux en ville pourront être modulés par la disponibilité alimentaire (Berglund et al., 2014; Welbers et al., 2017) ; ou des facteurs biologiques, comme l'âge, le sexe ou le cycle biologique des individus (Alonso-Álvarez et al., 2010; Alonso-Alvarez et al., 2004b). Il est possible de tester ces effets via des expériences de manipulation alimentaire par exemple (Seress et al., 2020), mais la reproductibilité des conditions expérimentales d'une année à l'autre n'est pas garantie, car il est difficile de considérer l'ensemble des facteurs environnementaux qui caractérise le site d'étude. Notamment, les paramètres météorologiques jouent un grand rôle

dans la variabilité des patterns annuels. Des conditions météorologiques défavorables peuvent augmenter par exemple le stress oxydatif des individus (Casasole et al., 2017; Öberg et al., 2015). À une échelle différente, distinguer les effets propres à chaque source de stress peut également être essentiel pour proposer des solutions au niveau des politiques d'urbanisme pour la sauvegarde de la biodiversité en ville. Les mesures à adopter pour le dérangement lié au bruit et à la lumière n'étant pas forcément les mêmes que celles pour limiter la pollution chimique par exemple. Les études en laboratoire, en conditions contrôlées, peuvent donc être très utiles pour discriminer les effets propres à chaque facteur de stress et pour montrer des relations causales. L'approche expérimentale en laboratoire pour comprendre l'influence de l'urbanisation semble de plus en plus se développer, notamment pour les facteurs biophysiques comme le volume sonore (Injaian et al., 2018). En revanche, les études portant sur l'impact de la pollution chimique urbaine restent, pour le moment, moins développées. Or, les mécanismes d'action de certains polluants chimiques en ville restent à élucider, notamment pour les ETM. Bien que ceux-ci soient présents en quantités considérées comme inférieures aux valeurs toxiques de références, les mécanismes de bioaccumulation et de bioamplification qui s'opèrent dans les écosystèmes peuvent les rendre toxiques pour les organismes. Il existe de nombreuses études toxicologiques *in vitro* et *in vivo* quant aux mécanismes d'actions de ces ETM sur l'organisme. Néanmoins, ces études portent généralement sur l'action d'un ou deux ETM simultanément (Chatelain et al., 2016a, 2016b; Dauwe et al., 2002; Scheuhammer, 1991) et dans des concentrations très élevées (Dauwe et al., 2006, 2002; Scheuhammer, 1991) qui reflètent rarement l'exposition réelle en ville, à savoir une exposition chronique à un cocktail de métaux essentiels et non essentiels à faible concentration. L'aspect cocktail est important à considérer, car il peut également augmenter ou diminuer la toxicité des ETM qui le compose via des interactions antagonistes et synergiques. Les ETM essentiels sont susceptibles de réduire l'accumulation et la toxicité des ETM non essentiels. Par exemple, le Sélénium, un élément essentiel qui est indispensable à l'activité de la GPx (Fig. 4), peut complexer avec Hg pour former du sélénure mercurique (SeHg) biologiquement inerte et facilement excrété (Goyer, 1997). De la même manière, une supplémentation en Zn peut être susceptible de réduire les effets toxiques d'une exposition au Pb (Chatelain et al., 2016a; Victory et al., 1982; Wani et al., 2021). Mais inversement, les ETM non essentiels peuvent également réduire l'absorption de certains ETM essentiels : par exemple des rats exposés à un régime riche en Pb présentaient une diminution importante de Cu hépatique (Goyer, 1997). Quelques rares études ont également montré l'existence d'une synergie entre certains ETM qui conduirait à une toxicité accrue de ces ETM en cocktail par rapport à leur toxicité seule. Par exemple, une étude menée sur *Cenorhabditis elegans* a révélé une mortalité des individus 8 fois plus élevée lorsque ceux-ci étaient exposés à un cocktail de Cd, Cu et Cr comparativement à l'exposition aux métaux seuls (Wah Chu and Chow, 2002). Très peu d'études se sont intéressées à l'aspect cocktail en laboratoire pour les métaux chez les vertébrés (Stankevičiūtė et al., 2018, 2017) et notamment chez l'oiseau (Yenice et al., 2015).

## 5. Présentation de cette étude

Ce travail a donc pour objectif global d'apporter une contribution à la compréhension de l'impact de l'urbanisation sur la faune sauvage en combinant des approches corrélatives *in situ* sur une

espèce « d'urban adapter », la mésange charbonnière, et des approches expérimentales en milieu contrôlé sur le diamant mandarin (*Taenopygia guttata*), pour comprendre les mécanismes sous-jacents influençant les divergences phénotypiques entre les populations rurales et urbaines et leurs conséquences sur la dynamique des populations d'oiseaux. Les problématiques soulevées dans ce manuscrit se trouvent Fig. 7.

**Dans une première partie de ce travail de thèse**, je me suis intéressée à deux populations de mésanges charbonnières *in situ* vivant dans des nichoirs artificiels au sein de l'Eurométropole de Strasbourg depuis 2015 : une population urbaine dans le centre-ville de Strasbourg et une population forestière dans la forêt alluviale de la Wantzenau, un habitat de référence similaire à celui dans lequel cette espèce a évolué. Le premier chapitre de cette thèse (**Chapitre 1**, Fig.7) a pour but de caractériser les sites d'études à travers la mesure de l'ensemble des caractéristiques environnementales, à savoir la concentration de polluants dans l'air (polluants organiques), dans les végétaux (métaux et métalloïdes), dans les proies (métaux et métalloïdes) et dans les plumes des oiseaux (métaux et métalloïdes) sur chacun des sites, mais également le couvert végétal et la disponibilité alimentaire. Ensuite, j'ai étudié les effets de cet environnement urbain sur la reproduction de la mésange charbonnière en effectuant un suivi sur 4 ans tout en voulant mettre en évidence un éventuel effet combiné des paramètres météorologiques et de l'urbanisation. Effectivement, le succès reproducteur des oiseaux est souvent corrélé négativement avec les précipitations et les températures, car de mauvaises conditions météorologiques impactent les populations d'invertébrés réduisant la disponibilité alimentaire pour les passereaux insectivores, et accroissent les besoins énergétiques des poussins notamment pour maintenir leur température corporelle. Dans un milieu contraignant, tel que le milieu urbain, mon hypothèse de travail était que de mauvaises conditions météorologiques accentuaient les effets négatifs de la vie en ville sur le succès reproducteur. Puisqu'il n'y a pas véritablement de consensus concernant les résultats des effets du milieu urbain sur les organismes vivants, le **chapitre 2** de cette thèse (Chapitre 2.1) se propose de traiter des conséquences physiologiques de l'urbanisation sur les poussins pendant leur croissance et chez les reproducteurs, en mesurant le stress oxydatif et la longueur des télomères comme indicateurs de survie et de qualité individuelle. Certaines études ont montré que les contraintes environnementales urbaines pouvaient avoir des effets sur ces paramètres, mais aucune ligne générale n'a été mise en évidence dans la littérature. Je souhaitais donc tester les différences existantes entre les sites pour nos populations, mais également tester les différences interannuelles pour ces paramètres. Le chapitre 2.2 présente également les résultats d'une étude visant à tester le rôle de filtre par le milieu urbain pour l'accès à la reproduction basé sur la qualité des individus. Plus précisément, je souhaitais tester l'hypothèse selon laquelle les conditions environnementales urbaines agiraient en tant que filtre où seuls les individus de bonne qualité (i.e. avec de longs télomères et une meilleure capacité antioxydante) survivraient et parviendraient à se reproduire avec succès. Pour tester cette hypothèse, j'ai comparé les caractéristiques morphologiques et physiologiques des mésanges charbonnières de la population générale (capturée en hiver avant la reproduction) et celle des reproducteurs sur chacun de nos sites urbains et forestiers.

**La deuxième partie de ce travail de thèse** porte sur une approche expérimentale en milieu contrôlé sur le diamant mandarin visant à comprendre les effets phénotypiques de l'exposition à des cocktails de métaux représentatifs de l'exposition dans des villes plus ou moins polluées. Le **chapitre 3** (3.1) de cette thèse présente une étude visant à tester l'impact d'un cocktail de métaux dont les concentrations étaient représentatives de celles mesurées chez les mésanges charbonnières vivant à Strasbourg et les effets d'une supplémentation en calcium face à cette exposition sur l'état oxydatif et la longueur des télomères des individus. Enfin, j'ai voulu dans le chapitre 3.2 prendre en compte la diversité de pollution que l'on peut trouver dans certaines villes. Mon objectif était de mettre en évidence des concentrations de cocktails d'ETM à partir desquels des effets négatifs sur les organismes peuvent être détectés. Il s'agissait plus précisément de tester l'impact de cocktail d'ETM représentatifs de ville faiblement, moyennement et fortement polluées sur des paramètres physiologiques (métabolisme de repos, stress oxydatif et expression des mécanismes de détoxifications de la cellule), morphologiques (condition corporelle et coloration du bec) et locomoteurs (vitesse de vol).





---

# MÉTHODES

---



*\*Photo non contractuelle*



Ce chapitre a pour but de présenter les modèles, les sites d'études et les méthodes employées de manière générale, ainsi que la raison de ces choix. J'invite le lecteur à se référer aux différents manuscrits regroupés dans cette thèse pour avoir les protocoles détaillés.

## 1. Modèles d'études

### 1.1. La mésange charbonnière, une espèce « modèle »

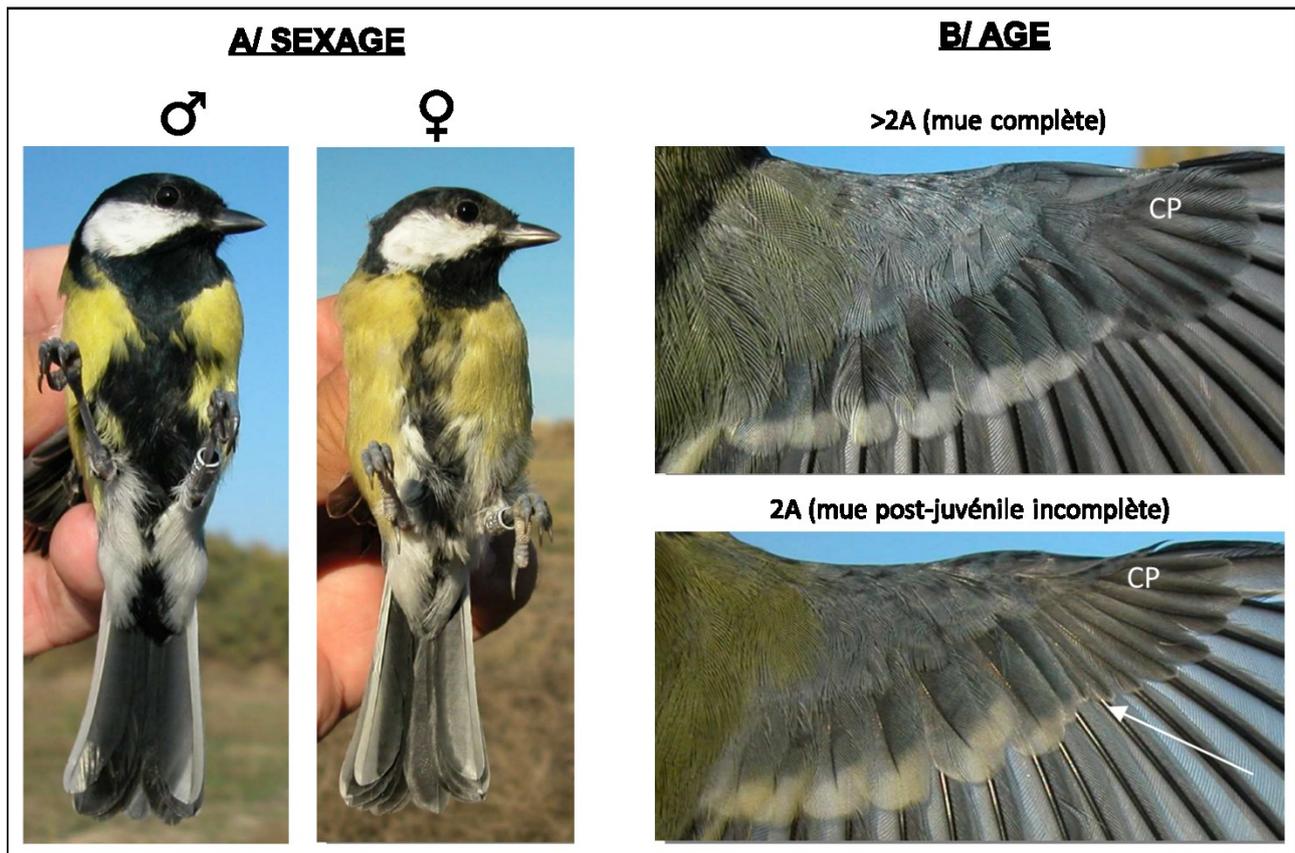
La mésange charbonnière (*Parus major*) est un passereau de petite taille (envergure de 23-26 cm), dont l'aire de répartition couvre l'ensemble de l'Eurasie et l'Afrique du Nord. Son habitat de référence correspond aux forêts caducifoliées et plus particulièrement les chênaies. Cependant, elle présente une très grande plasticité écologique et est observable dans tout type de milieu arboré : des habitats naturels, comme les forêts mixtes et les forêts de conifères, aux habitats plus artificialisés comme les jardins, les vergers ou les parcs urbains. C'est une espèce qui présente un régime alimentaire évoluant au fil des saisons. Pendant la reproduction, le régime alimentaire est majoritairement insectivore. Les chenilles de lépidoptères et les araignées constituent d'ailleurs la majeure partie du régime alimentaire des poussins. En période internuptiale, elles se nourrissent également de graines, de fruits ou de ressources d'origine anthropique. Elles chassent leurs proies dans des végétaux de tous types, mais privilégient les arbustes et les buissons (Betts, 1955). C'est une espèce cavernicole secondaire, nichant dans des cavités préexistantes comme des troncs d'arbre, ou des cavités rocheuses, qu'elle tapisse de mousse, de brindilles et de poils/plumes d'animaux. Les individus s'accommodent également de structures telles que des poteaux creux, des boîtes aux lettres, ainsi que des nichoirs artificiels proposés par l'Homme.

La mésange charbonnière est une espèce monogame sociale<sup>1</sup>, qui se reproduit entre mars et juin et peut avoir une à deux nichées pendant cette période. Le début d'entrée en reproduction de plusieurs paramètres tels que la température, le bourgeonnement de la végétation et le cycle d'émergence des invertébrés (Schaper et al., 2012). La femelle pond un œuf par jour, la taille de ponte est comprise entre 5 et 12 œufs et sera dépendante de nombreux paramètres environnementaux comme la disponibilité en ressource (Chamberlain et al., 2009) ou même la taille de la cavité où l'oiseau niche (Demeyrier et al., 2016). L'incubation est uniquement réalisée par la femelle et dure en moyenne entre 13 et 14 jours. Chez la mésange charbonnière, la femelle peut commencer à incuber avant d'avoir terminé de pondre, l'éclosion des poussins peut donc être asynchrone, ces derniers n'ayant donc pas tous le même âge au sein d'une nichée. Le nourrissage est assuré par les deux parents. Les poussins sont nourris au nid jusqu'à l'envol à 21 jours, puis à l'extérieur du nid pendant encore 3 semaines (Naef-Daenzer et al., 2001). À l'âge adulte, on peut observer un dimorphisme sexuel au niveau de la coloration du plumage chez cette espèce qui permet de différencier les adultes à distance : les mâles possèdent un bandeau noir médio-ventral de la gorge au cloaque, large et d'un noir profond (la cravate) tandis que celui-ci est plus restreint et plus irrégulier chez les femelles (Fig.1). De plus, en période de

---

<sup>1</sup> La monogamie sociale désigne la formation d'un couple élevant ses jeunes à deux, mais pouvant admettre d'autres partenaires sexuels, ou des copulations extrapaires chez les oiseaux.

reproduction, les femelles sont également reconnaissables par la présence d'une plaque incubatrice visible quand l'oiseau est en main. Par ailleurs, les patterns de mue permettent de différencier les jeunes adultes dans leur première année de reproduction (et dans leur seconde année civile ou 2A), des adultes plus âgés (>2A) (Fig.1). Effectivement, la première mue post-juvénile est incomplète au niveau des plumes de couverture primaire. Chez les jeunes, on observe donc une différence de couleur entre les grandes couvertures gris-bleutées et les couvertures primaires grises alors que chez les adultes dans leur seconde année ou plus, l'ensemble de ces plumes sont gris-bleutées (Demongin, 2016, Fig.1).



**Figure 1**- Illustration A) du dimorphisme sexuel (mâle à droite et femelle à gauche) et B) des patterns de mue permettant de déterminer l'âge chez la mésange charbonnière (*Parus major*). CP signifie couverture primaire  
Source et crédit photo : Blasco-Zumeta & Heinze

Il faut aussi savoir que les réponses de cette espèce à son environnement ont fait l'objet de nombreuses études, ses normes de réponses physiologiques et écologiques sont donc bien connues. À titre d'exemple entre 2000 et 2020 le nombre de papiers produits sur cette espèce sur Web of science est de 4035 (Hauber et al., 2021). Notamment, cette espèce a fait l'objet d'études corrélatives portant sur ses réponses physiologiques et écologiques à l'exposition à des polluants tels que les ETM (Janssens et al., 2003; Rainio et al., 2015; Stauffer et al., 2017), les Nox (Salmón et al., 2018a), mais également d'autres facteurs tels que la pollution sonore (Dominoni et al., 2020; Halfwerk et al., 2011a). La mésange charbonnière est également considérée comme une espèce modèle en écologie urbaine. En effet, les réponses de populations de mésanges à l'urbanisation ont été étudiées dans de nombreuses régions de France (e.g. Montpellier

(Caizergues et al., 2018), Franche-Comté (Bailly et al., 2016), Paris et Niort (Biard et al., 2017)), mais également dans différents pays européens (Thompson et al., 2022) comme la Suède (Salmón et al., 2016) ou la Pologne (Wawrzyniak et al., 2015). L'ensemble de ces données provenant de villes plus ou moins urbanisées et le long d'un gradient longitudinal constituent une littérature solide à laquelle comparer nos résultats.

Pour résumer, la mésange charbonnière était donc un choix privilégié pour nos études corrélatives en milieu urbain, car 1) c'est une espèce de « urban adapter » dont les populations prospèrent aussi bien en ville qu'en forêt 2) elle niche volontiers dans les nichoirs artificiels mis à sa disposition 3) le dimorphisme sexuel permet d'étudier les différences de réponses dépendantes du sexe sans nécessité d'un sexage génétique de l'animal 4) les résultats de nos études peuvent être directement comparés à la littérature riche chez cette espèce.

Néanmoins, la mésange charbonnière est une espèce sauvage ayant un statut protégé en France depuis 1981. Son maintien en captivité est possible, mais plus délicat que les espèces domestiques et nécessite notamment l'utilisation de volière extérieure pour être optimal. Pour réaliser nos approches expérimentales dans l'environnement le plus contrôlé possible, nous avons privilégié une espèce habituée à la captivité : le diamant mandarin.

### 1.2. Le diamant mandarin, un « rat de laboratoire » à plumes

Le diamant mandarin est un passereau de la famille des Estrilidés originaire d'Océanie. Il est rapidement devenu populaire comme espèce de compagnie au 19<sup>e</sup> siècle, car il se reproduit très bien en captivité (Hauber et al. 2021). Il est considéré aujourd'hui comme un des modèles aviaires les plus utilisés en laboratoire avec la caille japonaise et le poulet et présente de nombreux avantages tels qu'une fécondité annuelle élevée, une maturation rapide et un régime alimentaire simple (Griffith et al., 2021). Le diamant mandarin a fait l'objet de nombreuses études neuroéthologiques concernant notamment l'apprentissage du chant (Hauber et al., 2021), mais prend également part à des études immunologiques et écotoxicologiques. Pour ce dernier point, cette espèce a d'ailleurs souvent été utilisée comme modèle privilégié pour travaux portant sur les mécanismes du stress oxydatif et sur l'impact de l'exposition à des ETM (Alonso-Alvarez et al., 2004; Caudill et al., 2015; Snoeijs et al., 2005).



**Figure 2-** Dimorphisme sexuel du diamant mandarin (femelle à gauche et mâle à droite)

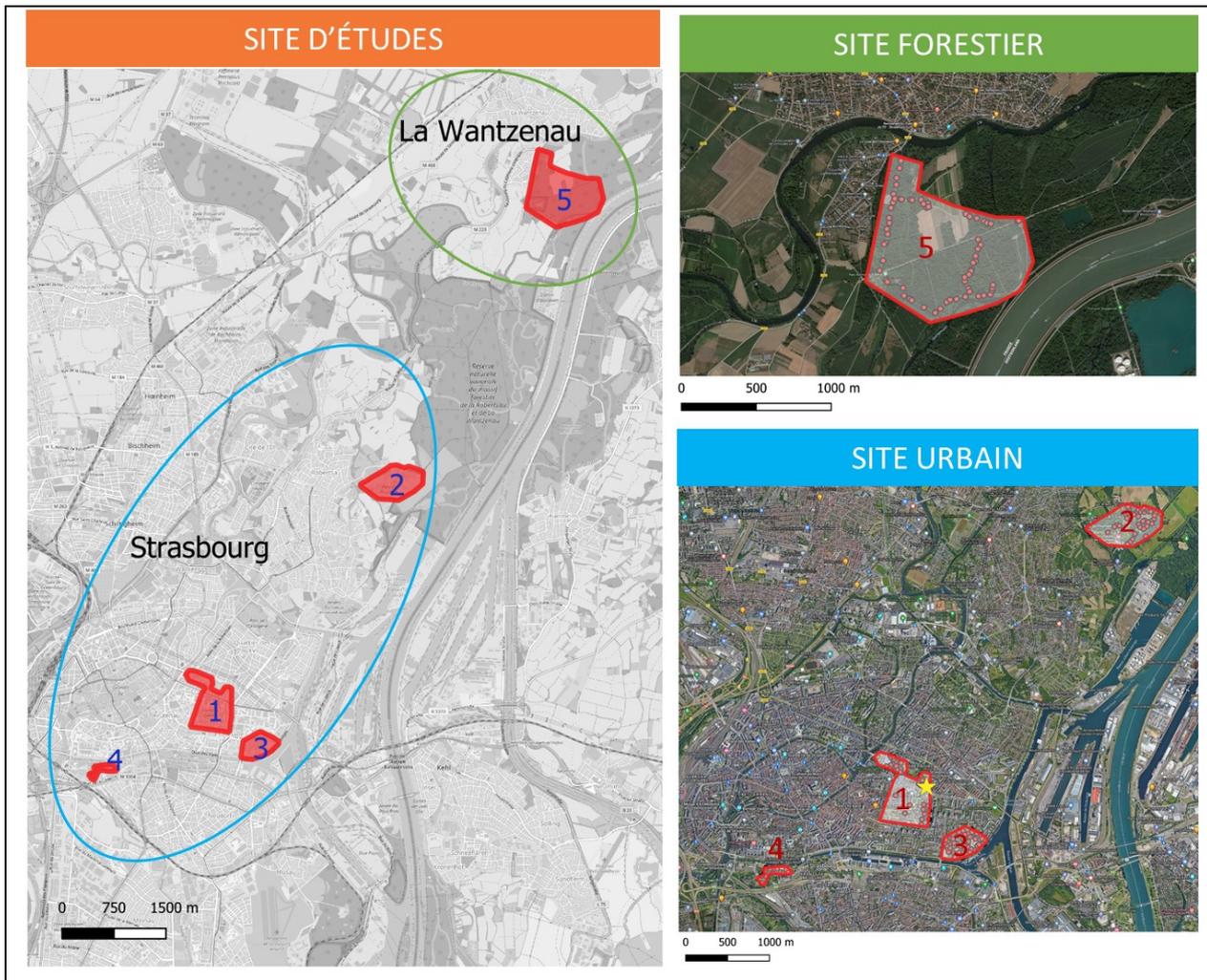
Son régime alimentaire en captivité se compose d'un mélange de graines (millet, seigle, ...) et d'os de seiche pour l'apport en calcium ainsi que des suppléments (hors période d'expérimentation) comme des fruits, des légumes et des œufs de poule cuits. En milieu naturel, ils peuvent également se nourrir de petits arthropodes comme des fourmis ou d'autres insectes. Tout comme la mésange charbonnière, on observe un dimorphisme sexuel marqué entre les mâles et les femelles, les mâles arborant un patch orange chatoyant sur la joue et des plumes marron piquées de blanc sur les flancs tandis que les femelles sont le plus souvent entièrement grises ou brunes (Fig.1). Cette espèce est également monogame sociale et la reproduction peut se dérouler toute l'année en captivité. Lors de nos expériences en laboratoire, vu nos tailles d'échantillons, nous avons choisi de ne sélectionner que les mâles, car de nombreuses réponses physiologiques varient avec le sexe des individus, notamment le statut oxydatif. De plus, l'accumulation des métaux chez les femelles aurait pu être biaisée. En effet, elles peuvent pondre des œufs toute l'année même sans être fécondées. Or, il a été montré que les ETM étaient susceptibles de s'accumuler dans les œufs, ce qui aurait pu contribuer à diminuer la concentration dans les autres tissus.

## 2. Approches corrélatives en milieu urbain

### 2.1. Présentation des sites d'étude

Les populations de mésanges charbonnières étudiées vivent au sein de l'Eurométropole de Strasbourg (EMS). Le site urbain est constitué de 4 zones comprises dans la ville de Strasbourg (N°1 à 4, Fig.3) et le site forestier correspond à une forêt alluviale dans une commune de la zone périurbaine de Strasbourg, la Wantzenau (N°5, Fig.3). Le suivi de ces populations de mésanges a débuté en 2013 à la Wantzenau et en 2014 à Strasbourg.

Le suivi des populations de mésanges se fait grâce à des nichoirs artificiels en bois ou en béton dont les dimensions sont adaptées à l'espèce (e.g. trou d'entrée de 32 mm) et qui ont été posés par nos soins ou mis à disposition par les associations Campus Vert en centre-ville et la Société Régionale Protectrice des Oiseaux (SRPO) en forêt.



**Figure 3** –Présentation des sites d'études. Les numéros sur les cartes correspondent aux zones 1) du campus central, 2) de la Robertsau, 3) de la Citadelle et 4) du Heyritz qui compose le site urbain à Strasbourg et 5) le site forestier dans la forêt de la Wantzenau. L'étoile jaune représente la position de la Station Météo France dont nous avons utilisé les données

#### ❖ *Site urbain*

La ville de Strasbourg est la 8<sup>e</sup> ville la plus peuplée de France, la densité de population au km<sup>2</sup> atteint 3638 hab/km<sup>2</sup> en 2018 et le taux de croissance annuel est de 0,6%. La présence de l'Homme et les potentiels facteurs de stress associés y sont donc très présents. La population de mésanges urbaines suivie durant notre étude niche dans des nichoirs artificiels répartis dans 4 zones principales dans Strasbourg ayant des caractéristiques très différentes afin de prendre en compte l'hétérogénéité urbaine (Fig. 3).

- Le campus central (N°1, Fig.3): située en plein de cœur de Strasbourg, cette zone est un campus universitaire où les nichoirs ont été placés sur des parkings, le long de routes passantes et de voies de tram ainsi que le long d'allées piétonnes fréquentées par des milliers d'étudiants chaque jour, mais également un grand parc avec une gestion

intensive surtout composée de pelouses, de buissons et d'arbres ornementaux (jardin de l'Université).

- La citadelle et le parc du Heyritz (N°3 et 4, Fig.3) : Les nichoirs y ont été installés en 2018. Ces deux zones sont des parcs urbains en plein cœur de Strasbourg accueillant beaucoup d'activités de loisirs et sont très fréquentées. Ces parcs font l'objet d'une gestion semi-intensive, certaines zones étant moins entretenues. La végétation présente étant composée d'espèces ornementales (haie de buis p.e). Ces parcs sont également entourés de routes assez fréquentées.
- La Robertsau (N°2, Fig.3) : Cette zone est située dans un quartier résidentiel de Strasbourg où la densité de population est un peu plus faible (1270 hab/km<sup>2</sup>). Les nichoirs sont installés dans un parc urbain, le parc de Pourtalès, qui a pour caractéristique d'être semi-entretenu. Une large partie du parc fait l'objet d'une gestion extensive, avec la présence de grandes prairies avec fauche tardive. Ce parc accueille de nombreux visiteurs et de beaucoup d'activités de loisir.

Le nombre de nichoirs installés en ville oscille donc entre 51 et 124, le nombre ayant augmenté avec les années. Les populations de mésanges charbonnières étudiées sont fréquemment nourries par l'Homme via la présence de nombreuses mangeoires dans différents parcs de la ville ou jardins/balcons privés.

#### ❖ *Site forestier*

La forêt de la Wantzenau est une forêt alluviale rhénane situées à moins de 20 km de Strasbourg et abritant de nombreuses espèces végétales et animales. Notre site d'étude est à proximité de la réserve naturelle du Massif Forestier de la Robertsau et de la Wantzenau. Cette forêt regroupe de nombreuses essences de feuillus caducifoliés tels que le chêne pédonculé, le frêne, l'orme champêtre ou le peuplier blanc et ainsi que de nombreuses espèces de lépidoptères et d'orthoptères. Ce type de forêt constitue un habitat préférentiel pour les mésanges charbonnières. Cette forêt à l'orée de la ville de la Wantzenau (229,9 hab/km<sup>2</sup>) est une zone de loisir fréquentée par les promeneurs. Les 60 nichoirs utilisés pendant cette étude ont été installés par les membres de la SRPO. Ils ont été placés le long des chemins de promenades des riverains, mais également le long de sentiers forestiers.

## 2.2. Caractérisation des sites d'études

Pour caractériser les différences entre nos sites et les facteurs de stress auxquels les individus sont exposés, plusieurs paramètres environnementaux ont été mesurés. Ces données ont été collectées en 2015-2016 avant mon travail de thèse. J'ai donc travaillé sur des données déjà acquises. Les analyses de ces paramètres font l'objet d'une partie du Chapitre 1 de la Partie 1 du manuscrit. Les paramètres mesurés étaient 1) le couvert végétal 2) la disponibilité alimentaire 3) les concentrations en polluants chimiques dans l'air, les proies, les fèces et les plumes des oiseaux 4) la température ambiante pendant la reproduction.

❖ *Estimation du couvert végétal et de la disponibilité alimentaire*

Une estimation du couvert végétal autour de chaque nichoir a été mesurée en 2016 en utilisant une carte d'occupation des sols réalisée par des étudiants du Laboratoire Image Ville et Environnement sous la direction de Laurent Hardion. L'occupation des sols a été découpée en 5 catégories : la végétation haute (arbres isolés, forêt, arbustes), la végétation basse (buissons, haies), les terres arables, les plans d'eau et les surfaces non végétales (bâtis et routes). Les cartes d'occupation des sols ont été traitées avec le logiciel Q-gis pour estimer la surface qu'occupait chaque catégorie dans un rayon de 50m autour du nichoir (soit une aire totale de 7850m<sup>2</sup>) qui représente le domaine vital pour un couple de mésanges charbonnières pendant la reproduction (Deymerier 2013).

Pour la disponibilité alimentaire, plusieurs prélèvements d'invertébrés ont été réalisés entre 2015 et 2016 sur chaque site au cours de la reproduction en utilisant une technique adaptée de Colas et al. 1948. Cette technique consiste à secouer vigoureusement 10 branches de plusieurs essences différentes (1 branche/arbre) au-dessus d'un grand parasol pour y faire tomber les invertébrés. Une partie des essences sélectionnées était commune entre chaque site, mais d'autres étaient bien distinctes, avec notamment des espèces exotiques et ornementales en ville afin de tenir compte de l'hétérogénéité des communautés d'invertébrés associées à chaque essence. Ces invertébrés ont ensuite été séparés en plusieurs catégories, « chenilles », « araignées » et « autres arthropodes », puis comptés et pesés avant d'être stockés pour analyses. Malheureusement les masses des invertébrés étant sous les limites de précisions de la balance utilisée, elles n'ont pas pu être utilisées pour nos analyses. Les échantillonnages d'invertébrés n'ont été effectués qu'au cours de la saison de reproduction, car c'est lors de cette période que les besoins sont les plus importants. Les échantillonnages ont été effectués à intervalles rapprochés (toutes les deux semaines) pour estimer la quantité de proies disponibles au cours de cette période et mettre en avant d'éventuelles fluctuations. Grâce à l'estimation du couvert végétal précédemment réalisée, nous avons extrapolé la disponibilité alimentaire sur chaque site (Voir Chapitre 1 pour plus de détails). Cette collecte d'invertébrés a toujours été effectuée à plus de 50m d'un nichoir occupé pour éviter qu'elles puissent modifier la disponibilité alimentaire pour les mésanges.

❖ *Estimation de la pollution dans l'air et les réseaux trophiques*

Les contaminants atmosphériques ont été piégés sur chaque site avec un capteur passif de type XAD-2®. Ce type de capteur est un tube adsorbant rempli de charbon actif, de silice ou de différents polymères capables de capter les polluants sous forme gazeuse ou sous forme de vapeur qui vont être adsorbés sur la matrice. Il permet de détecter des polluants comme les HAP, les PCB et les pesticides organochlorés. En revanche, il ne peut pas détecter les polluants sous forme de particules fines comme les métaux. Le capteur était renouvelé toutes les 2 semaines pendant la période de reproduction en 2015 et 2016 pour suivre l'évolution de la pollution d'une part, mais également parce que les matrices, si elles sont saturées, peuvent relarguer une partie des polluants piégés. L'extraction des polluants et la mesure de leur concentration ont été réalisées à l'ICPEES par l'équipe de Maurice Millet selon le protocole développé par Al Dine et al.

(2015) et Lévy et al. (2020 ; 2018). Sur 169 polluants testés, 89 d'entre eux ont été détectés au-dessus des limites de quantifications. Les polluants mesurés ont été classés en huit catégories selon leurs caractéristiques et leur toxicité : les polychlorobiphényles (PCB) séparés en PCB de type dioxine (DL-PCB) et PCB de type non-dioxine (NDL-PCB), les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les pesticides organochlorés (COC) et les pesticides non organochlorés divisés en insecticides, herbicides et fongicides.

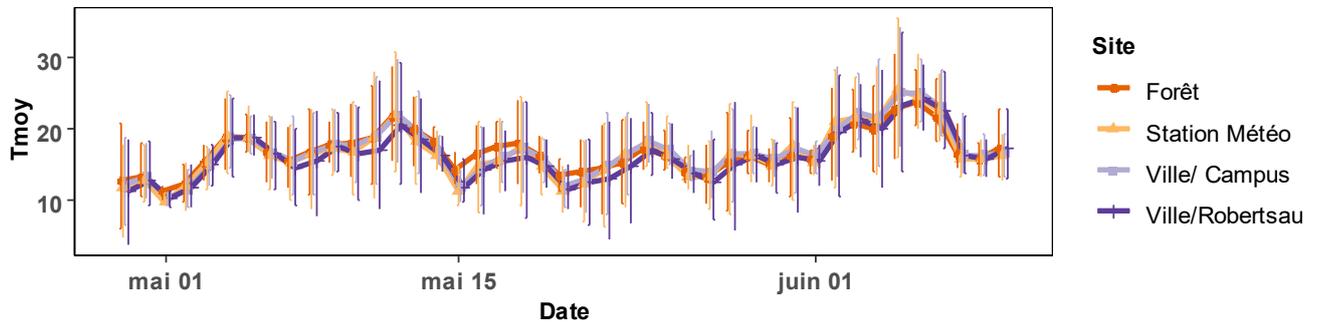
La concentration urbaine et forestière de 15 éléments traces métalliques et métalloïdes (ETM) a été analysée dans les feuilles et les proies (chenilles et araignées), mais également dans les plumes (adultes) et dans les fèces (poussins) de mésanges charbonnières collectés en 2015. Ces métaux ont été dosés par des techniques de spectrométrie de masse (ICP-MS) et de spectrométrie à émission atomique (ICP-AES) en fonction des éléments étudiés par Anne Boos et son équipe au Département des sciences Analytiques de l'IPHC. Les protocoles d'extraction et de dosage de ces polluants sont présentés en détail dans le manuscrit 1. Les plumes ont été lavées afin que les concentrations mesurées ne dépendent pas de dépôts atmosphériques, mais bien des ETM circulant lors de la croissance de la plume. Il faut en moyenne un mois à la plume pour pousser complètement avant d'être dévascularisée. Les concentrations en ETM mesurées dans ce tissu sont donc représentatives de l'exposition par l'air inspiré et la nourriture ingérée pendant la mue. Au total, 46 éléments traces ont été dosés, mais seulement 15 ont été détectés au-delà des limites de quantifications à savoir l'aluminium (Al), l'arsenic (As), le baryum (Ba), le cadmium (Cd), le cérium (Ce), le chrome (Cr), le cobalt (Co), le cuivre (Cu), le plomb (Pb), le molybdène (Mo), le nickel (Ni), le rubidium (Rb), le strontium (Sr), le vanadium (V) et le zinc (Zn).

#### ❖ *Mesure des températures moyennes*

Dans de nombreuses villes, les propriétés radiatives des surfaces bétonnées et le faible couvert végétal entraînent une augmentation de la température ambiante qui peut avoir une importance considérable sur les cycles d'émergence des invertébrés et l'entrée en reproduction chez les mésanges charbonnières. Pour tester l'existence de différence de températures entre notre site urbain et forestier, entre avril et mai en 2015 et 2016, un capteur de température (Thermochron ibutton, Embedded Data Systems©) a été placé sous un nichoir, à l'abri du soleil, pour mesurer la température ambiante (1 mesure/h) en forêt et deux nichoirs en ville pour tenir compte de l'hétérogénéité du milieu (Zones Campus et Robertsau). N'ayant pas encore installé les nichoirs à la Citadelle et au Heyritz en 2015-2016, la température n'a pas été contrôlée pour ces zones.

L'analyse de ces données n'a montré aucune différence significative entre les trois sites (LM :  $F=0.946$ ,  $p=0.39$ , Fig.4). Par la suite, ayant constaté des variations importantes du succès reproducteur entre les années nous avons souhaité savoir dans quelle mesure les paramètres météorologiques (température et précipitations) influençaient la reproduction sur chacun des sites (cf. chapitre 1). Nous avons alors pris les données Météo-France d'une station météo située (station N°67482001, 8°34'55 "N 7°46'08 "E) dans le Jardin Botanique de Strasbourg et nous avons comparé les données de températures de nos capteurs pour chacun des sites avec les données de températures collectées par Météo-France. Aucune différence n'a été observée (test

de Mann-Whitney-Wilcoxon, Urbain (centre) :  $W=4019$ ,  $p=0.21$ , Urbain (résidentiel) :  $W=3417$ ,  $p=0.93$  et Forêt :  $W=3571$ ,  $p=0,65$ , Fig.4). Nous avons utilisé les données de Météo-France pour la comparaison annuelle de température.



**Figure 4**– Comparaison des températures moyennes mesurées par nos capteurs de températures (Forêt, Ville/Campus, Ville Robertsau) et par la station Météo France (Station Météo) pendant la période de reproduction de la mésange charbonnière en 2015.

#### ❖ *Suivi de la reproduction*

Le suivi de la reproduction a été réalisé pendant la première ponte des oiseaux, entre mars et fin mai. Durant la ponte et jusqu'au début de l'incubation, chaque nichoir est visité tous les 2-3 jours pour obtenir les données de phénologie telles que la date de ponte (jour où la femelle pond le premier œuf, précision de  $\pm 1$  jour), la date du début d'incubation et la taille de ponte. Une fois l'incubation débutée, une date d'éclosion approximative est estimée et le couple n'est plus visité jusqu'à cette date afin d'éviter au maximum un trop grand dérangement et ainsi minimiser les risques d'abandon précoce. Passée cette date, l'éclosion des poussins a été contrôlée tous les deux jours pour obtenir la date d'éclosion (jour où le premier poussin a éclos) et le nombre de poussins éclos (déduit du nombre d'œufs non éclos). Le ratio entre le nombre de poussins éclos et la taille de ponte nous a permis de calculer un taux d'éclosion pour chaque nid. Les nichées sont ensuite contrôlées encore 1 à 2 fois (à l'occasion de la capture des adultes à partir du moment où les poussins les plus âgés ont atteint 8 jours) jusqu'au baguage des poussins à 14 ou 15 jours. Une dernière visite à la fin de la première ponte nous permet de vérifier l'envol effectif des poussins (reprise des poussins morts dans le nichoir) pour obtenir le nombre de poussins envolés. Nous pouvons ensuite calculer le succès d'envol (ratio entre le nombre de poussins à l'éclosion et le nombre de poussins à l'envol). L'ensemble de ces mesures sont des proxys essentiels pour estimer le succès reproducteur d'un individu.

#### ❖ *Capture et mesures morphologiques*

Étant donné que les deux parents participent au nourrissage des jeunes chez cette espèce, les deux sexes ont été capturés au nichoir grâce à un système de trappe (en face du trou d'entrée, Fig. 5). La capture des adultes est réalisée quand les poussins ont entre 8 et 15 jours. Après 8 jours, les parents ayant déjà beaucoup investi dans leur reproduction sont moins susceptibles d'abandonner leur nichée. Nous arrêtons nos visites au nid quand les poussins ont 15 jours, car la croissance osseuse est normalement terminée et les risques d'envol précoce liés à notre

présence sont importants. En 2019, les adultes ont également été capturés en hiver (entre février et mars). Pour les captures en hiver, deux types de méthodes ont été utilisées simultanément. La capture au filet japonais et la capture avec des cages-pièges (Fig.5). La capture au filet japonais permet de réaliser un échantillonnage aléatoire de la population, mais présente des contraintes liées à leur emplacement et il peut devenir rapidement visible si la végétation n'est pas assez dense. De plus, la capture dans les filets peut induire un stress pour les individus capturés. Les cages-pièges contenant une boule pour appâter les oiseaux doivent être disposées près d'emplacements où de la nourriture a été placée au préalable plusieurs semaines auparavant. L'échantillonnage est possiblement moins aléatoire, car il dépend du choix de l'oiseau d'entrer dans le dispositif. Malheureusement, la faible couverture végétale a rendu les filets très visibles pour les oiseaux dans les sites urbains, et la majorité des individus ont été capturés avec la cage-piège. A contrario, dans le site forestier, les oiseaux ne sont pas habitués aux mangeoires et le filet a été plus efficace.



**Figure 5** – Présentation des techniques de capture utilisée pour les mésanges charbonnières en hiver et au printemps

L'ensemble des adultes capturés ainsi que les poussins de 15 jours ont été bagués avec une bague en métal portant un numéro unique d'identification (bague CRBPO fournie dans le cadre d'un programme personnel). Plusieurs mesures morphologiques ont été réalisées dans le but de constituer un indice de taille composite : la distance tête-bec et la longueur du tarso-métatarse avec un pied à coulisse ( $\pm 0.1\text{mm}$ ) ainsi que la longueur de l'aile pliée ( $\pm 0.5\text{mm}$ ). L'animal est pesé avec une balance de précision ( $\pm 0.01\text{g}$ ) pour obtenir la masse afin de calculer la condition corporelle des individus. La condition corporelle est un proxy des réserves énergétiques et de l'état nutritionnel de l'individu et est considérée comme un marqueur de santé (Milenkaya et al., 2015). Des prises de sang ont également été effectuées pour les mesures des paramètres physiologiques.

### 3. Approches expérimentales en laboratoire

Les expériences en laboratoire ont débuté lors de mon travail de Master 2 (expérience 1), néanmoins l'analyse de certains paramètres physiologiques et résultats de cette expérience 1 a bien eu lieu durant ma thèse. Deux expériences distinctes ont été réalisées (Tableau 1).

**Tableau 1** – Récapitulatifs des expériences menées sur le diamant mandarin pendant cette thèse

Expérience	Durée	N	Groupes/Traitements
Expérience 1 (2018)  Chapitre 3.1	60 jours	40	<b>Contrôle:</b> eau Montcalm + 0,3% Calcium
			<b>ETM:</b> 0,3% Calcium + Cocktail ETM [Pb (10 ppm), Cd (0.1 ppm), As (1 ppm), Ni (0.5 ppm), Co (0.2 ppm), Zn (100 ppm), Cu (24 ppm), Cr (0.7 ppm)]
			<b>Calcium:</b> 3% Calcium  <b>ETM + Calcium:</b> 3% Calcium + Cocktail ETM [Pb (10 ppm), Cd (0.1 ppm), As (1 ppm), Ni (0.5 ppm), Co (0.2 ppm), Zn (100 ppm), Cu (24 ppm), Cr (0.7 ppm)]
Expérience 2 (2021)  Chapitre 3.2	60 jours	48	<b>Contrôle:</b> eau Montcalm
			<b>ETM Faible</b> [Pb (1 ppm), Cd (0.1 ppm), As (0,5 ppm), Ni (0.5 ppm), Zn (100 ppm), Cu (24 ppm)]
			<b>ETM Moyen</b> [Pb (5 ppm), Cd (0.5 ppm), As (2,5 ppm), Ni (0.5 ppm), Zn (100 ppm), Cu (24 ppm)]  <b>ETM Haute</b> [Pb (10 ppm), Cd (1 ppm), As (5 ppm), Ni (0.5 ppm), Zn (100 ppm), Cu (24 ppm)]

#### 3.1. Conditions de captivité et conditions expérimentales

Les diamants mandarins étaient logés dans de grandes cages de 150 cm x 70 cm x 100 cm à hauteur de 6 à 10 individus par cage (Fig. 6). Le cycle lumineux de la pièce était réglé à 14h de luminosité et 10h d'obscurité. La pièce était maintenue à une température constante de 22°C durant la première expérience (Chapitre 3.1), mais pour la deuxième expérience (Chapitre 3.2) celle-ci diminuait progressivement la nuit à 18°C. L'hygrométrie était maintenue de manière constante à 60%, pour éviter une trop grande prise de boisson par les oiseaux. Durant l'ensemble des expériences, l'eau de boisson des diamants était de l'eau minérale Montcalm, une eau à faible teneur en minéraux pour éviter les contaminations via l'eau du robinet. Les diamants étaient nourris avec un mélange de graines pour oiseaux tropicaux *ad libitum* (Tropical Finch Prestige® Versele Laga). Hors période d'expérimentation, les oiseaux disposent de baignoires pour se nettoyer et se rafraîchir, celles-ci ont été systématiquement enlevées avant le début des expériences.



**Figure 6** – Conditions de captivité des diamants mandarins pendant l'expérience

Pendant les expériences, les cocktails de métaux étaient administrés via l'eau de boisson des oiseaux avec un accès *ad libitum* à la nourriture. L'administration du traitement via l'eau de boisson est une méthode couramment utilisée dans les études en écotoxicologie (voir entre autres : Snoeijs et al. 2005 ; Dauwe et al. 2006 ; Chatelain et al. 2016). Celle-ci a l'avantage d'être peu stressante et peu contraignante pour les oiseaux et se rapproche le plus d'une exposition « naturelle ». Certes, avec cette méthode, la dose administrée est dépendante de la consommation en eau de l'oiseau, mais les conditions de température et d'hygrométrie choisies nous permettaient de contrôler la prise de boisson des oiseaux. De plus en mesurant l'eau consommée dans les biberons, nous avons pu estimer la consommation par cage. Les cocktails étaient préparés dans des contenants en plastique pour éviter une possible contamination liée à l'utilisation de contenants en verre, qui peuvent parfois contenir des traces élevées en métaux (Turner 2019). L'eau était renouvelée très régulièrement (tous les 2-3j) pour éviter la précipitation des ETM ou leur adsorption au contenant (Huang et al., 2020) ce qui pourrait diminuer leur concentration dans l'eau. Le mode d'administration des ETM a été vérifié dans chacune des expériences grâce à des mesures de leur concentration dans les plumes pour les deux expériences, mais également dans le sang pour l'expérience 1. Les plumes collectées sont des plumes qui ont poussé pendant le traitement des oiseaux après avoir été préalablement arrachée au début de l'expérience.

### 3.2. Choix des cocktails de métaux

L'objectif de cette étude expérimentale était de comprendre les conséquences sur l'organisme de cocktails de métaux dans des gammes de concentration similaires à celle trouvée en ville. Il est difficile de reproduire l'ensemble des processus environnementaux et notamment les processus de spéciation et de complexation de ces métaux, mais également l'ensemble des

modes d'expositions auxquels les animaux sont confrontés. Pour déterminer les concentrations d'ETM dans nos cocktails, nous nous sommes basés dans un premier temps sur les concentrations relevées dans les fèces des mésanges (poussins et quelques adultes) prélevées au sein de l'Eurométropole de Strasbourg entre 2015 et 2016 (Tableau 2). Nous avons choisi d'utiliser la concentration dans les fèces pour établir nos cocktails, car 1) la fraction alimentaire représente une part importante de la contamination pour beaucoup de métaux (Eeva et al., 2020); 2) la quantité de métal dans les fèces est corrélée aux concentrations de métaux dans les aliments (Bel'skii et al., 1995; Dauwe et al., 2004b) ; 3) la concentration dans les fèces représente à la fois la partie non assimilée du métal dans l'alimentation et la partie qui a été assimilée et excrétée (turnover) et représente donc au moins une concentration minimum à laquelle les oiseaux ont été exposés. Parmi les 15 ETM détectés au-dessus des seuils de quantifications, 8 ETM ont été retenus (Cu, Zn, Co, Ni, As, Pb, Cd et Cr) de par leur importance biologique à faible dose (Cu, Zn, Co) ou de par leur forte toxicité et l'importance de la surveillance réglementaire dont ils font l'objet (Cd, Pb, As, Ni, Cr) (ATMO FRANCE).

**Tableau 2-** Mesures des concentrations d'ETM dans les fèces des mésanges charbonnières

		Arsenic	Cadmium	Chromium	Cobalt	Copper	Nickel	Lead	Zinc
<b>Concentration (ppm)</b>	Mean	1,071	0,132	0,625	0,125	21,503	0,489	1,140	79,713
	±SD	0,875	0,112	0,891	0,168	20,986	0,691	1,045	36,083
	N	31	32	23	32	32	31	31	32

Lors de la première expérience (Chapitre 3.1, Tableau 1), nous avons décidé d'être conservateur et de transposer directement les concentrations mesurées dans les fèces dans les cocktails pour être sûres de rester dans des gammes d'expositions sublétales. Seules les concentrations en plomb ont été augmentées pour correspondre aux concentrations observées dans la littérature et toujours en restant représentatives d'une exposition en milieu urbain. Ainsi le cocktail choisit contenait du Pb (10 ppm), du Cd (0.1 ppm), de l'As (1 ppm), du Ni (0.5 ppm), du Co (0.2 ppm), du Zn (100 ppm), du Cu (24 ppm), du Cr (0.7 ppm). De plus dans cette expérience, nous avons réalisé une supplémentation en calcium pour deux des groupes grâce à des os de seiche et une supplémentation en calcium dans l'eau de boisson (1%). Dans l'expérience suivante (Chapitre 3.2, Tableau 2), visant à tester les effets de cocktails d'ETM représentatifs de villes plus ou moins polluées, nous avons choisi de faire varier les concentrations en ETM non essentiels (Pb, As, Cd) pour que celles-ci soient représentatives de villes faiblement, moyennement et fortement polluées. Nous nous sommes basés sur les concentrations précédemment utilisées avec une modification des proportions relatives des métaux non essentiels et l'élimination du chrome dans le cocktail pour 1) rester dans des concentrations sublétales et 2) éviter des problèmes de précipitations liés à l'augmentation des concentrations des métaux dans le cocktail (e. g. formation d'arséniate de cuivre chromé et d'arséniate de plomb). Pour limiter au maximum la formation de produits indésirables et pour faciliter leur assimilation, nous avons choisi de

préparer nos solutions avec des ETM sous forme de chlorure (e.g PbCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub>) excepté l'As, les ETM en solution étant ainsi sous forme cationique divalente.

#### 4. Paramètres physiologiques étudiés

Pour chacune des deux espèces, des prélèvements de sang ont été effectués par effractions cutanées au niveau de la veine alaire. Le sang collecté ( $\pm 50\mu\text{L}$  pour les mésanges et  $\pm 100\mu\text{L}$  pour les diamants) a été centrifugé pour séparer le plasma des érythrocytes qui ont été congelés séparément. Ces prélèvements ont ensuite été utilisés pour faire des mesures de marqueurs du statut oxydatif et des mesures de télomères.

##### 4.1. Mesure du statut oxydatif.

La mesure des dommages oxydatifs ou des antioxydants seuls ne suffit pas pour déterminer les niveaux de stress oxydatif chez un individu (Costantini and Verhulst, 2009). Pour chacune des études portant sur le statut oxydatif des individus (chapitre 2.1, chapitre 3), nous avons donc mesuré à la fois des marqueurs de dégâts oxydatifs et des marqueurs de défenses antioxydantes. Plusieurs marqueurs différents ont été utilisés dans cette étude.

##### ❖ *La concentration plasmatique en métabolites réactifs de l'oxygène (ROM) :*

Les ROS étant hautement réactifs et instables, ils sont difficiles à quantifier contrairement aux métabolites qu'ils génèrent lors de l'attaque des molécules organiques (carbohydrates, protéines, nucléotides, lipides). La mesure de ces métabolites réactifs de l'oxygène ou ROM, est donc un marqueur de dégât oxydatif. Les ROM ont été mesurés dans les chapitres 2.1 et 3. grâce au kit D-ROM (Diacron Lab, Italie) qui permet de doser les dérivés hydroperoxydes (ROOH) dans le plasma grâce à une réaction colorimétrique (cf. manuscrits pour plus de détails).

##### ❖ *Le métabolisme du glutathion (GSH, GSSG, GShtot et Glutathion peroxydase) :*

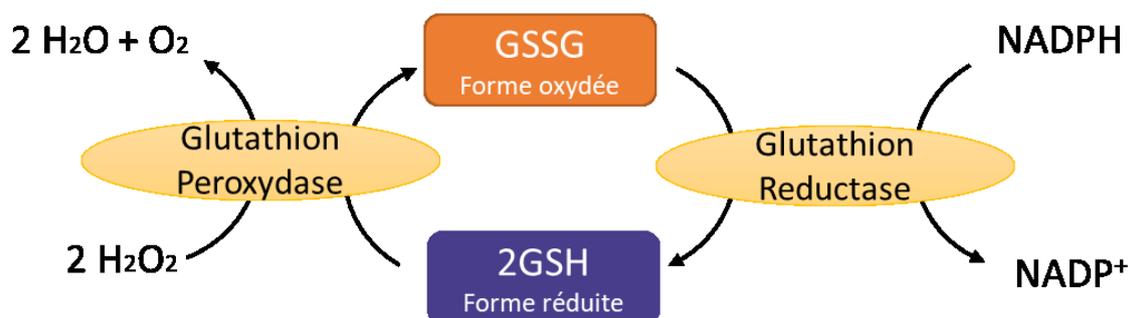


Figure 7 – Représentation schématique du métabolisme du glutathion

Le métabolisme du glutathion (Fig.7) est une composante importante des défenses antioxydantes. Il est fortement corrélé à l'exposition aux polluants dans les zones urbaines

(Isaksson, 2010) et fréquemment utilisé comme biomarqueur du stress associé aux ETM (Berglund et al., 2014; de la Casa-Resino et al., 2015; Espín et al., 2014b; Rainio, 2013). À titre d'exemple, une corrélation positive a été observée entre le GShtot et les concentrations en As dans les fèces de poussins de mésange charbonnière (Berglund et al., 2007). Le glutathion est un antioxydant non enzymatique riche en groupement thiol existant sous forme réduite (GSH) et oxydée (GSSG)(Fig.7). En effet, le glutathion contribue à réduire le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau ( $H_2O$ ) dans une réaction catalysée par la glutathion peroxydase (GPx). Le renouvellement du GSSG en GSH est assuré par la Glutathion réductase. Les groupements thiol du glutathion vont également pouvoir s'associer aux métaux pour former des complexes stables facilement excrétables (Pompella et al., 2003). Le dosage du glutathion (GSH, GSSG et GShtot) et de l'activité de la GPx ont été mesurés dans les érythrocytes grâce au kit *Glutathione Fluorescence* de chez Arbor Assay® (USA) et au kit *Randox*© de chez Ransel (UK) respectivement (voir chapitre 3.1 pour plus de détails).

#### ❖ *La capacité antioxydante plasmatique :*

La capacité antioxydante plasmatique correspond à l'ensemble des antioxydants non enzymatiques circulants. Pour doser la capacité antioxydante, nous avons utilisé le kit OXY (Diacron Lab, Italie). Ce kit colorimétrique permet de mesurer la capacité à réduire l'acide hypochlorique (HOCl) présent en excès dans le tampon de réaction pour limiter l'oxydation du substrat chromogène. Le kit OXY permet de quantifier l'ensemble des protéines, des thiols, des vitamines et des caroténoïdes présents dans le plasma de par leur affinité avec l'HOCl, mais pas l'acide urique (Costantini, 2011). Ce type de mesure permet d'obtenir un indice global des défenses antioxydantes en utilisant un minimum de plasma, ce qui présente un réel avantage chez nos espèces modèles où les quantités collectées sont très faibles.

#### ❖ *La metallothionéine :*

Les metallothionéines sont des protéines riches en cystéine ont un rôle primordial dans le transport et l'élimination des ETM tel que le Cu, le Zn et le Cd, et qui peuvent également contribuer à l'élimination des ERO. Chez les vertébrés, il existe 4 isoformes différentes de cette protéine : MT1, MT2, MT3 et MT4, mais les isoformes MT1 et MT2 sont les formes majoritaires.(Vašák, 2005) Les gènes de cette protéine sont surtout exprimés au niveau du foie où elles sont majoritairement produites, mais on peut également les retrouver dans d'autres organes comme les reins (Blalock et al., 1988; Davis and Cousins, 2000). L'expression génique de ces protéines est directement régulée par la concentration en métaux dans l'organisme via des sites de réponses multiples aux métaux situés dans la région promotrice du gène (Samson and Gedamu, 1997) . Le dosage direct de ces protéines ou des produits de leur expression génique nécessite souvent l'euthanasie de l'animal, car les prélèvements sont très invasifs. Néanmoins, des études menées chez l'homme (Al Bakheet et al., 2013) et le goéland à queue noire (Kim et al., 2013) a montré une corrélation positive entre la quantité d'ARN messenger de la metallothionéine dans le sang et la concentration en métaux. Nous avons donc développé un

protocole nous permettant de mesurer l'expression génique de deux isoformes (MT1 et MT2) dans le sang des diamants mandarin. Le protocole détaillé se trouve dans le Chapitre 3.2.

#### 4.2. Mesure des télomères

La mesure des télomères a été réalisée à partir d'ADN extrait des érythrocytes des oiseaux par PCR quantitative (qPCR) en temps réel selon la méthode développée par Criscuolo et al. (2003) et dont le protocole est détaillé pour chaque espèce dans les manuscrits 2 (mésange) et 4 (diamant). La mesure des télomères obtenue par cette étude est une mesure relative représentée par un ratio T/S, où T est le nombre de copies des séquences télomériques et S le nombre de copies d'un gène contrôle dont la longueur est invariante entre les individus. Il existe plusieurs techniques pour mesurer les télomères (Nakagawa et al., 2004) plus ou moins conservatives. La qPCR, bien que relative, présente l'avantage d'être rapide à mettre en place et a un prix moins élevé que d'autres méthodes. De plus, cette technique requiert très peu d'ADN (2,5 à 5 ng pour les espèces étudiées durant cette thèse). Cette méthode présente également l'avantage d'inclure les télomères ultra longs qui sont souvent masqués dans les méthodes avec dépôts sur gel car sortant des fenêtres d'analyses (Jin et al., 2019).

### 5. Autres paramètres mesurés

Ces paramètres ont été mesurés chez le diamant mandarin dans le cadre de l'expérience présentée au chapitre 4.

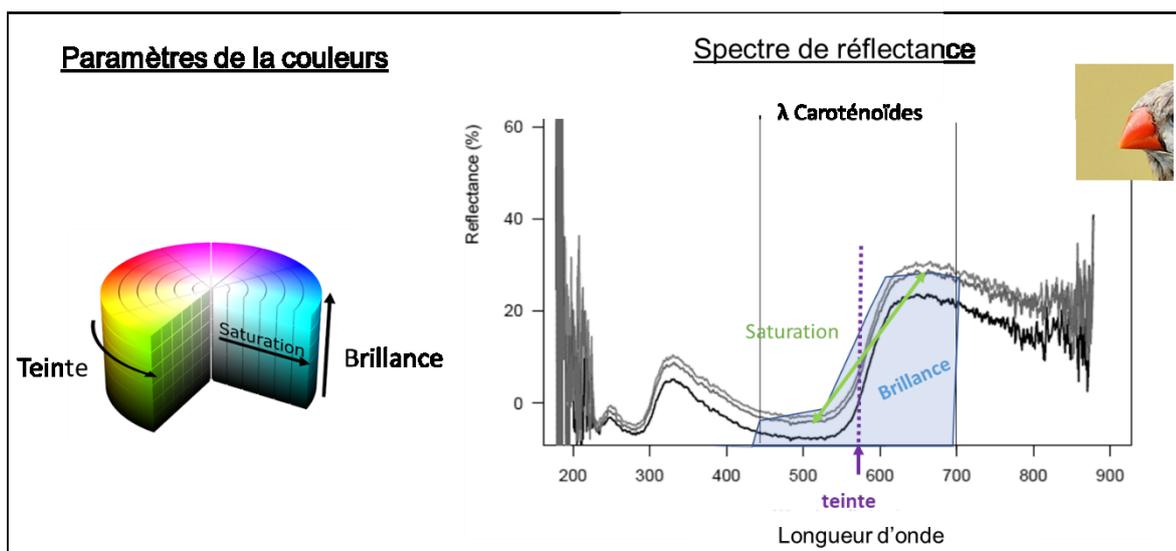
#### 5.1. Métabolisme de repos et quotient respiratoire

Le métabolisme de repos (resting metabolism) correspond aux dépenses énergétiques minimales nécessaires pour assurer les fonctions primaires de l'organisme sans activité physique, à jeun et à thermoneutralité. Pour estimer le métabolisme de repos, nous avons mesuré la consommation d'oxygène (VO<sub>2</sub>) chez les diamants mandarins grâce à un système de calorimétrie indirecte chez des individus inactifs, à l'obscurité qui avaient été écartés de toute source de nourriture au moins une heure avant l'expérience. Cette consommation d'oxygène est corrigée par la masse (VO<sub>2</sub> en mL O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>). Le protocole détaillé des mesures se trouve chapitre 3.2. La VO<sub>2</sub> augmente avec l'augmentation du métabolisme. L'exposition aux métaux peut impacter le métabolisme des individus soit en engendrant des dysfonctionnements hormonaux, enzymatiques ou des cinétiques de transport d'électrolytes (Goyer, 1997; Rana, 2014; Stohs and Bagchi, 1995), voire des problèmes de découplages de la chaîne de transport mitochondrial en charge de la production d'ATP (Belyaeva et al., 2012) ou même en entraînant une augmentation des coûts énergétiques associés à la détoxification de ces métaux. Certains ETM sont connus pour également impacter des voies métaboliques particulières, par exemple le Cd peut impacter directement le stockage et la mobilisation des acides gras (Lucia et al., 2010). Afin d'évaluer l'effet des métaux sur les oiseaux, nous avons mesuré le quotient respiratoire des individus qui correspond au rapport entre le volume de CO<sub>2</sub> produit (VCO<sub>2</sub>) et VO<sub>2</sub>. Ce quotient respiratoire renseigne sur le type de substrat oxydé lors de la synthèse de l'ATP. De manière générale, il est égal à 1 pour l'oxydation des glucides, 0,71 pour une oxydation des lipides et 0,74 pour une oxydation des protéines en moyenne chez l'oiseau (Walsberg and Wolf, 1995). Une

exposition aux ETM pourra potentiellement modifier ce quotient respiratoire par leur action sur l'une ou l'autre des voies métaboliques conduisant à une modification de l'oxydation des substrats et nous pourrons montrer ses effets en comparant à un groupe contrôle.

## 5.2. La couleur du bec :

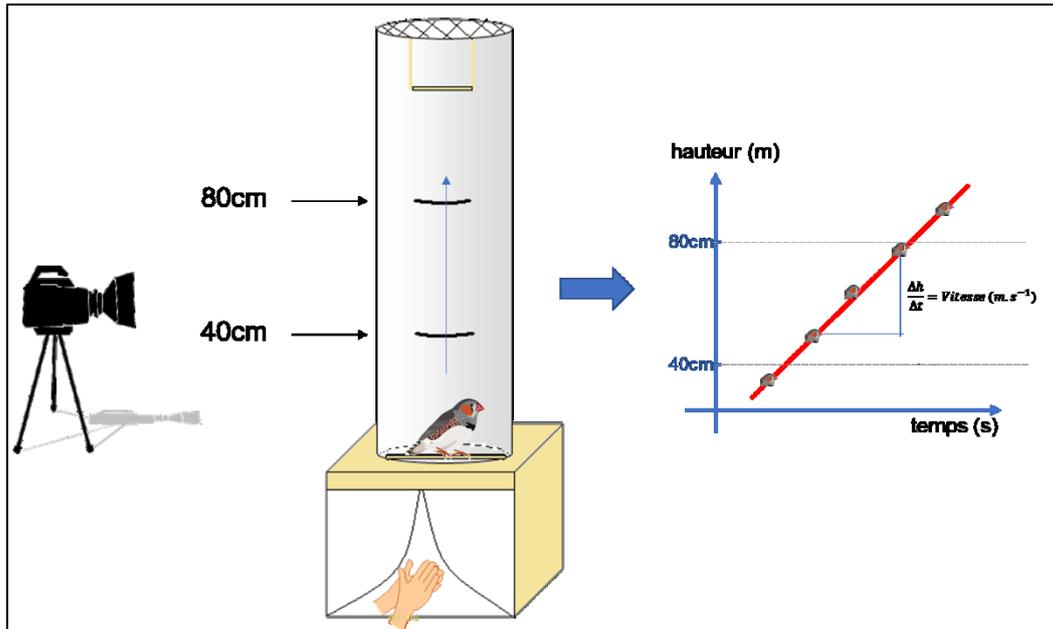
Chez le diamant mandarin, la couleur du bec est un caractère sexuel secondaire basé sur la pigmentation orange rouge qui est liée à sa teneur en caroténoïdes. La couleur du bec peut être considérée comme un proxy de la concentration en caroténoïdes circulants dans le sang (McGraw and Ardia, 2003) et donc comme un signal honnête de l'état de santé d'un individu (Ardia et al., 2010). La couleur du bec peut évoluer sur une courte période de temps chez cette espèce. Des variations de coloration sur un intervalle de deux mois avec une supplémentation en caroténoïdes ou avec un challenge immunitaire (Alonso-Alvarez et al., 2004a; McGraw et al., 2003). Mais une exposition précoce aux ETM peut également impacter ce paramètre (Goodchild et al., 2021). D'autres études montrent que la coloration du bec est également dépendante de l'expression de gènes du cluster des cytochromes P450 (Mundy et al., 2016). Les cytochromes P450 sont des enzymes détoxifiantes intervenant dans le métabolisme et l'élimination des xénobiotiques (Nelson and Nebert, 2018). La couleur du bec sera donc un signal honnête des capacités de l'individu à éliminer les substances toxiques. Pour évaluer la qualité de la couleur chez les diamants, nous avons utilisé un spectromètre capable de mesurer la réflectance de la lumière au niveau du bec des individus. La réflectance correspond à la quantité de lumière réfléchi par un objet. À partir de la réflectance, la couleur du bec a été évaluée selon 3 paramètres : la teinte, la brillance et la saturation de la couleur (Fig.8) pour la gamme de longueurs d'onde correspondant à l'absorbance des caroténoïdes comprise entre 450 et 700 nm. La teinte (hue en anglais) du bec (plutôt orange ou rouge) se calcule comme la longueur d'onde correspondant au point d'inflexion du spectre entre 450 et 700nm ; plus celle-ci sera élevée plus le bec sera rouge. La brillance (brightness) du bec correspondra à la réflectance moyenne entre 450 et 700 nm. Enfin, la saturation (chroma) de la couleur est calculée comme le produit de la différence entre la réflectance maximum et la réflectance minimum, divisé par la brillance moyenne (Hill et al 2006). Une mobilisation des caroténoïdes du bec aura pour conséquence de diminuer les valeurs de saturation, d'entraîner l'éclaircissement de la teinte (diminution de la longueur d'onde) et une augmentation de la brillance (McGraw and Ardia, 2003).



**Figure 8-** Illustration des paramètres de couleur mesurés et exemple d'un spectre de réflectance obtenu lors de la mesure du bec avec le spectromètre.

### 5.3. Test de performance de vol

L'accumulation dans les tissus de certains métaux comme le Pb et le Cd et les dégâts métabolites associés à leur exposition comme la déplétion d'enzymes, peuvent entraîner des problèmes neurologiques, mais également des troubles locomoteurs qui peuvent affecter la performance de vol des oiseaux (Hunt, 2015). Or, la performance de vol conditionne la capacité d'un individu à se nourrir ou à échapper à un prédateur (Lindhe Norberg, 2002). Pour tester les effets de l'exposition à nos cocktails de métaux, nous avons réalisé un test de vol vertical chez nos individus en suivant un protocole développé par Kullberg et al. (2002) et adapté par Reichert et al (2015). Brièvement, les individus étaient positionnés en bas d'un tube vertical en plexiglas présentant un perchoir à son autre extrémité, puis incités à s'envoler pour atteindre le perchoir. Chaque individu avait 5 tentatives avec un temps de repos de 30 secondes entre chaque essai. Chaque essai a été filmé puis les vidéos ont été analysées pour déterminer la vitesse de vol maximum atteinte par l'oiseau (Fig. 9).



**Figure 9** – Représentation schématique du dispositif de mesure utilisé pour mesurer les performances de vol vertical chez l'oiseau.



# PARTIE 1 – Approches corrélatives

---

Impact de l'urbanisation sur la  
reproduction et la physiologie de la  
mésange charbonnière

*(Parus major)*





## Chapitre 1

---

### Différences écologiques interannuelles entre ville et forêt : importance des paramètres environnementaux et météorologiques

#### Introduction :

De nombreuses études ont mis en évidence des conséquences négatives de la vie en ville sur le succès reproducteur des individus urbains lié à une taille de nichée réduite. Cependant, certaines études présentent une absence de différence, voire une meilleure survie et une plus grande valeur sélective de la descendance. De plus, les études à long terme montrent une grande variabilité interannuelle des patrons de différences entre ville et forêt. Il est possible que ces différences soient liées à des effets synergiques potentiels entre les conditions météorologiques et l'habitat des oiseaux reproducteurs. Nous proposons de tester les différences reproductives de populations urbaines et forestières de mésanges charbonnières en tenant compte des contraintes exercées par le milieu, grâce à la caractérisation des sites d'études en termes de pollution, de couvert végétal et de disponibilité alimentaire. Nous avons également testé les fluctuations interannuelles de ces paramètres et l'impact des conditions météorologiques pendant la reproduction sur le succès reproducteur des individus pour mettre en évidence un éventuel impact différentiel de la météorologie entre les sites. Nous nous attendions à une avancée de la phénologie et un succès reproducteur plus faible en ville, mais à ce que ces différences soient beaucoup moins marquées les années favorables en termes de météo. En effet, sur la base d'un environnement plus contraignant en ville, nous nous attendions à une plus grande sensibilité des individus urbains aux fluctuations météorologiques interannuelles, aboutissant à une plus grande variation des paramètres reproducteurs sur ce site entre les années.

#### Résultats :

Le succès reproducteur de la population urbaine était plus faible que celui de la population forestière notamment avec plus petite taille de ponte, un succès d'éclosion et un nombre de poussin à l'envol plus faible quelle que soit l'année. Ce résultat peut potentiellement être associé à la plus faible disponibilité alimentaire observée sur notre site. Mais la plus petite taille de nichée peut résulter d'une divergence de rythme de vie entre les populations urbaine et forestière, où les individus urbains limiteraient volontairement leur investissement reproducteur en réponse aux conditions environnementales. Le taux d'envol similaire entre les deux sites (excepté pour l'année la plus froide où il est plus faible en ville) semble confirmer cette théorie. Notre étude a également montré une corrélation positive entre les paramètres météorologiques pendant l'élevage avec le nombre de poussins à l'envol et le succès d'envol en ville. Les effets de la faible disponibilité alimentaire en ville semblent être exacerbés par une

météo défavorable pendant la reproduction, entraînant une baisse de la productivité et une mortalité juvénile plus élevée.

### **Conclusion :**

En conclusion, à Strasbourg, les contraintes liées à l'urbanisation semblent être principalement liées à la réduction du couvert végétal, qui limite la disponibilité de nourriture pour les passereaux. En outre, certains paramètres de la reproduction dépendent des effets additifs des conditions météorologiques et de l'environnement urbain, notamment pendant l'élevage des jeunes. Le nombre de poussins produits étant systématiquement plus faible en ville et invariant entre les années, ce résultat suggère un seuil de performance de reproduction que les parents ne peuvent pas dépasser.

Ce chapitre est présenté sous la forme d'un manuscrit en cours de révision chez Urban Ecosystem (3<sup>ème</sup> version, révisions mineures)

Le *supplementary material* a été placé dans les annexes de ce manuscrit de thèse.

**Manuscrit 1** – *Saulnier, A.*, Bleu, J., Boos, A., Millet, M., Zahn, S., Ronot, P., El Masoudi, I., Del Nero, M. and Massemin, S. Reproductive differences between urban and forest birds across the years: importance of environmental and weather parameters. Version révisée dans Urban Ecosystem

# Manuscrit 1

---

## Reproductive differences between urban and forest birds across the years: importance of environmental and weather parameters

(En révision pour Urban Ecosystem)

Agnès Saulnier\*<sup>1</sup>, Josefa Bleu<sup>1,2</sup>, Anne Boos<sup>1,2</sup>, Maurice Millet<sup>2,3</sup>, Sandrine Zahn<sup>1,2</sup>, Pascale Ronot<sup>1,2</sup>, Islah El Masoudi<sup>1</sup>, Emilio R. Rojas<sup>1,4</sup>, Pierre Uhlrich<sup>1,2</sup>, Mirella Del Nero<sup>1,2</sup>, Sylvie Massemin<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup> ZAEU, Maison Interuniversitaire des Sciences de l'Homme - Alsace (MISHA), 5, allée du Général Rouvillois, CS 50008, 67083 Strasbourg cedex

<sup>3</sup> Université de Strasbourg, CNRS, ICPEES UMR 7515, F-67087 Strasbourg Cedex 3, France

<sup>4</sup> Wildstat, 43 rue de la Hoube, 67280 Urmatt, France

### Abstract

Urban environments pose many challenges to wildlife, not least for insectivorous passerines. Numerous studies have reported on the negative effects of urbanization on reproduction in these species. However, depending on the taxa and cities studied, no particular or positive effects have been reported. This may be related to the different levels of urban environmental stressors. As unfavorable weather can have deleterious effects on birds (e.g. lower prey availability and higher costs of pollutants), annual variations in the differences observed between sites could be related to synergetic effects between the urban environment and weather conditions. In this context, we studied the reproduction of great tit (*Parus major*) at two sites (urban and forest) over four years. First, we quantified pollution, prey availability, and vegetal cover at each site to characterize each environment. Second, we measured the effects of site and weather conditions on tit reproductive success to determine if the influence of weather increase is higher in the city. Our results showed poorer food availability and a predominance of non-vegetated areas in cities, but no difference in pollution levels. Except for the hatching date, reproductive parameters were lower in the city than in the forest. The fledging rate in the urban environment was lower during the coldest year, whereas no annual differences were detected in the forest. Nevertheless, lower number of young fledges each year was measured in the city compared to the forest, indicative of a maximum breeding performance in cities that parents cannot exceed.

**Keywords:** *urbanization, weather effect, metal pollution, reproductive success*

## Introduction

A growing human population has resulted in growing levels of urban development, significantly modifying natural landscapes. Urbanization is associated with a deep restructuring of abiotic parameters, such as temperature or light/noise/chemical pollution, as well as the modification of biotic parameters, such as low vegetation cover or changes in fauna/flora, species interactions or human density (Gil and Brumm, 2013). These rapid environmental changes have direct consequences on the demography of many species, particularly birds, due to the impact of the environment on the reproductive success of individuals (Chamberlain et al., 2009; Shochat et al., 2015b). Numerous factors can influence the reproductive success of urban birds. Urban habitats are considered to be of lower quality compared to rural habitats (Bailly et al., 2016; Kempenaers et al., 2010; Meillère et al., 2015a; Schroeder et al., 2012); notably, they offer a lower prey availability due to the lower invertebrate density associated with a reduced vegetal cover (Fenoglio et al., 2020). Some studies have pointed out that urban food is also of lower nutritional quality, such as lower antioxidant contents (Isaksson and Andersson, 2007), which can lead to nutritional deficiencies (Bailly et al., 2017). A lower quality and quantity of prey leads to a poorer physical condition of nestlings (Bailly et al., 2017; Meillère et al., 2015a) and lower fledging rates. Poor reproductive success and low rates of nestling survival are also correlated with increasing chemical component exposure as a result of increasingly intense anthropogenic activities. Numerous studies have found that pollutants, such as polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs, whose emissions are associated with road traffic) or polychlorinated biphenyl (PCB), can affect egg production and egg quality, leading to higher rates of hatching failure (higher embryonic mortality and development abnormalities) (Albers, 2006; Kimberly J. Fernie, 2000; Vos, 1972). Similarly, some metals, such as cadmium (Cd) and lead (Pb), whose emissions may be linked to industrial activities, can interfere with calcium metabolism, leading to thinner eggshells (Eeva and Lehikoinen, 1995; Scheuhammer, 1996) but also to osteogenesis abnormalities (Eeva and Lehikoinen, 1996b; Goyer, 1997) or oxidative stress responses during the growth of nestlings (Berglund et al., 2007), which can jeopardize fledging success.

In this context, the majority of recent studies have reported decreased reproductive success in various bird species in cities, notably insectivorous birds (review by Chamberlain et al., 2009; see also Biard et al., 2017; Halfwerk et al., 2011; Peach et al., 2008; Vaugoyeau et al., 2016). However, not all studies have reported lower reproductive success in cities; in fact, some studies have found no differences or even positive effects of urbanization on reproductive success (see

Sepp et al 2018 for a review). In these studies, it is possible that the constraints of the studied environment were minimal, or alternatively, that the specific urban environment had an advantage over the rural environment, such as lower parasites and a lower prevalence of predation (Sepp et al., 2017). However, for some long-term population studies, a large variance has been reported in terms of the differences in reproductive success between urban and forest populations over the years, which does not always allow for the establishment of a recurrent pattern (Wawrzyniak et al., 2020, 2015). Therefore, it is very difficult to draw conclusions regarding the impact of city life on individuals based solely on the results of a single-year study. To understand the underlying mechanisms influencing reproductive success in an urban context, it is necessary to take into account the inter-annual variability of reproductive parameters across sites.

One hypothesis for this inter-annual variability is the variation in weather parameters. In fact, the reproductive success of birds is dependent on weather conditions and, nestling survival and fledging rate in passerine birds are often negatively correlated with rainfall and cold temperatures (Cox et al., 2019; Öberg et al., 2015). Low temperatures lead to a decline in invertebrates due to emergence delay (Buse et al., 1999), while rain spells increase the difficulty of localizing and catching them (Avery and Krebs, 2008; Dawson and Bortolotti, 2000). The energy expenditure linked to prey capture often increases under harsh weather conditions (Cox et al., 2019; Dawson et al., 2005). In contrast, an early increase in temperature at the beginning of the breeding season can also induce a greater risk of a mismatch with the invertebrate peak, especially for migratory insectivorous species (Cormont et al., 2011). Weather conditions can also amplify or limit the exposure to chemical pollutants. For example, a lack of wind can lead to the stagnation of aerial chemical pollutants (Liu et al., 2015), while heavy precipitation can lead to pollutants being washed off inert urban surfaces (e.g. roads and roofs) and being more easily mobilized in ecosystems (review by Gosset et al. 2016, Shinya et al. 2003). Similarly, weather conditions can also enhance the negative effects of chemical compounds. For example, in tree swallows, unusually high seasonal temperatures have been found to lead to lower reproductive success at mercury-polluted nesting sites, while the number of nestlings tend to increase at the control site (Hallinger and Cristol, 2011). Similarly, a reduction in the surface tension of feathers due to contamination with organic pollutants can increase the permeability of feathers to water while decreasing their insulating properties, which induces additional physiological requirements for thermoregulation during cold weather events (Stephenson, 1997). Since

invertebrate communities and food availability are already poor in cities (Fenioglio et al. 2020), in addition to having higher levels of pollutants, unfavorable weather conditions could potentially increase urban stress, leading to a more deleterious effect on the reproductive success in cities than in rural or forest habitats. However, it is also possible that environmental constraints in urban areas are so strong that climatic parameters only have a moderate effect on reproductive parameters compared to other factors, such as in house sparrows, where reproductive success was found to be consistently lower in cities, even between years with contrasting climatic conditions (Seress et al., 2012).

The first aim of this study was to measure the reproductive success of great tits in urban and forest habitats and to characterize each site in terms of pollution and food availability. Secondly, this study aimed to determine whether reproductive success is related to weather conditions during the breeding period and whether the effects of weather are dependent on breeding sites, with higher susceptibility of urban breeders to harsh conditions. For this purpose, we followed two different populations of great tits over four years in a city (Strasbourg, France) and a forest (La Wantzenau forest, 20km away of Strasbourg city center). The great tit is considered an urban adapter and has been the subject of numerous studies concerning the impact of urban environmental factors on population dynamics (Wawrzyniak et al. in press, 2020, Biard et al. 2017, Caizergues et al. 2021). To characterize the habitat at each site, we evaluated vegetal cover, prey availability, and pollution. For this last parameter, we measured different polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, and pesticides in the air, and trace metal elements in leaves, prey, and the feathers of birds. We expected a lower level of pollution and a higher vegetal cover and prey availability in the forest site compared to the urban site, and a higher reproductive success in the forest site. For the second aim of this study, concerning the relationship between weather parameters, reproductive success and site, we evaluated the relationship between rainfall and temperature data and reproductive success (measured as hatching rate and fledging number). We expected greater differences between sites in years with unfavorable weather conditions (i.e. high precipitation rate and cold temperatures) due to the higher sensitivity of urban birds.

## Material and methods

### 1. Study sites, animal model, and reproduction monitoring

This study was performed on the first broods of two populations of great tit in the Eurometropole of Strasbourg (region Alsace, France) for four years (2015, 2016, 2018, and 2019). The great tit is a relevant biological model because it can easily breed in artificial nest boxes, facilitating the biomonitoring of its reproduction. The studied populations were housed in artificial nest boxes (124 and 60 nest boxes installed within the urban site and the forest site, respectively); however, it is worth noting that the occupancy rate of the nest boxes in urban sites was lower than in forest site (see Appendix A1). Nest boxes in the urban site (Urban) were installed on urban parks ( $N_{2015}=2$ ,  $N_{2016}=34$ ,  $N_{2018}=78$ ,  $N_{2019}=73$ ) and tree-lined walkways ( $N_{2015-2016}=6$  and  $N_{2018-2019}=12$ ) in the city center of Strasbourg and in residential area (called “La Robertsau”,  $N_{2015}=20$ ,  $N_{2016}=39$ ,  $N_{2018}=0$  and  $N_{2019}=39$ ) (mean DD coordinates: 48.5793147°, 7.76771816°; see location details in Appendix A2) (21 occupied nest boxes in 2015, 31 in 2016, 28 in 2018 and 53 in 2019). The forest site (Forest) was located 20 km north of Strasbourg’s city center (mean DD coordinates: 48.6479622°; 7.83366664°; see location details in Appendix A2) in La Wantzenau (17 occupied nest boxes in 2015, 29 in 2016, 26 in 2018, and 37 in 2019).

The reproduction of great tit was monitored at each site from the end of March to the end of May. For each occupied nest box, we monitored the first clutch only: clutch size, hatching date ( $\pm 1$  d), and fledging number (14-16 days old) with regular visits to the nest boxes. The calculated hatching rate corresponds to the ratio of the number of hatchings to the clutch size, including nests with desertion at the egg stage where the final clutch size is known. The calculated fledging rate corresponds to the ratio of the fledging number to the number of hatchings for nests with at least one hatched nestling. The fledging number was estimated for all nests, including nests deserted at the incubation and rearing stages (the fledging number was 0) and was representative of global reproductive success during the first brood at each site. Females usually lay between 5 and 12 eggs per clutch, and the incubation lasted approximately 13 to 14 days. Nestlings usually leave the nest at 18 days of age and become independent after another three weeks. In 2015, adults were captured when nestlings were between 8 and 15 days old (to avoid nest desertion before 8 days of age or precocious fledging after 15 years of age). For each bird caught, 2-3 breast covering feathers were collected with tweezers for each individual for pollutant analysis. Feathers were kept in a plastic bag and stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until analysis.

### 2. Environmental parameters

### *Vegetation cover and vegetation sampling*

The GPS coordinates of each nest box were used to estimate the vegetation cover over a 50 m radius around each nest in 2016 ( $N_{\text{Urban}} = 76$  and  $N_{\text{Forest}} = 65$ ). This distance was based on the typical home range of a couple of great tit th shorter telomeres for urban birds (Ibáñez-Álamo et al., 2018, Demeyrier et al., 2016). Several categories of land usage were determined: no-vegetation surfaces (roads, bare rock, soil, and building), arable lands, high vegetation (forest, isolated trees, groves, and hedges), low vegetation (herbaceous), and water surfaces. For each nest, the percentage of each category was determined using QGIS from land use maps created by the LIVE (Laboratoire Image, Ville, Environnement, UMR 7362 Strasbourg France). In addition, leaf samples were collected during the breeding season at each site in 2015. Each sample was composed of 10 leaves of different tree species (i.e. common ash, pedunculate oak, country elm, hawthorn, and hazel, around 30 leaves per site) and frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$  for the measurement of pollutants.

### *Prey availability*

Great tits feed primarily on arthropods during the breeding period, while adults essentially feed their nestlings with caterpillars or spiders (Michalski et al., 2011). To estimate prey availability, invertebrates were sampled at each site three times during the breeding period in 2015 and six times in 2016 using a method modified from (Colas G. 1948). Invertebrates were collected by vigorously shaking a branch over a large umbrella (91.5 cm radius, that is, an area of  $2.63 \text{ m}^2$ ). The operation was repeated under 10 trees of different species, randomly chosen on each site for an overall representation of the invertebrate composition of the site. Some of the tree species sampled were the same at both sites, although the choice was more limited in urban areas, where many exotic and ornamental tree species were found. Collected invertebrates were classified into three categories: “caterpillars,” “spiders,” and “others,” and counted. Caterpillars and spiders were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  for the subsequent measurement of pollutants. Mean prey availability at each site was estimated by taking into account the average high vegetation area within the home range ( $A_{\text{HVmean}}$ ) ( $A_{\text{HVmean\_urban}} = 4779.0 \text{ m}^2$ ,  $A_{\text{HVmean\_forest}} = 6901.1 \text{ m}^2$ ) and the harvest area ( $A_{\text{U tot}}$ ) (i.e. ten times the umbrella area,  $2.63 \times 10 = 26.3 \text{ m}^2$ ). Calculations were performed for each spider and caterpillar sampling. More precisely, the following equation was used:

$$\text{prey availability}_{(\text{count})} = \text{harvested preys}_{(\text{count})} \times \frac{A_{\text{HVmean}}}{A_{\text{U tot}}}$$

### *Measurement of contaminants in biological samples*

The concentrations of 15 trace metal elements and metalloids (TMEs) were analyzed in leaves ( $N=8$ ), prey (caterpillars ( $N_{\text{urban}} = 9$  and  $N_{\text{forest}} = 6$ ), and spiders ( $N_{\text{urban}} = 10$  and  $N_{\text{forest}} = 6$ )), and bird feathers ( $N_{\text{urban}} = 13$  representing 12 nests and  $N_{\text{forest}} = 20$  in 18 different nests) collected from both the urban and forest sites in 2015.

Before TME analysis, biological samples were prepared and mineralized. Between 5 and 10 mg of feathers samples were washed three times with NaOH concentrated at  $0.25 \text{ mol L}^{-1}$  (3 mL) for 1 minute. The feathers were then rinsed three times with ultrapure water (3 mL) for 1 min. The final wash was performed with water (3 mL) for 1 h. Digestion was performed by heating the samples at  $60^{\circ}\text{C}$  with 65%  $\text{HNO}_3$  (1 mL) for 15 h in capped tubes. Ultrapure water was used to obtain a final volume of 5 mL. For vegetation, 200 mg of samples were subjected to the same digestion protocol without the washing step, and with 2 mL of 65%  $\text{HNO}_3$  with a final volume adjusted to 10 mL. Preys (spiders and caterpillars) were dried overnight at  $80^{\circ}\text{C}$ . The samples were then ground in a mortar, and 200 mg of dried samples were digested with 65%  $\text{HNO}_3$  (2 mL) for 15 h at  $60^{\circ}\text{C}$ . The final volume was adjusted to 10 mL using ultrapure water. For all samples, blanks were prepared and measured in the same manner as control contamination provided by the reagents and the laboratory environment.

The concentrations of the following elements were determined using inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) (Agilent 7700): aluminum (Al), arsenic (As), barium (Ba), cadmium (Cd), cerium (Ce), chromium (Cr), cobalt (Co), copper (Cu), lead (Pb), molybdenum (Mo), nickel (Ni), rubidium (Rb), strontium (Sr), vanadium (V), and zinc (Zn). The corresponding concentrations were determined using a calibration curve prepared by the dilution of a multi-element certified standard ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ , CPI International). Indium 10 ppb ( $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ , CPI International) was used as an internal standard (see Appendix B for the operational conditions and instrumental limits of detection of the ICP-MS analysis). The specificity of the analytical methods was evaluated by recovery measurements of the spiked samples. The recovery values were 90–110% for all the elements. Results are expressed in  $\text{mg kg}^{-1}$  of total weight for feathers and vegetation samples and in  $\text{mg kg}^{-1}$  of dry weight for prey.

### *Air pollution*

The air contaminants were trapped in each site with an XAD-2® passive air sampler and renewed every two weeks during 2015 and 2016. Due to the heterogeneity of the urban matrix, two

samplers were placed simultaneously: one in the city center and one in the residential area of La Robertsau. For the forest site, only one sampler was placed at a time. It represents three samplings per year in 2015 and 2016 for the forest site and six (2015) or seven (2016) sampling for the urban site. Contaminants were extracted using the methodology developed by (Al Dine et al. 2015) and (Lévy et al. 2018, 2020). This type of sampler allowed for the detection of four types of pollutants classified into eight categories according to their characteristics and toxicity: polychlorinated biphenyl (PCB) separated in dioxin-like PCBs (DL-PCBs) and non-dioxin-like PCBs (NDL-PCBs), polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), organochlorine pesticides (OCCs), and non-organochlorine pesticide components split into insecticides, herbicides, and fungicides (see Appendix C1 for a list of the pollutants in each category). For each sampling, the concentrations of pollutants in the same category were summed. Among the 169 air pollutants (measured in  $\text{ng m}^{-3}$ ) we aimed to identify, 89 had concentrations above their quantification limits (Lévy et al., 2018).

#### *Weather conditions and temperature*

A temperature logger (Thermochron iButton; Embedded Data Systems<sup>®</sup>) was placed under one nest box at the forest site, while two nest boxes were used at the urban site (one in the city center and one in the residential area of La Robertsau), protected from the sun, to measure ambient temperature (1 measure/h) between April and May in 2015 and 2016, but not in 2018 and 2019. Temperatures showed no significant differences between sites during the total reproductive period (LM:  $F = 0.946$ ,  $p = 0.39$ ). Temperature data from each site obtained with loggers were similar to those registered by the logger of the weather station of Météo-France in the city (station N°67482001, 8°34'55" N, 7°46'08" E) (Mann-Whitney-Wilcoxon test: Urban (center),  $W = 4019$  and  $p = 0.21$ ; Urban (residential),  $W = 3417$  and  $p = 0.93$ ; Forest,  $W = 3571$  and  $p = 0.65$ ). Therefore, temperature and daily precipitation data provided by Météo-France in 2015, 2016, 2018, and 2019 were used for the following analyses. For each occupied nest box, two periods were defined: the incubation period (14 days before hatching) and the rearing period (14 days after hatching, hatching date included). For nest failing before hatching, the incubation period was calculated as 14 days after the date of laying of the last egg (laying date of 1<sup>st</sup> egg + clutch size). For each period and for each nest, the average temperature ( $T_{\text{mean}}$ , in °C) and average daily temperature range ( $T_{\text{range}}$ , in °C) were calculated. The average daily rainfall rate (RR, in mm) and the number of rainy days (NbRD with a rainy day considered as a day with  $RR > 0$ ) during each

period were also calculated. More details on value of each weather parameter were provided in appendix C.5.

### **Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using R (version 3.6.2) in RStudio (R Development Core Team, 2021). The hatching date was converted in relative days from March 1<sup>st</sup> and scaled for the analyses including this parameter as an explanatory variable. The significance level alpha was set at 0.05. Predated nests or nests with dead adults inside were excluded from the analyses ( $N_{\text{urban}} = 2$  and  $N_{\text{forest}} = 8$ ; see Appendix 1 for more details).

#### *Differences in environmental parameters between sites*

Aerial pollutants, the TME concentrations in the biological tissues (leaves, invertebrates, and bird feathers), and vegetation cover between urban and forest sites were examined using principal component analyses (PCA) (“FactoMineR” package (Lê et al. 2008)). The values were scaled before the analyses. Missing values for feathers (26 %) due to concentrations below the quantification limit were imputed by neutral values with no influence on the results of the factor analysis (“missMDA” package from (Josse and Husson 2016)). Four separate PCAs were performed: (i) air pollution, (ii) feather pollutants, (iii) leaves and invertebrates (caterpillars and spiders) pollutants, and (iv) vegetation cover (see Appendix C for more details). The percentages of variation explained by the first two axes, PC1 and PC2, of the different PCAs were 71.1% for the air pollution PCA (Fig. 1A); 64.5% for the TME concentration in bird feathers PCA (Fig. 1C), 72.6% for the TME concentration in leaves and invertebrates PCA (Fig. 1B), and 61.4% for the vegetation cover PCA (Fig. 2A). Differences between sites along the PCA axes were tested using the Wilcoxon test for aerial pollutants and vegetal cover, and the Kruskal-Wallis rank sum test with Holm correction (function “dunn.test (method = “holm”)” in R) for biological tissues. Differences in prey availability were tested using linear models with the interaction between the type of prey (i.e. caterpillars or spiders) and the site as an explanatory variable. The normality of the residuals was verified using the Kolmogorov-Smirnov test and heteroscedasticity with a Bartlett test. *Post-hoc* differences between sites per year and between years per site were tested using Tukey’s test. As heteroscedasticity was observed for the type of prey, a variance correction was applied (function gls with “varIdent” option, as described by (Zuur et al. 2009)).

#### *Differences in reproductive outputs between sites*

Generalized linear models (GLMs) with the Poisson family (link function: “log”) followed by type III Wald tests were used for clutch size, fledging number, and hatching date. GLM with the binomial family was used for the hatching and fledging rates (see reproduction monitoring for definition, link function: “logit”). The models included the site, the year and the interaction between site and year as the explanatory variables. Non-significant interactions were excluded from the models if  $p > 0.10$ . The overdispersion of all models was verified (ratio model deviance on model df residual). If data were over-dispersed (ratio  $> 1$ ), we used quasi-binomial or quasi-Poisson families. Some nests were excluded from the models due to missing or imprecise data (two nests excluded for clutch size and six for hatching and fledging rates, fledging numbers, and hatching dates). The hatching date and fledging rate were calculated, excluding nests in which no eggs hatched ( $N = 26$ ).

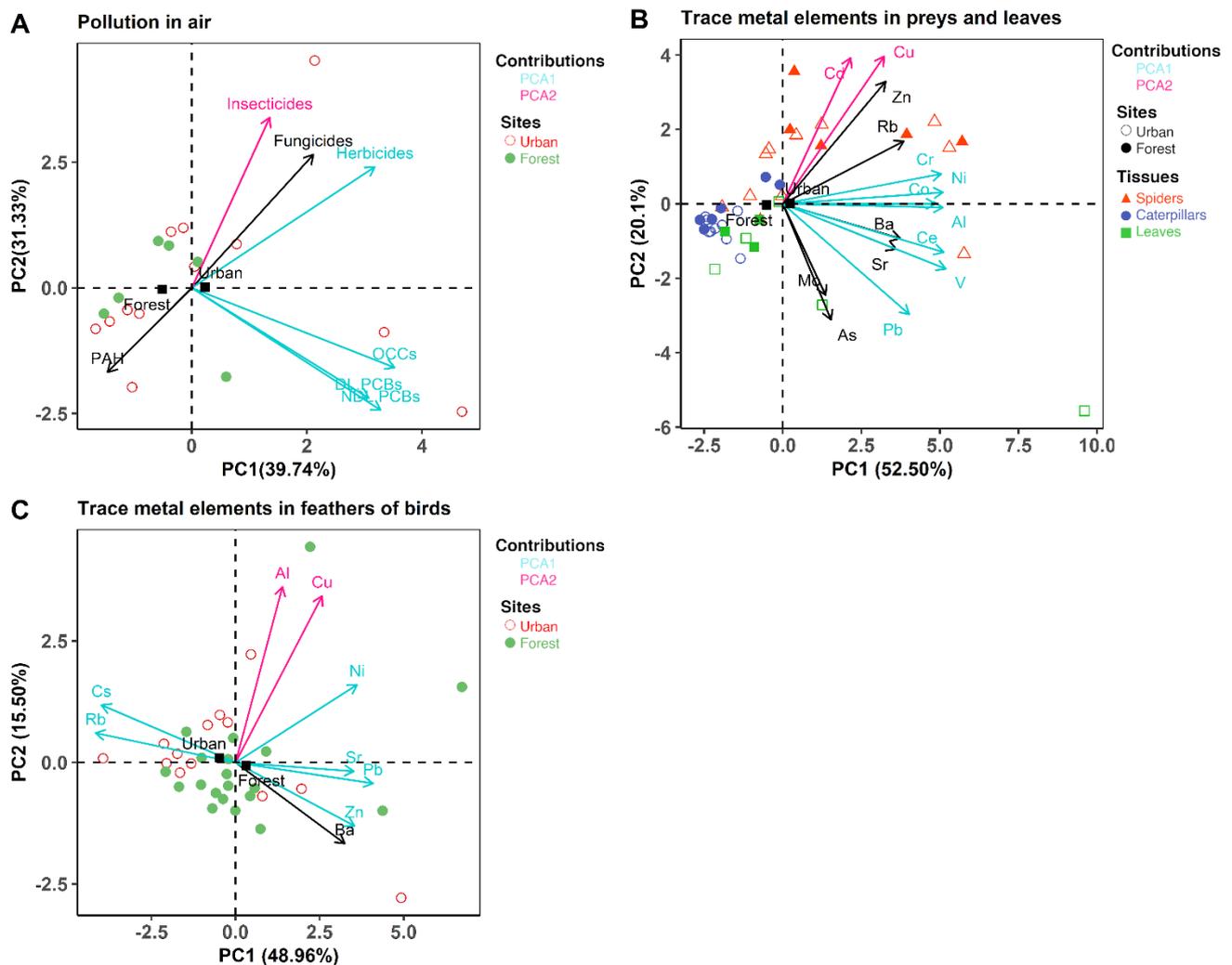
### *Effect of weather on reproduction*

Weather parameters calculated for the incubation and rearing period of each nest were probed using PCA (“FactoMineR” package). The values were scaled before the analyses. The first two axes, PC1 and PC2, of weather PCA explained 75.5% of the inter-annual variation. These two components were used as composite variables to describe the weather conditions during reproduction for each nest. Differences between years in PC1 and PC2 were tested using the Kruskal-Wallis rank sum test with Holm correction (function “dunn.test (method = “holm”)” in R). These components were further used in generalized linear models (Poisson or binomial depending on parameters; see above for more details) followed by type III Wald tests, with reproduction parameters (fledging number, hatching, and fledging rate). For some nests included in the reproduction parameter analysis ( $N = 8$ ), the weather parameters could not be calculated because of the unknown hatching date. These nests were therefore excluded from the analyses. The analyses included PC1 and PC2 in interaction with site as explanatory variables, the hatching date as a covariable, and the year as a random effect. For hatching models, only PC1 was included in the models because PC2 was mainly related to temperature during rearing (see Results for more details). Non-significant interactions were removed sequentially from the models if  $p > 0.10$ ).

## Results

### 1. Environmental parameters in urban and forest sites

For air pollution, the OCCs, herbicides, and PCBs (NDL and DL) were identified as the major contributors to PC1, whereas the insecticides were the main contributors to PC2 (Fig. 1A and Appendix C1). No significant differences were observed between sites in PC1 (Wilcoxon:  $W = 34$ ,  $p = 0.70$ ) or PC2 (Wilcoxon:  $W = 43$ ,  $p = 0.77$ ).



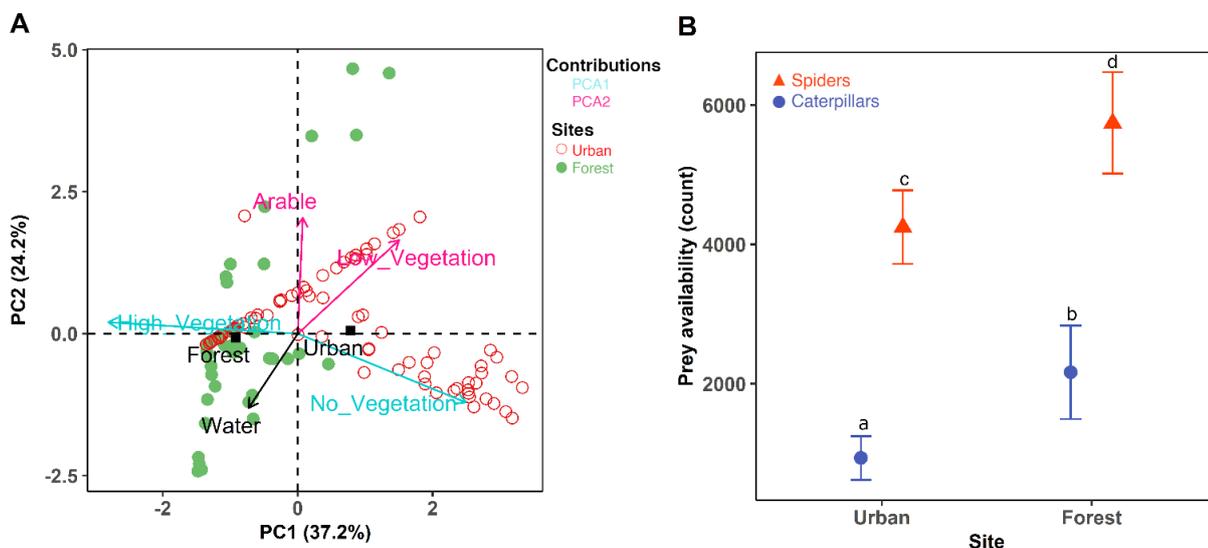
**Fig. 1** Representation of principal component analyses of pollution signature in (A) air, (B) prey and leaves, and (C) bird feathers in urban and forest sites. The variables contributing most to each axis ( $\cos^2 > 0.5$  and/or contribution  $> 20\%$ ,  $\cos^2$  corresponds to projection quality of the variable on the given dimension) are shown in different colors, and the mean coordinates of each site are represented by black squares. Details of each variable contribution are provided in Appendix C.

For the TME concentrations in the leaves and invertebrates, Al, Cr, Co, Ni, Ce, Pb, and V were identified as the major contributors to PC1, whereas Cu and Cd were the major contributors to PC2 (Fig. 1B) (see Appendix C2). No significant differences were observed between sites (Wilcoxon for PC1:  $W = 180$ ,  $p = 1$  and PC2:  $W = 130$ ,  $p = 0.16$ ). However, significant differences were observed between the biological tissues (Fig. 1B; Kruskal-Wallis for PC1,  $\chi^2 = 20.05$  and  $p < 0.001$ ; Kruskal-Wallis for PC2,  $\chi^2 = 20.23$  and  $p < 0.001$ ). PC1 separated caterpillars from

spiders and leaves that contained higher concentrations of metals ( $p_{\text{caterpillars-spiders}}$  and  $p_{\text{caterpillars-leaves}} < 0.001$  and  $p_{\text{leaves-spiders}} = 0.18$ ). PC2 separated spiders, rich in Cu and Cd, from caterpillars and leaves ( $p_{\text{caterpillars-spiders}}$  and  $p_{\text{leaves-spiders}} < 0.001$  and  $p_{\text{caterpillars-leaves}} = 0.17$ ).

For the TME concentrations in bird feathers, Ni, Cs, Rb, Sr, Zn, and Pb were identified as the major contributors to PC1, whereas Al and Cu were the major contributors to PC2 (Fig. 1C) (see Appendix C3). There were no significant site effects on either axis (Wilcoxon for PC1,  $W = 94$  and  $p = 0.19$ ; PC2,  $W = 168$  and  $p = 0.17$ ).

The vegetation cover differed significantly between sites on both PC1 ( $W = 4240.5$ ,  $p < 0.01$ ) and PC2 ( $W = 2949.5$ ,  $p = 0.047$ ). PC1 was negatively related to the high vegetation surfaces and positively related to the non-vegetal surfaces (Fig. 2A) (see Appendix C4). The major contributors of PC2 were arable and had low vegetation surfaces (Fig. 2A) (see Appendix C4). The urban site was mainly characterized by a high proportion of non-vegetal surfaces on PC1 and, to a lesser extent, by a higher proportion of low vegetation and arable surface on PC2. The forest site was mainly characterized by high vegetation.



**Fig. 2** (A) Principal component analysis of vegetal cover in the vital domain of reproductive birds and (B) invertebrate availability (count). See Appendix C4 for details of each variable contribution for A. In B, different letters represent significant differences in post-hoc tests between sites. Results are shown as means and standard errors.

Regarding prey availability, the number of prey was significantly different between the sites (LM,  $\chi^2_{\text{site}} = 6.37$ ,  $p = 0.01$ ) (Fig. 2B), and between the type of prey (LM,  $\chi^2_{\text{type}} = 41.71$ ,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2B). The interaction between the site and type of prey was not significant (LM,  $\chi^2_{\text{site*type}} = 0.06$ ,  $p = 0.81$ ). The average number of prey was lower at the urban site than at the forest site (Tukey,  $p$

= 0.02) (Fig. 2B), and the average number of spiders was higher than the average number of caterpillars (Tukey,  $p < 0.001$ ) (Fig. 2B).

## 2. Differences in reproductive outputs between sites and years

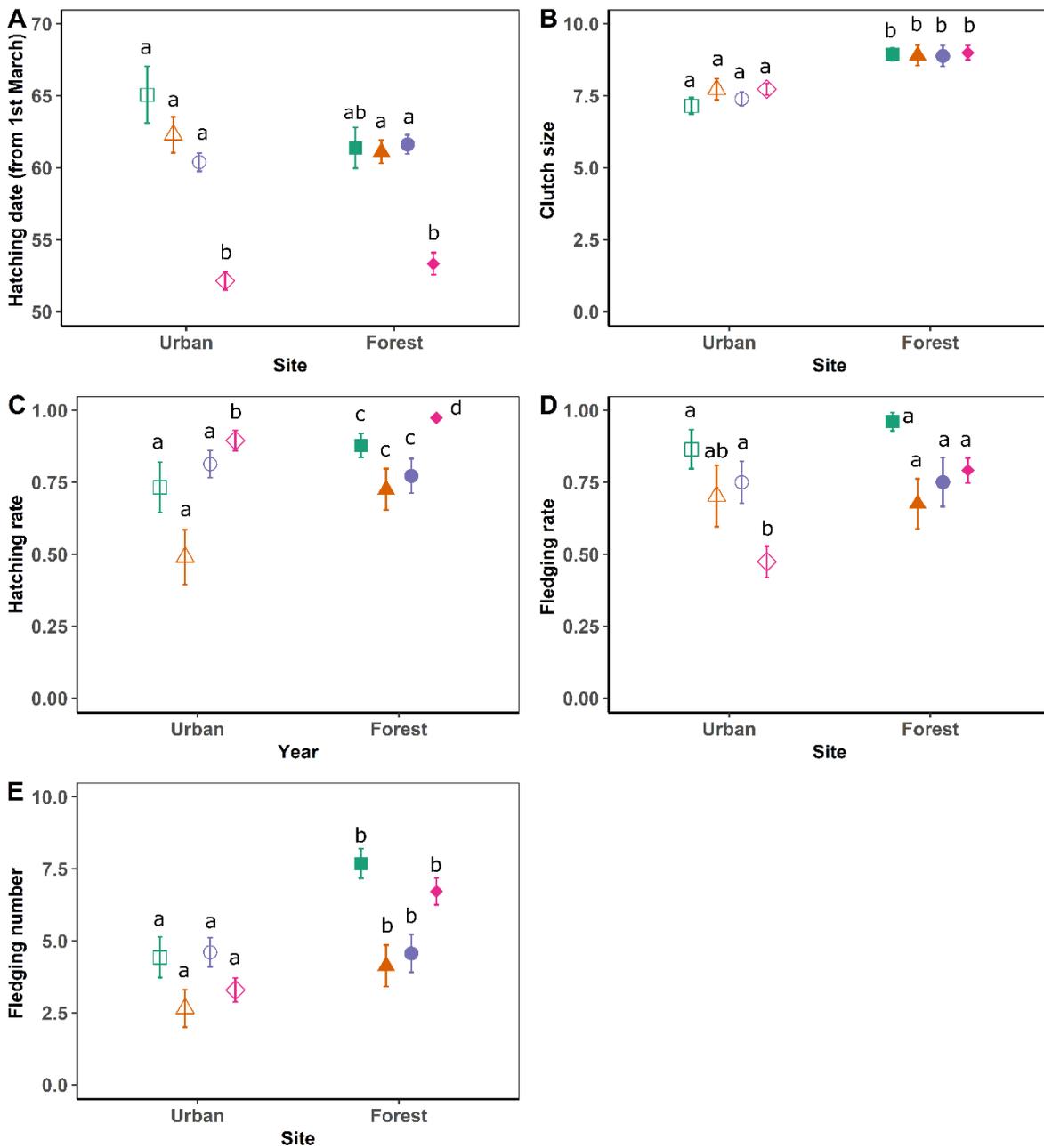
**Table 1.** Results of statistical analyses of reproduction parameters between urban and forest birds during four different years

Variables	Hatching date (From March 1st)		Clutch size		Hatching rate	
	F (df)	p	F (df)	p	F (df)	p
	N=204		N=230		N=226	
Site	4.98 (1,197)	<b>0.03</b>	45.08 (1, 227)	<b>&lt;0.001</b>	6.34 (1, 212)	<b>0.012</b>
Year	37.84(3,197)	<b>&lt;0.001</b>	0.56 (3, 227)	0.64	12.87 (3, 212)	<b>&lt;0.001</b>
Site*Year	3.86 (3,193)	<b>0.01</b>				
	Fledging rate		Fledging number			
	N=198		N=224			
Variables	F (df)	p	F (df)	p		
Site	2.26 (1, 191)	0.13	6.45 (1, 217)	<b>0.01</b>		
Year	6.47 (3, 191)	<b>&lt;0.001</b>	2.08 (3, 217)	0.10		
Site*Year	5.06 (3, 191)	<b>&lt;0.001</b>	2.53 (3, 217)	0.06		

df = degree of freedom. These results were obtained using generalized linear models followed by the type III ANOVA. See the Methods section for further details.

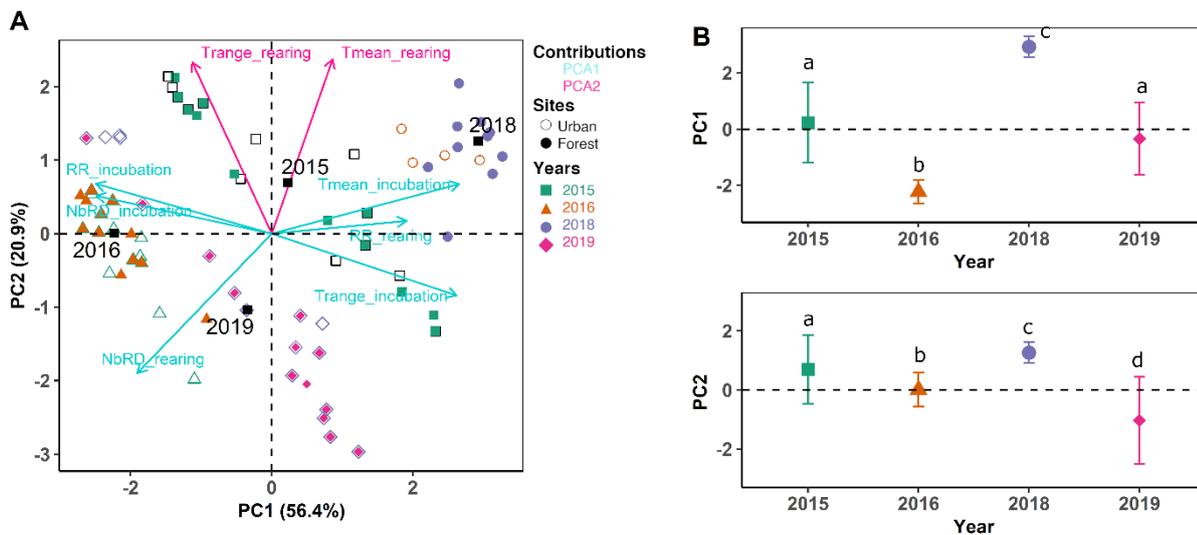
The hatching date was significantly different between sites and between years for each site (Table 1 and Fig. 3A). Earlier hatching dates were observed in 2019 compared to all other years in urban site (Table 1) (Tukey,  $p_{2019\text{-other years}} < 0.001$  and all other  $p > 0.62$ ) and forest site (Tukey,  $p_{2019\text{-other years}} < 0.005$  and  $p_{2019\text{-2015}} > 0.07$ ), except for 2015 (Fig. 3A). In contrast, the clutch size was significantly different between the sites but not between the years (Table 1), with a smaller clutch for urban breeders (Tukey,  $p < 0.001$ ) (Fig. 3B for clutch size).

The site effect was significant in the hatching rate, lower in urban compared to forest site. A yeareffect on the hatching rate was also significant, higher in 2019 than in other years (Tukey,  $p < 0.005$ ) (Table 1, Fig. 3C). The interaction between site and year was significant for the fledging rate (Table 1). For a given year, the fledging rate was not different between the urban and forest sites. A lower fledging rate was observed in the urban site in 2019 compared to the urban site in 2015 (Tukey,  $p = 0.03$ ) and 2018 (Tukey,  $p = 0.03$ ) and compared to the forest site (Tukey,  $p < 0.001$ ) whatever the years. A lower fledging number was observed in urban sites compared to the forest site (Tukey,  $p < 0.02$ ) whatever the years.



**Fig. 3** Reproductive parameters for birds at urban and forest sites across the years. Different letters represent significant differences between years for a same site and between sites for a same year. Results are shown as means and standard errors. Squares, triangles, circles, and diamonds represent 2015, 2016, 2018, and 2019 respectively

### 3. Relationship between weather and reproduction parameters



**Fig. 4** Representation of (A) PCA of weather parameters during the reproduction of birds and (B) inter-annual differences on PC1 and PC2. See Appendix E for details of each variable contribution for A. Mean coordinates of each site are represented by black squares. In B, different letters represent significant differences in post-hoc tests. Results are shown as means and standard deviations.

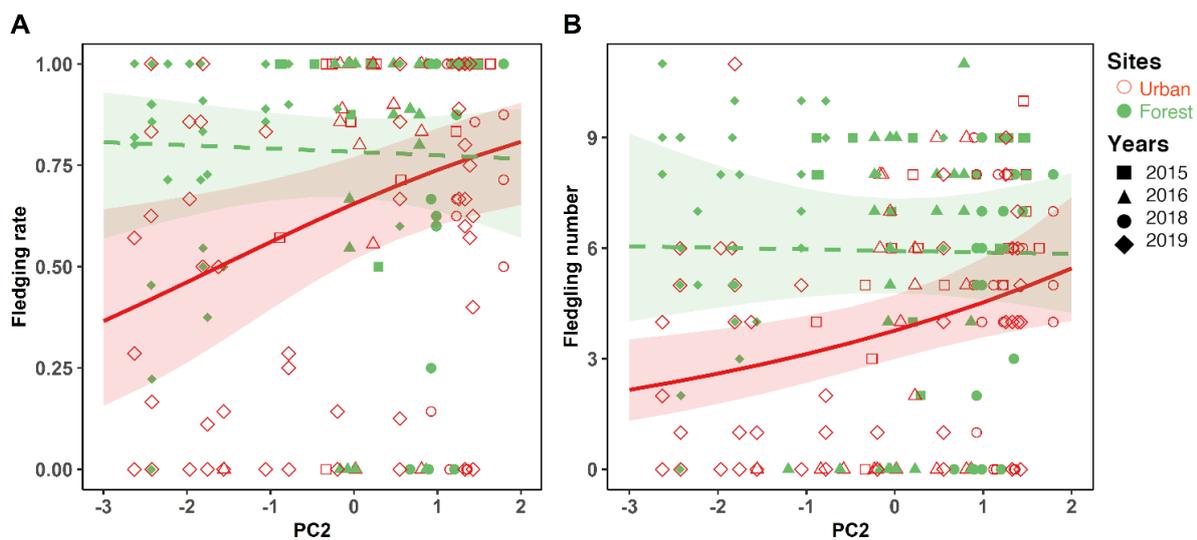
First, the weather parameters during the incubation and rearing periods according to years were analyzed using the two axes of the PCA. As a result, PC1 was found to be negatively correlated with temperature ( $T_{\text{mean}}$  and  $T_{\text{range}}$ ) during incubation and RR during rearing and positively related to rain (RR during incubation, NbRD during incubation, and NbRD during rearing) (Fig. 4A) (see Appendix E). PC2 was positively correlated with temperature ( $T_{\text{mean}}$  and  $T_{\text{range}}$ ) during rearing. Significant differences between years were revealed for both PC1 and PC2 (Fig. 4B) (Kruskall-Wallis for PC1,  $\chi^2 = 166.55$  and  $p < 0.001$ ; Kruskal-Wallis for PC2,  $\chi^2 = 82.48$  and  $p < 0.001$ ). Years were significantly different on PC1, except in 2015 and 2019, which were not different ( $p_{2015-2019} = 0.19$  and all others  $p < 0.001$ ). In contrast, all years were different for PC2 ( $p < 0.01$ ). These results indicate that the year 2015 was characterized by high temperatures during rearing, 2016 by low temperature during incubation and high precipitation during the reproduction period (incubation and rearing). Year 2018, in opposition to the year 2016 is characterized by high temperatures during reproduction period, low precipitation during the incubation and some occasional rainfall during rearing. Year 2019 is mostly characterized by low temperatures during the rearing period.

**Table 2.** Results of statistical analyses of reproduction parameters with PC1 and PC2 of weather parameters PCA

Variables	Hatching rate		Fledging rate		Fledging number	
	N=218		N=198		N=217	
	X <sup>2</sup> (df)	p	X <sup>2</sup> (df)	p	X <sup>2</sup> (df)	p
Site	11.31 (1, 210)	0.03	6.14 (1,189)	0.04	29.86 (1,199)	<0.001
PC1	0.06 (1, 210)	0.80	0.04 (1,189)	0.82	0.22 (1,199)	0.64
PC2			6.25 (1,189)	0.01	8.01 (1,199)	0.004
Hatching date	4.02 (1, 210)	0.05	0.32 (1,189)	0.57	0.054 (1,199)	0.81
Site*PC1	6.25 (1,210)	0.01				
Site*PC2			5.57 (1,189)	0.03	7.37 (1,199)	0.007

df = degree of freedom. These results were obtained using generalized linear models followed by the type III Wald test. See the Methods section for further details.

Next, we analyzed the interactions between breeding parameters and weather principal components. There was a significant interaction between the site and PC1 for the hatching rate. This interaction was highlighted by a negative correlation for urban sites and a positive correlation for forest site (Table 2) (value<sub>urban</sub> = -0.009 and value<sub>forest</sub> = 0.25) (Tukey, p = 0.012), but they were not significant (p<sub>urban</sub> = 0.95, p<sub>forest</sub> = 0.11). The fledging rate and number were not significantly correlated with PC1 (Table 2); however, these parameters were significantly correlated with the interaction between PC2 and site (Table 2 and Fig. 5). The fledging rate and number increased with increasing PC2 (positively correlated to temperature during rearing) in the urban site (Tukey, p = 0.02 for fledging rate, p = 0.01 for fledging number) but not in the forest site (Tukey, p > 0.05).



**Fig. 5** Correlation between PC2 of PCA with weather parameters and (A) fledging rate and (B) fledging number. Significant slopes are represented in solid lines, while non-significant slopes are represented with dashed lines.

## Discussion

The first aim of this study was to evaluate the differences in reproductive success between urban and forest sites characterized by multiple environmental parameters, including pollution parameters, analyses of vegetal cover, and food availability. The second aim was to test the hypothesis of the higher sensitivity of urban birds to harsh weather conditions, leading to yearly variations in reproductive success differences between sites.

Our study revealed that the hatching date did not differ according to the site, in contrast to previous studies (Bailly et al., 2016; Charmantier et al., 2017; Wawrzyniak et al., 2015b). Some studies have shown that advanced hatching dates in cities are related to the heat halo associated with concrete surfaces (Chmielewski et al., 2013). However, in the present study, no variation in temperature was observed between the urban and forest sites, which could explain the similar hatching date found.

In contrast, the clutch size and hatching rate of urban birds in our study were lower than those of forest birds, regardless of the year and weather parameters, as observed in several other studies on great tits. Some studies have reported on the impact of pollutant exposure on these breeding parameters (Scheuhammer 1987; Koivula and Eeva 2010; Hellou et al. 2013). However, no differences in pollutant concentration was observed between the urban and forest sites, neither for air pollutants nor for TME pollution in leaves, prey, and feathers, contrary to studies that showed a higher concentration of TME in the feathers of urban blackbirds (*Turdus merula*) (Scheifler et al. 2006; Meillère et al. 2016) and house sparrow (Bichet et al. 2013) in other cities. Moreover, the concentrations measured in Strasbourg were much lower than those reported in other cities. For example, the Pb feather concentration obtained in Strasbourg (on average 2.53 mg/kg) was much lower than that found in sparrows in other French cities, such as Paris (19.54 mg/kg), Gennevilliers (18.70 mg/kg), or Berk (6.7 mg/kg) (Bichet et al. 2013), suggesting that the city of Strasbourg could be a low metal-polluted site. Exposure to pollutants, therefore, does not appear to be a reason for the reproductive differences observed between urban and forest sites. However, the sample size of this study was small, and further research is required to validate this hypothesis (e.g. by increasing the number of replicates and distinguishing between urban and suburban areas, for example). Moreover, contaminants are concentrated in new feathers formed during the molting of individuals, which generally occur at the end of the breeding period. The contamination levels on bird feathers could be related to the movement of individuals between sites during winter. Nonetheless, to date, none of the recaptured birds had

previously been captured at a different site, suggesting a low displacement rate between sites. Other environmental constraints, such as noise or light pollution, can cause chronic stress in individuals, leading to the production of reactive oxygen species (Isaksson 2015) and oxidative stress. Chronic exposure to a stressful environment can alter the fertility of individuals, and thus the number of laid eggs for females or egg fertilization for males. Stress constraints could also increase the corticosterone concentration (Meillère et al. 2016; Marasco et al. 2017), reduce parental care (Angelier and Chastel 2009), potentially leading to nest desertion, in favor of parental survival. The smaller clutch size and the lower hatching rate could therefore be related to a lower egg quality in the city, as observed in other studies on urbanization (Isaksson et al. 2008; Toledo et al. 2016), as well as to a lower fecundity due to physiological stress (Bize et al. 2008).

Although no differences in chemical pollution were observed, our results highlighted lower prey availability. The urban environment in Strasbourg was mainly characterized by low vegetal and non-vegetal surfaces. Surprisingly, there was also a notable part of arable surfaces, probably due to the presence of fields in the suburban part of Strasbourg (*La Robertsau*). Reduced vegetation cover in cities has a direct impact on invertebrate populations (Thomas et al. 2001, Jones and Leather 2012). The number of prey available for each nest on the urban site in our study was, on average, two times less than that for the forest site. This lack of prey is likely to impose an increased effort on urban adult birds to search for prey: they would need to search over a greater distance (Bonier et al., 2007a; Stauss et al., 2005), which increases the time spent searching for prey (Jarrett et al., 2020; Naef-Daenzer and Keller, 1999). Moreover, we also found that the number of caterpillars at both sites was much lower than the number of spiders. Caterpillars are essential for nestling growth, and spiders are the only alternative prey for the feeding of young chicks. Spiders remain less nutritive and their substitution to caterpillars can lead to delays in the growth of nestlings (Arnold et al., 2010; Naef-Daenzer et al., 2000). The association between the amount of food during egg laying and clutch size in cities has already been demonstrated in great tits (Wawrzyniak et al., 2020, 2015b) and blue tits (Marciniak et al., 2007). Some studies point to the fact that low food availability leads to a reduction in clutch size due to a suboptimal diet (Wawrzyniak et al., 2015b) or to increased competition for resources in the city (Chamberlain et al., 2009). However, other studies point out that the reduced clutch size in urban sites can be considered as an adaptation to environmental constraints (Boyce and Perrins 1987). More precisely, the energy expenditure associated with foraging is greater in cities (Hinsley et

al., 2008). As a smaller clutch size requires less food after hatching, this would allow parents to invest enough to ensure the survival of their young (Martin et al., 2000). Our results showed that while the fledging number was generally lower at the urban site than at the forest site, the fledging rate did not differ between the two environments (except in 2019). This suggests that different reproductive strategies exist between urban and forest areas and, more generally, a difference in the pace of life (Charmantier et al., 2017; Sepp et al., 2017). Urban individuals tend to have a slower pace of life and invest more in their own survival than in reproduction, thus laying smaller clutches and rearing fewer chicks than their counterparts in the forest. This hypothesis on the pace of life should be tested by simultaneously measuring several life history traits. This hypothesis could also be put forward to explain that clutch size is the only reproductive parameter that did not vary between years. Similar results were also observed in a long-term study of the same species (Wawrzyniak et al., 2020, 2015).

Interestingly, the year 2019 was characterized by an earlier hatching date and a higher hatching rate at the urban site than at the forest site. The hatching date was, on average, 8–10 days earlier than in other years. In this study, we did not consider the winter temperature. However, the year 2019 seemed to be characterized by higher winter temperatures than the seasonal averages (meteofrance.fr, 2021). Many studies have reported on advances in breeding following a significant increase in temperature in late winter or warmer spring (Charmantier et al. 2008; Schaper et al. 2012). An advance in bird reproduction allows a match or a reduction in the mismatch between the food peak and the period of higher energetic nestling needs. This earlier start of reproduction in 2019 was also associated with a higher hatching rate compared to other years. The good hatching rate in 2019 would therefore probably be linked to favorable weather conditions during incubation, in contrast to 2016, which was characterized by cold and wet weather. Cold weather could lead to difficulty in maintaining egg temperatures above the optimal growth temperatures, leading to embryonic growth delays and mortality (Durant et al., 2013; Webb, 1987) and increased female energy expenditure during incubation (Bryan & Bryant, 1999). This results in a trade-off between self-maintenance and incubation time, leading to nest desertion. However, weather parameters alone do not explain all observed differences, especially between 2019 and 2018, because the two years have comparable weather conditions during incubation. This suggests that other environmental parameters, such as the fluctuation of prey availability that are not dependent on weather parameters, may also influence the hatching rate.

For the fledging rate, our study revealed differences between years and within sites for the same year whereas it was not significant for fledging number. However, both fledging number and fledging rate were positively correlated with PC2 weather only in urban areas and not in forest sites. The fledging number calculated here represents the reproductive success of breeders, including all failed nests (incubation or rearing), whereas the annual mean fledging rate is representative of nestling mortality during rearing (excluding the deserted nests during incubation). In the present study, high temperatures during the rearing period increased fledging in the city, but also increased their survival. A lower urban fledging rate was observed in 2019, the coldest of the four years (during rearing). However, no difference was observed at the forest site for this parameter. Previous studies have already shown a positive correlation between fledging survival with temperature, and a negative correlation with heavy rains (Dawson et al., 2005; Dawson and Bortolotti, 2000; Eeva et al., 2002; Kosicki, 2012; Krijgsveld et al., 2003). Low temperatures, especially when chicks are thermo-dependent (Dawson et al., 2005), and the negative impact of heavy rain on prey availability and catching (Avery and Krebs, 2008; Dawson and Bortolotti, 2000), led to nestlings suffering from severe hypothermia and/or starvation, increasing the risk of death. Adults may also have more difficulties meeting their own needs (Öberg et al., 2015), which in turn may limit the clutch size, due to the energetic requirements of broods with resource availability (Wawrzyniak et al., 2020). The lower reproductive success observed in urban sites could therefore be directly related to inadequate food availability, as found in several other studies (Seress et al. 2012, Caizergues et al. 2021). The food limitation observed in urban sites seems to be exacerbated by unfavorable weather during reproduction, leading to a decrease in urban productivity and higher nestling mortality. On the contrary, in forests where the quantity of prey was higher, the weather effect had a mitigating impact on birds. This result is in contrast with a long-term study showing that only the forest fledging number was correlated with caterpillar abundance (Wawrzyniak et al., 2020). Unfavorable climatic conditions can also increase corticosterone concentrations in parents (Cīrule et al., 2017; Wingfield, 1988), which tends to be higher in urbanized areas (Marasco et al., 2017; Meillère et al., 2016). However, it is known that high corticosterone enhances the probability of desertion (Love et al., 2004; Thierry et al., 2013), and urban birds during bad years as 2019 or 2016 potentially invested less in their reproduction.

Finally, contrary to our initial hypothesis that proposed a greater inter-annual variation in the reproductive success of urban birds due to the strongest effect of weather, low inter-annual

variations in fledging number were observed for each site. Fledging number remained constantly lower in urban site. The mean fledgling number in cities was never above 5 and ranged from a mean of 2.6 to 4.6 fledglings, depending on the years, whereas it ranged from 4.1 to 7.7 fledglings in the forest site. This result suggests a higher mortality of nestlings in cities, probably due to the food quantity limitation observed in the urban site, but it can also suggest that urban birds would invest more in their own survival than parental care, as described in the slow pace of life theory, especially during harsh years when these constraints increase. This result highlights that urban constraints, especially in terms of food availability, could considerably limit the fledging number, especially during harsh years. This lower productivity would lead to a decline in the population of great tits in cities, particularly if one tough year followed another. It is worth noting that a lower fledgling number may be compensated by a higher survival, especially in winter. However, to determine whether urban populations are sustainable or whether they are maintained due to continuous immigration from rural areas, there is a need to measure the rates of survival, recruitment, and immigration.

In conclusion, in a medium-sized city, such as Strasbourg, the constraints linked to urbanization seem to be mainly related to the reduction of the vegetation cover, which limits the availability of food for insectivorous passerines, compared to other cities where birds also have to deal with higher levels of chemical pollution. Moreover, some reproductive parameters depend on the additive effects of weather conditions and the urban environment, especially during the rearing of offspring. Nevertheless, across the years, fledging numbers tend to be similar in urban environments, suggesting a threshold of breeding performance that parents cannot exceed, supporting the slow pace of life theory.

## References

- Al Dine EJ, Mokbel H, Elmoll A, et al (2015) Concomitant evaluation of atmospheric levels of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, and polycyclic aromatic hydrocarbons in Strasbourg (France) using pine needle passive samplers. *Environ Sci Pollut Res* 22:17850–17859. doi: 10.1007/s11356-015-5030-5
- Albers PH (2006) Birds and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Avian Poult Biol Rev* 17:125–140
- Angelier F, Chastel O (2009) Stress, prolactin and parental investment in birds: A review. *Gen Comp Endocrinol* 163:142–148. doi: 10.1016/j.ygcen.2009.03.028
- Arnold KE, Ramsay SL, Henderson L, Larcombe SD (2010) Seasonal variation in diet quality: antioxidants, invertebrates and blue tits *Cyanistes caeruleus*. *Biol J Linn Soc* 99:708–717. doi: 10.1111/j.1095-8312.2010.01377.x
- Avery MI, Krebs JR (2008) Temperature and foraging success of Great Tits *Parus major* hunting for spiders. *Ibis* (Lond 1859) 126:33–38. doi: 10.1111/j.1474-919X.1984.tb03661.x
- Bailly J, Faivre B, Bernard N, et al (2017) Multi-Element Analysis of Blood Samples in a Passerine Species: Excesses and Deficiencies of Trace Elements in an Urbanization Study. *Front Ecol Evol* 5:6. doi: 10.3389/fevo.2017.00006
- Bailly J, Scheifler R, Berthe S, et al (2016) From eggs to fledging: Negative impact of urban habitat on reproduction in two tit species. *J Ornithol* 157:377–392. doi: 10.1007/s10336-015-1293-3
- Berglund ÅMM, Sturve J, Förlin L, Nyholm NEI (2007) Oxidative stress in pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings from metal contaminated environments in northern Sweden. *Environ Res* 105:330–339. doi: 10.1016/j.envres.2007.06.002
- Biard C, Brischox F, Meillère A, et al (2017) Growing in cities: an urban penalty for wild birds? A study of phenotypic differences between urban and rural great tit chicks (*Parus major*). *Front Ecol Evol* 5:1–14. doi: 10.3389/fevo.2017.00079
- Bichet C, Scheifler R, Cœurdassier M, et al (2013) Urbanization, trace metal pollution, and malaria prevalence in the house sparrow. *PLoS One* 8:e53866. doi: 10.1371/journal.pone.0053866
- Bize P, Devevey G, Monaghan P, et al (2008) Fecundity and survival in relation to resistance to oxidative stress in a free-living bird. *Ecology* 89:2584–2593. doi: 10.1890/07-1135.1
- Bonier F, Martin PR, Wingfield JC (2007) Urban birds have broader environmental tolerance. *Biol Lett* 3:670–673. doi: 10.1098/rsbl.2007.0349
- Boyce MS, Perrins CM (1987) Optimizing great tit clutch size in a fluctuating environment. *Ecology* 68:142–153. doi: 10.2307/1938814
- Bryan SM, Bryant DM (1999) Heating nest-boxes reveals an energetic constraint on incubation behaviour in great tits, *Parus major*. *Proc R Soc B Biol Sci* 266:157–162. doi: 10.1098/rspb.1999.0616
- Buse A, Dury SJ, Woodburn RJW, et al (1999) Effects of elevated temperature on multi-species interactions: the case of Pedunculate Oak, Winter Moth and Tits. *Funct Ecol* 13:74–82. doi: 10.1046/j.1365-2435.1999.00010.x
- Caizergues AE, Charmantier A, Lambrechts MM, et al (2021) An avian urban morphotype: how the city environment shapes great tit morphology at different life stages. *Urban Ecosyst* 24:929–941. doi: 10.1007/s11252-020-01077-0
- Chamberlain DE, Cannon AR, Toms MP, et al (2009) Avian productivity in urban landscapes: A review and meta-

- analysis. *Ibis* (Lond 1859) 151:1–18. doi: 10.1111/j.1474-919X.2008.00899.x
- Charmantier A, Demeyrier V, Lambrechts M, et al (2017) Urbanization is associated with divergence in pace-of-life in great tits. *Front Ecol Evol* 5:40–47. doi: 10.3389/fevo.2017.00053
- Charmantier A, McCleery RH, Cole LR, et al (2008) Adaptive Phenotypic Plasticity in Response to Climate Change in a Wild Bird Population. *Science* (80- ) 320:800–803. doi: 10.1126/science.1157174
- Chmielewski F-M, Blümel K, Scherbaum-Heberer C, et al (2013) A model approach to project the start of egg laying of Great Tit (*Parus major* L.) in response to climate change. *Int J Biometeorol* 57:287–297. doi: 10.1007/s00484-012-0553-7
- Cirule D, Krama T, Krams R, et al (2017) Habitat quality affects stress responses and survival in a bird wintering under extremely low ambient temperatures. *Sci Nat* 104:99. doi: 10.1007/s00114-017-1519-8
- Colas G. (1948) *Guide de l'Entomologiste*, Editions N. Persée - Portail des revues scientifiques en SHS
- Cormont A, Vos C, van Turnhout C, et al (2011) Using life-history traits to explain bird population responses to changing weather variability. *Clim Res* 49:59–71. doi: 10.3354/cr01007
- Cox AR, Robertson RJ, Lendvai AZ, et al (2019) Rainy springs linked to poor nestling growth in a declining avian aerial insectivore (*Tachycineta bicolor*). *Proc R Soc B Biol Sci* 286:20190018. doi: 10.1098/rspb.2019.0018
- Dawson RD, Bortolotti GR (2000) Reproductive success of American Kestrels: the role of prey abundance and weather. *Condor* 102:814–822. doi: 10.1093/condor/102.4.814
- Dawson RD, Lawrie CC, O'Brien EL (2005) The importance of microclimate variation in determining size, growth and survival of avian offspring: Experimental evidence from a cavity nesting passerine. *Oecologia* 144:499–507. doi: 10.1007/s00442-005-0075-7
- Demeyrier V, Lambrechts MM, Perret P, Grégoire A (2016) Experimental demonstration of an ecological trap for a wild bird in a human-transformed environment. *Anim Behav* 118:181–190. doi: 10.1016/j.anbehav.2016.06.007
- Durant SE, Hopkins WA, Hepp GR, Walters JR (2013) Ecological, evolutionary, and conservation implications of incubation temperature-dependent phenotypes in birds. *Biol Rev* 88:499–509. doi: 10.1111/brv.12015
- Eeva T, Lehikoinen E (1995) Egg shell quality, clutch size and hatching success of the great tit (*Parus major*) and the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) in an air pollution gradient. *Oecologia* 102:312–323. doi: 10.1007/BF00329798
- Eeva T, Lehikoinen E (1996) Growth and mortality of nestling great tits (*Parus major*) and pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) in a heavy metal pollution gradient. *Oecologia* 108:631–639. doi: 10.1007/BF00329036
- Eeva T, Lehikoinen E, Rönkä M, et al (2002) Different responses to cold weather in two pied flycatcher populations. *Ecography (Cop)* 25:705–713. doi: 10.1034/j.1600-0587.2002.250606.x
- Gil D, Brumm H (2013) *Avian Urban Ecology*. Oxford University Press
- Goyer RA (1997) Toxic and essential metal interactions. *Annu Rev Nutr* 17:37–50. doi: 10.1146/annurev.nutr.17.1.37
- Hallinger KK, Cristol DA (2011) The role of weather in mediating the effect of mercury exposure on reproductive success in tree swallows. *Ecotoxicology* 20:1368–1377. doi: 10.1007/s10646-011-0694-1
- Hellou J, Lebeuf M, Rudi M (2013) Review on DDT and metabolites in birds and mammals of aquatic ecosystems. *Environ. Rev.* 21:53–69

- Hinsley SA, Hill RA, Bellamy PE, et al (2008) Effects of structural and functional habitat gaps on breeding woodland birds: Working harder for less. *Landsc Ecol* 23:615–626. doi: 10.1007/s10980-008-9225-8
- Isaksson C (2015) Urbanization, oxidative stress and inflammation: A question of evolving, acclimatizing or coping with urban environmental stress. *Funct Ecol* 29:913–923. doi: 10.1111/1365-2435.12477
- Isaksson C, Andersson S (2007) Carotenoid diet and nestling provisioning in urban and rural great tits *Parus major*. *J Avian Biol* 38:564–572. doi: 10.1111/j.2007.0908-8857.04030.x
- Isaksson C, Johansson A, Andersson S (2008) Egg yolk carotenoids in relation to habitat and reproductive investment in the great tit *Parus major*. *Physiol Biochem Zool* 81:112–118. doi: 10.1086/522650
- Jarrett C, Powell LL, McDevitt H, et al (2020) Bitter fruits of hard labour: diet metabarcoding and telemetry reveal that urban songbirds travel further for lower-quality food. *Oecologia* 193:377–388. doi: 10.1007/s00442-020-04678-w
- Jones EL, Leather SR (2012) Invertebrates in urban areas: A review. *Eur J Entomol* 109:463–478. doi: 10.14411/eje.2012.060
- Josse J, Husson F (2016) missMDA: A package for handling missing values in multivariate data analysis. *J Stat Softw* 70:1–31. doi: 10.18637/jss.v070.i01
- Kempnaers B, Borgström P, Loës P, et al (2010) Artificial night lighting affects dawn song, extra-pair siring success, and lay date in songbirds. *Curr Biol* 20:1735–1739. doi: 10.1016/j.cub.2010.08.028
- Kimberly J, Fernie GRB (2000) Changes in Egg Composition of American Kestrels Exposed to Dietary Polychlorinated Biphenyls. *J Toxicol Environ Heal Part A* 60:291–303. doi: 10.1080/00984100050027833
- Koivula MJ, Eeva T (2010) Metal-related oxidative stress in birds. *Environ Pollut* 158:2359–2370. doi: 10.1016/j.envpol.2010.03.013
- Kosicki JZ (2012) Effect of weather conditions on nestling survival in the White Stork *Ciconia ciconia* population. *Ethol Ecol Evol* 24:140–148. doi: 10.1080/03949370.2011.616228
- Krijgsveld KL, Visser GH, Daan S (2003) Foraging behavior and physiological changes in precocial quail chicks in response to low temperatures. *Physiol Behav* 79:311–319. doi: 10.1016/S0031-9384(03)00117-3
- Lê S, Josse J, Husson F (2008) FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *J Stat Softw* 25:1–18. doi: 10.18637/jss.v025.i01
- Lévy M, Al-Alam J, Delhomme O, Millet M (2020) An integrated extraction method coupling pressurized solvent extraction, solid phase extraction and solid-phase micro extraction for the quantification of selected organic pollutants in air by gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Microchem J* 157:104889. doi: 10.1016/j.microc.2020.104889
- Lévy M, Al-Alam J, Ridacker C, et al (2018) Use of XAD®-2 passive air samplers for monitoring environmental trends of PAHs, PCBs and pesticides in three different sites in Strasbourg and its vicinity (east of France). *Atmos Environ* 195:12–23. doi: 10.1016/j.atmosenv.2018.09.052
- Liu H, Ma W, Qian J, et al (2015) Effect of urbanization on the urban meteorology and air pollution in Hangzhou. *J Meteorol Res* 29:950–965. doi: 10.1007/s13351-015-5013-y
- Love OP, Breuner CW, Vézina F, Williams TD (2004) Mediation of a corticosterone-induced reproductive conflict. *Horm Behav* 46:59–65. doi: 10.1016/j.yhbeh.2004.02.001
- Marasco V, Stier A, Boner W, et al (2017) Environmental conditions can modulate the links among oxidative stress,

- age, and longevity. *Mech Ageing Dev* 164:100–107. doi: 10.1016/j.mad.2017.04.012
- Marciniak B, Nadolski J, Nowakowska M, et al (2007) Habitat and Annual Variation in Arthropod Abundance Affects Blue Tit *Cyanistes caeruleus* Reproduction. *Acta Ornithol* 42:53–62. doi: 10.3161/068.042.0113
- Martin TE, Martin PR, Olson CR, et al (2000) Parental care and clutch sizes in north and south american birds. *Science* (80- ) 287:1482–1485. doi: 10.1126/science.287.5457.1482
- Meillère A, Brischoux F, Bustamante P, et al (2016) Corticosterone levels in relation to trace element contamination along an urbanization gradient in the common blackbird (*Turdus merula*). *Sci Total Environ* 566–567:93–101. doi: 10.1016/j.scitotenv.2016.05.014
- Meillère A, Brischoux F, Parenteau C, Angelier F (2015) Influence of urbanization on body size, condition, and physiology in an urban exploiter: A multi-component approach. *PLoS One* 10:1–19. doi: 10.1371/journal.pone.0135685
- Michalski M, Nadolski J, Marciniak B, et al (2011) Faecal analysis as a method of nestling diet determination in insectivorous birds: A case study in Blue Tits *Cyanistes caeruleus* and Great Tits *Parus major*. *Acta Ornithol* 46:164–172. doi: 10.3161/000164511X625937
- Naef-Daenzer B, Keller LF (1999) The foraging performance of great and blue tits (*Parus major* and *P. caeruleus*) in relation to caterpillar development, and its consequences for nestling growth and fledging weight. *J Anim Ecol* 68:708–718. doi: 10.1046/j.1365-2656.1999.00318.x
- Naef-Daenzer L, Naef-Daenzer B, Nager RG (2000) Prey selection and foraging performance of breeding Great Tits *Parus major* in relation to food availability. *J Avian Biol* 31:206–214. doi: 10.1034/j.1600-048X.2000.310212.x
- Öberg M, Arlt D, Pärt T, et al (2015) Rainfall during parental care reduces reproductive and survival components of fitness in a passerine bird. *Ecol Evol* 5:345–356. doi: 10.1002/ece3.1345
- R Development Core Team (2021) R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria
- Schaper S V., Dawson A, Sharp PJ, et al (2012) Increasing temperature, not mean temperature, is a cue for avian timing of reproduction. *Am Nat* 179:. doi: 10.1086/663675
- Scheifler R, Cœurdassier M, Morilhat C, et al (2006) Lead concentrations in feathers and blood of common blackbirds (*Turdus merula*) and in earthworms inhabiting unpolluted and moderately polluted urban areas. *Sci Total Environ* 371:197–205. doi: 10.1016/j.scitotenv.2006.09.011
- Scheuhammer AM (1996) Influence of reduced dietary calcium on the accumulation and effects of lead, cadmium, and aluminum in birds. *Environ Pollut* 94:337–343. doi: 10.1016/S0269-7491(96)00084-X
- Scheuhammer AM (1987) The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury, and lead in birds: A review. *Environ Pollut* 46:263–295. doi: 10.1016/0269-7491(87)90173-4
- Schroeder J, Nakagawa S, Cleasby IR, Burke T (2012) Passerine birds breeding under chronic noise experience reduced fitness. *PLoS One* 7:e39200. doi: 10.1371/journal.pone.0039200
- Sepp T, McGraw KJ, Kaasik A, Giraudeau M (2018) A review of urban impacts on avian life-history evolution: Does city living lead to slower pace of life? *Glob Chang Biol* 24:1452–1469. doi: 10.1111/gcb.13969
- Seress G, Bókony V, Pipoly I, et al (2012) Urbanization, nestling growth and reproductive success in a moderately declining house sparrow population. *J Avian Biol* 43:403–414. doi: 10.1111/j.1600-048X.2012.05527.x
- Shochat E, Lerman S, Fernández-Juricic E (2015) Birds in urban ecosystems: Population dynamics, community structure, biodiversity, and conservation. In: *Urban Ecosystem Ecology, Agronomy Monograph*. American

Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, pp 75–86

- Stauss MJ, Burkhardt JF, Tomiuk J (2005) Foraging flight distances as a measure of parental effort in blue tits *Parus caeruleus* differ with environmental conditions. *J Avian Biol* 36:47–56. doi: 10.1111/j.0908-8857.2005.02855.x
- Stephenson R (1997) Effects of oil and other surface-active organic pollutants on aquatic birds. *Environ Conserv* 24:121–129. doi: 10.1017/S0376892997000180
- Thierry A-MM, Massemin S, Handrich Y, Raclot T (2013) Elevated corticosterone levels and severe weather conditions decrease parental investment of incubating Adélie penguins. *Horm Behav* 63:475–483. doi: 10.1016/j.yhbeh.2012.12.011
- Thomas DW, Blondel J, Perret P, et al (2001) Energetic and fitness costs of mismatching resource supply and demand in seasonally breeding birds. *Science (80- )* 291:2598–2600. doi: 10.1126/science.1057487
- Toledo A, Andersson MN, Wang HL, et al (2016) Fatty acid profiles of great tit (*Parus major*) eggs differ between urban and rural habitats, but not between coniferous and deciduous forests. *Sci Nat* 103:1–11. doi: 10.1007/s00114-016-1381-0
- Vos JG (1972) Toxicology of PCBs for Mammals and for Birds. *Environ Health Perspect* 1:105–117. doi: 10.1289/ehp.7201105
- Wawrzyniak J, Gładalski M, Kaliński A, et al (2020) Differences in the breeding performance of great tits *Parus major* between a forest and an urban area: a long term study on first clutches. *Eur Zool J* 87:294–309. doi: 10.1080/24750263.2020.1766125
- Wawrzyniak J, Kaliński A, Gładalski M, et al (2015) Long-Term Variation in Laying Date and Clutch Size of the Great Tit *Parus major* in Central Poland: A Comparison between Urban Parkland and Deciduous Forest. *Ardeola* 62:311–322. doi: 10.13157/arla.62.2.2015.311
- Wawrzyniak J, Kaliński A, Gładalski M, et al Long-Term Variation in Laying Date and Clutch Size of the Great Tit *Parus major* in Central Poland: A Comparison between Urban Parkland and Deciduous Forest. doi: 10.13157/arla.62.2.2015.311
- Webb DR (1987) Thermal tolerance of avian embryos: A review. *Condor* 89:874–898
- Wingfield JC (1988) Changes in reproductive function of free-living birds in direct response to environmental perturbations. Springer, New York, NY, pp 121–148
- Zuur AF, Ieno EN, Walker NJ, et al (2009) Mixed effects models and extension in ecology with R, First Edit. Springer

### Credit:

**Conceptualization:** S. Massemin; **Methodology:** A. Boos, M. Millet, S. Zahn, P. Ronot And I. El Masoudi; **Validation:** A. Saulnier, J. Bleu, A. Boos, M. Millet, S. Zahn, P. Ronot, I. El Masoudi And S. Massemin; **Formal Analysis:** A. Saulnier, J. Bleu, And S. Massemin, **Investigation:** A. Saulnier, J. Bleu, A. Boos, M. Millet, P. Uhlrich, E. R. Rojas, P. Ronot, I.El Masoudi, S. Zahn And S. Massemin; **Resources:** A. Boos, M. Millet, S. Zahn And S. Massemin; **Data Curation:** A. Saulnier, J. Bleu, P. Uhlrich, E. R. Rojas And S. Massemin; **Writing—Original Draft Preparation:** A. Saulnier, J. Bleu And S. Massemin; **Writing—Review And Editing:** A. Saulnier, J. Bleu, A. Boos, M. Millet, S. Zahn, P. Ronot, I. El Masoudi, E. R.

Rojas, P. Uhlrich, M. Del Nero And S. Massemin; Visualization: A. Saulnier, J. Bleu And S. Massemin; Supervision: J. Bleu And S. Massemin, Project Administration: S. Massemin; Funding Acquisition: M. Del Nero And S. Massemin.

**Ethics approval:**

This article does not contain any studies with human participants performed by any of the authors. This work is in accordance with the French legislation concerning the capture and the biological sampling of wildlife. SM, JB and PU received ringing licenses and authorizations for blood and feather sampling from the CRBPO (National Museum of Natural History) as part of a research program led by SM (PP N°673). The protocol has been approved by the French national ethical committee n°35 and approved by the French ministry of research (project APAFIS# 9160-2017030316182730 v2).

**Consent to participate:** Not applicable

**Consent for publication:** All authors have given their consent to the publication of this article.

**Acknowledgments:**

We would like to thanks Caroline Bellut, Alice Gillard, and all other students who contributed to collect and analyse the data. We also thank Laurent Hardion and the LIVE students for producing the land-use maps used for our analyses. We also address our gratitude to the University of Strasbourg, the Eurometropole of Strasbourg, the associations “Société Régionale de Protection des Oiseaux (S.R.P.O)” and “Campus Vert”, A. Gros for authorizing us to install and monitor nest boxes for this study and Météo-France for providing the weather data used in this study.



## Chapitre 2

---

### Conséquences physiologiques de la vie en ville de la naissance à la reproduction : études des variations interannuelles et du rôle de filtre du milieu urbain sur la qualité des individus

#### 2.1. Variations interannuelles des différences physiologiques entre mésanges urbaines et forestières

##### Contexte

La littérature portant sur les traits physiologiques des oiseaux en milieu urbain ne présente à l'heure actuelle aucun véritable consensus sur les effets de ce milieu sur la santé et la survie des individus. Certains paramètres tels que la condition corporelle, le statut oxydatif et la longueur des télomères (pouvant être considéré comme un indice de qualité et de survie) montrent des résultats contrastés pour une espèce ou un site donné, mais également pour un âge donné (adultes/poussins) (voir Sepp et al. 2017). De plus, ces études pointent également des différences morphologiques, comme des différences de taille, mais il est difficile de déterminer si elles résultent des effets contraignants du milieu urbain et/ou si elles présentent un avantage pour la vie en ville. Notre but était de tester les conséquences morphologiques et physiologiques de l'urbanisation à différents âges sur nos populations de mésanges charbonnières. Notre but était également d'explorer les différences interannuelles de ces paramètres pour chaque site. Pour cela, pendant plusieurs années, nous avons réalisé différentes mesures de taille, de condition corporelle, de stress oxydatif et de la longueur des télomères chez les poussins et chez les reproducteurs des populations de mésanges urbaines et forestières. En nous basant sur la littérature, nos prédictions initiales étaient d'observer des individus plus petits présentant des dégâts oxydatifs, des télomères plus courts et une plus faible condition corporelle en ville, avec une variation interannuelle marquée de ces paramètres notamment pour les années avec des conditions météorologiques défavorables.

##### Résultats

Nous montrons une condition corporelle plus faible chez les oisillons urbains quelle que soit l'année. Mais aucun effet du site sur le statut oxydatif et la longueur des télomères. Au contraire, pour les reproducteurs adultes, les individus urbains avaient des télomères plus longs que ceux de la forêt, sauf pour l'année avec de mauvaises conditions météorologiques, pendant laquelle aucune différence n'a été détectée. Les oiseaux urbains avaient également une capacité antioxydante plus élevée, quelle que soit l'année. Ces résultats suggèrent que les villes agissent comme un filtre où seuls les individus de bonne qualité survivent et parviennent à se reproduire avec succès, quelle que soit l'année, alors que dans la forêt, la sélection ne se produit que pendant les années de mauvais temps.

## Conclusion

Cette étude souligne l'importance des études interannuelles pour comprendre l'impact de l'urbanisation sur les oiseaux, notamment pour identifier les mécanismes de sélection sous-jacents. Comme les réponses oxydatives dépendent du niveau des facteurs de stress pour les oiseaux, il serait pertinent de considérer les changements environnementaux temporels et spatiaux auxquels les individus sont confrontés en ville pour comprendre les réponses physiologiques des organismes sous stress urbain.

Cette partie est présentée sous la forme d'un manuscrit prêt pour une soumission dans le journal *Comparative Biochemistry & Physiology - Part A : Molecular & Integrative Physiology* :

Le *supplementary material* a été placé dans les annexes de ce manuscrit de thèse.

**Manuscrit 2 – Saulnier, A., Bleu, J., Boos, A., Millet, M., Zahn, S., Ronot, P., El Masoudi, I., Del Nero, M. and Massemin, S.** Inter-annual variation of physiological differences between urban and forest great tits. Version prête pour soumission dans *Comparative Biochemistry & Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology*

## Manuscrit 2

---

### Interannual variation of physiological differences between urban and forest great tits

*Prêt pour une soumission dans Comparative Biochemistry & Physiology : Part A*

Agnès Saulnier\*<sup>1</sup>, Josefa Bleu<sup>1,2</sup>, Anne Boos<sup>1,2</sup>, Maurice Millet<sup>2,3</sup>, Sandrine Zahn<sup>1,2</sup>, Pascale Ronot<sup>1,2</sup>, Islah El Masoudi<sup>1</sup>, Emilio R. Rojas<sup>1,4</sup>, Pierre Uhlrich<sup>1</sup>, Mirella Del Nero<sup>1,2</sup>, Sylvie Massemin<sup>1,2</sup>

\*Corresponding author: [agnes.saulnier@iphc.cnrs.fr](mailto:agnes.saulnier@iphc.cnrs.fr)

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France

<sup>2</sup> ZAEU, Maison Interuniversitaire des Sciences de l'Homme - Alsace (MISHA), 5, allée du Général Rouvillois, CS 50008, 67083 Strasbourg cedex

<sup>3</sup> Université de Strasbourg, CNRS, ICPEES 7515, F-67087 Strasbourg Cedex 3, France

<sup>4</sup> Wildstat, 43 rue de la Hoube, 67280 Urmatt, France

### Abstract

Urbanization is characterized by several rapid environmental changes such as an increase in building surface, in pollution, or a decrease in invertebrate abundance. For many bird species, morphological and physiological differences have been observed between urban and rural individuals that seem to reflect a negative impact of urban life on the health and fitness of individuals. However, these studies on passerine birds also showed important differences between populations and species in their responses to the urban environment. We propose to test physiological differences between urban and forest individuals over 3 years to understand whether the observed patterns are constant or subject to yearly variations, particularly in relation to fluctuating weather conditions between years. For this purpose, we assessed the health parameters of adults and fledgling of great tits, *Parus major*, living in an urban and in a forest site in the Eurometropole of Strasbourg, for three years. Bird health was estimated with morphological parameters (body condition and size) and also with physiological parameters (oxidative status and telomere length). Our results showed lower body condition of urban fledglings regardless of the year, but no site effects on the oxidative status and telomere length. On the contrary, for adult breeders, urban individuals had longer telomeres than forest ones except for the year with bad weather conditions, during which no difference was detected. Urban birds also had higher antioxidant capacity whatever the year. These results suggest that cities act as a filter in which only good quality individuals survive and achieve successful reproduction regardless of year, whereas in the forest the selection occurs only during harsh weather years.

**Keywords: urbanization, oxidative stress, telomere, antioxidant concentration**

## Introduction

The growth of the world's population has led to a significant increase in urbanized habitats at the expense of natural habitats. This rapid urbanization has led to a modification of biotic and abiotic factors, forcing species to adapt rapidly to their new environment (Marzluff, 2001). Thus, factors such as habitat fragmentation, chemical and noise pollution, artificial lighting, and changes in interspecific relationships have contributed to a restructuring of animal community, particularly for birds (Gil and Brumm, 2013). Some species adapted successfully to this urban environment and have seen their populations persist or increase in cities. These species bring together the “urban exploiters,” which are the most adapted species that are dependent on the urban environment, and the “urban adapters,” which take advantage of the urban environment but reside there optionally. Other species, known as “urban avoiders,” have completely disappeared from cities, leading to a decline in biodiversity in cities. To understand how species adapt to the urban environment and how this environment impacts the survival and fitness of birds, it is essential to study the underlying mechanisms at the individual scale.

Body condition (Liker et al., 2008; Meillère et al., 2017, 2015a; Seress et al., 2012), telomeres (Biard et al., 2017; Grunst et al., 2020; Ibáñez-Álamo et al., 2018; Salmón et al., 2017, 2016), and oxidative status (Herrera-Dueñas et al., 2017; Isaksson, 2015, 2010)(Herrera-Dueñas et al., 2017; Isaksson, 2015, 2010; Stauffer et al., 2017) are good proxies of birds' health and survival and are frequently used to investigate the underlying effects of urbanization on birds' physiology. Body condition reflects the energetic and nutritional status of individuals and is dependent on the quantity and quality of food available in the environment. The influence of this parameter on the reproductive success of adults or the survival of fledglings has been widely demonstrated (Chastel et al., 1995; Milenkaya et al., 2015). Telomeres are non-coding sequences at the end of chromosomes that maintain genetic integrity during cell divisions and which are involved in the mechanism of cells senescence and the aging of organisms. Telomeres shorten with age in numerous species (e.g. Hall et al. 2004) and the attrition rate affects the lifespan of individuals (Hausmann et al., 2005; Hausmann and Mauck, 2008). Telomere attrition also appears to be accelerated by environmental conditions (Chatelain et al., 2020) such as the proximity of roads (Grunst et al., 2020) and metal exposure (Saulnier et al., 2020; Stauffer et al., 2017), but also by intrinsic parameters such as high oxidative stress (Epel et al., 2004). Telomere length is therefore also representative of how individuals can cope with intrinsic and extrinsic constraints and can be considered as a good proxy of individual quality (Blackburn and Epel,

2012; Pauliny et al., 2006). In the same way, the oxidative status represents the balance between the production of reactive oxygen species (ROS) and antioxidants. Chronic exposure to chemicals, pollutants such as polycyclic aromatic hydrocarbons, polychlorinated biphenyls and trace metals, and other stressors such as light and noise pollution, have been shown to increase ROS production (Herrera-Dueñas et al., 2017; Isaksson, 2015, 2010; Stauffer et al., 2017). Non-neutralized ROS can cause oxidative stress, lead to macromolecular damages such as lipid peroxidation, protein carboxylation and DNA damage, and potentially affect the health of birds. To maintain oxidative balance and counteract ROS, birds have endogenous and exogenous antioxidants. Endogenous antioxidants are low molecular weight proteins as glutathione and antioxidant enzymes as the superoxide oxide dismutase (SOD) or catalase (CAT). Exogenous antioxidants correspond to antioxidants provided by food such as vitamins or carotenoids and are generally in low concentration in cities (Isaksson and Andersson, 2007).

The reported effects of the urban environment on these physiological parameters (body condition, oxidative stress and telomeres) in bird populations vary greatly between studies (reviewed in Sepp et al. 2017). For example, a study on adult great tits (*Parus major*) found longer telomeres in urban birds than in rural ones (Salmón et al., 2017), whereas another study on adult blackbirds (*Turdus merula*) showed the opposite pattern, with shorter telomeres for urban birds (Ibáñez-Álamo et al., 2018). Similarly, many studies in birds have found neutral or low effects of urbanization on oxidative status (Giraudeau and McGraw, 2014; Isaksson, 2010; Salmón et al., 2018a) or body condition (Bókony et al., 2012; Meillère et al., 2015) compared to rural habitats, whereas some other studies have shown oxidative stress (Mathieu Giraudeau et al., 2015; Herrera-Dueñas et al., 2014) or nutritional stress (Liker et al., 2008) associated with urban environments. Some of these physiological differences found between studies are associated with divergences in reaction norm and adaptation of species to environmental conditions (Salmón et al., 2018a), but also to differences in the intensity of stressors to which individuals are exposed (Biard et al., 2017; Herrera-Dueñas et al., 2014; Meillère et al., 2015), particularly in the cases of chemical pollution or low vegetation cover surface. In addition, urban characteristics as prey abundance or availability can change according to years and the consequences are observed as yearly variations of nestling body size and body condition in great tits (Caizergues et al. 2021). Low temperature or many days of rain can explain this low prey availability (Avery and Krebs, 2008; Dawson and Bortolotti, 2000), emphasizing the impact of the lower quantity of invertebrates in town (Chamberlain et al., 2009). These conditions result

in a decrease of daily activity in adult great tits (Schlicht and Kempenaers, 2020), increase of energy expenditure for foraging (Cox et al., 2019) and thermoregulation in nestling of other birds species (Krijgsveld et al., 2003). Studying the effects of these annual variations in the context of urbanization is interesting because the urban environment can exacerbate the effects of poor weather conditions. Thus, we expect more pronounced differences between the urban and rural environments in more challenging years with respect to weather conditions as cold and rain events.

In this study, we aimed to evaluate the effects of the urban environment on physiological parameters of birds, adult breeders and fledglings, using proxies for health/quality of birds during several years. In particular, we were interested to test whether these parameters showed annual variation in relation to weather conditions. For this purpose, we followed an urban and a forest populations of great tits (*Parus major*) in the Eurometropole of Strasbourg (Alsace, France) for 3 years (2015, 2016, and 2018) and we recorded morphological, oxidative status, and telomere length measurements for both adults and fledglings. In a previous study (Saulnier et al. submitted), the environmental differences (pollution, vegetation cover, and food availability) between the two sites were also characterized, as well as the weather conditions (the average temperature, the average daily temperature range, the average daily rainfall rate and the number of rainy days) during breeding. We expected an increase of oxidative stress associated with a low antioxidant capacity, shorter telomere length and lower body condition in urban birds compared to forest ones, for both adults and fledglings. We also predicted that these urban and forest differences would appear to be more pronounced in years characterized by unfavorable weather conditions and low breeding success in the city.

## Material and methods

### 1. Site and animal sampling

The study was performed in 2015, 2016, and 2018 on two populations of great tits (*Parus major*) living in artificial nestboxes in an urban site and a forest site of the Eurometropole of Strasbourg (France). The urban site (urban) consists of several spots in the town of Strasbourg such as urban parks, tree-lined walkways, and in the residential area of La Robertsau. The forest site (forest) corresponds to an alluvial forest in the vicinity of the small town of La Wantzenau at 20 km North of Strasbourg city center (48°6479622N; 7°83366664W). More details about

nestboxes occupation and concentration of air pollutants and food availability along this urbanization gradient were provided in a previous article (Saulnier et al. submitted).

The great tit is a common ubiquitous species living in both urbanized and natural environments across the Eurasian continent. This species nests easily in artificial nestboxes, which makes it a good model species for studies on the effects of urbanization on birds. In addition, adults of both sexes actively feed the nestlings, so that males and females can be caught with the same technique and in the same proportion. We monitored the reproduction of great tits during the first clutch, between the end of March and May of each year. For each occupied nestbox, we recorded the hatching date ( $\pm 1$  day), the clutch size, and the fledgling number (14-18 days old) with regular visits to the nestboxes.

Captures of adults were made in their nestbox using a trapdoor when nestlings were between 8 to 15 days old to avoid nest desertion (which is likely to happen if nests are disturbed before hatchlings are 8 days old) or precocious fledgling (after 15 days old). We captured 45 adults and 212 fledglings in 2015, 35 adults and 200 fledglings in 2016 and 48 adults and 214 fledglings in 2018. The capture of fledglings was realized in the nest when they were 14-18 days old (see Table A.1 of supplementary for headcount for each age group). At capture, each bird (adults and fledglings) was ringed and weighed with a precision scale ( $\pm 0.1$ g). Adults were sexed based on the size of the black tie (larger for males) and the presence of the brood patch for females. For adults and six fledglings per nest (the two oldest, two intermediates, and the two youngest), the tarsus length and the head-beak length were also measured with a caliper ( $\pm 0.01$  mm) and the wing length with a ruler ( $\pm 0.1$  mm). These morphometric measures were used to estimate the body size and the body condition of nestlings (see “statistical analysis” part for more details). We also collected 50  $\mu$ L of blood by skin-puncture in the brachial vein with heparinized capillary for physiological analyses. Samples were kept in ice during fieldwork waiting for centrifugation at 4000g for 10 minutes at 4°C. Plasma and erythrocytes were separated in two distinct tubes before storage at -80°C until lab analyses.

## **2. Measures of physiological parameters**

We measured three physiological parameters in the blood of birds: the reactive oxygen metabolites (ROM), the total antioxidant capacity (OXY) in plasma, and the relative telomere length (RTL) in erythrocytes. Means and Standard Deviation (SD) of all parameters are provided in appendix B of supplementary materials.

The concentration of ROM (as hydroperoxides) in the birds' plasma was measured using the diacron- reactive oxygen metabolite test (d-ROM test, Diacron, Italy), adapted to 96 well plates. In each well, 4  $\mu$ L of plasma is added to 200  $\mu$ L of the reaction mix, containing acid buffer and chromogenic substance. The plate was incubated at 37°C for 75 min. The absorbance of samples at 510 nm was measured using an Infinite® 200 PRO microplate reader (Tecan). The absorbance was converted to mg of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/dL (based on Carrateli Units) using the absorbance of a standard sample of known concentration following the kit instruction. A total of 397 samples was measured in duplicates.

The OXY was measured using the OXY-Adsorbent Test (Diacron, Italy) adapted to 96 wells plate. In each well, 1:100 diluted plasma was mixed with the reaction mix provided in the kit. The plates were incubated for 10min at 37°C. The absorbance of samples at 510 nm was measured using an Infinite® 200 PRO microplate reader (Tecan). The measured absorbance is inversely proportional to the concentration of OXY in the sample. The OXY concentration of the sample (in  $\mu$ mol HClO/ml) was obtained using the absorbance of a standard sample with a known oxidizing power following kit instructions. A total of 529 samples were measured in duplicates.

For both ROM and OXY, all samples were run in duplicates and a control sample (goose plasma) was run in each plate to control the inter-plate variations. Adult and fledgling samples were measured in the same plates in a randomized way. The mean coefficient of the intra-individual and the inter-plate variation was 4.47% and 9.48% respectively for ROM and 3.68% and 7.92% respectively for OXY.

Relative telomere length (RTL) was measured in erythrocytes using a method previously described by Criscuolo et al. (2009). Erythrocyte DNA was extracted on silica-membrane columns using the kit NucleoSpin® Blood Quick Pure (Macherey-Nagel®), and the concentration and purity were checked using the Nanodrop 1000 (Thermo scientific®), a microvolume spectrometer. The RTL of each sample was measured with a quantitative polymerization chain reaction (qPCR) in 96 wells plates. The RTL is a ratio (T/S) between telomeres repeat copy number (T) to control gene copy number (S) expressed in the same way for each bird. The samples mean Cq of T and mean Cq of S (number of cycles necessary to detect amplified DNA above basal signal) were used as a reference in the calculation of RTL with a ratio (T/S) arbitrary set to 1 (see Criscuolo et al. 2009). The *Parus major* zinc finger protein (ZENK) gene (GenBank: EF568148) was used as the control gene. Sequences of used primers are provided in appendix C of supplementary material. In both 2015 and 2016, the final dilution of

primer was 500nM for the control gene and 100nM for telomeres. The protocol in 2018 was modified, and the final dilution was 500nM for the control gene and 200nM for telomeres. Finally, amplification cycle was performed with a final volume of 10 $\mu$ L per well with 2ng of DNA (2 $\mu$ L), and 8 $\mu$ L of reaction mix containing a GoTaq® qPCR (Promega, Madison, USA). For the control gene, amplification started with 2 min at 95°C followed by 40 cycles of 15 sec at 95°C, 30 sec at 56°C, and 1 min 30 sec at 72°C. The average efficiency of amplification for the control gene and telomere was 99.8% and 100 % respectively in 2015-2016; and 95.8% and 98.9% in 2018. Mean intra-individual quantification cycle C<sub>q</sub>; number of cycles necessary to detect amplified DNA above basal signal) variation was 0.91% and 1.39% for the control and the telomere assay in 2015-2016 and 1.03% and 2.06% for control and telomere assay in 2018. Mean inter-run C<sub>q</sub> variation was 0.75% and 1.28% for control and telomere genes respectively in 2015-2016 and 0.67% and 1.16% in 2018. A total of 436 samples were measured (281 for 2015-2016 and 155 for 2018).

### 3. Statistics analyses

All statistical analyses were performed with R software (version 4.1.0, R Development Core Team, 2021). The significance threshold was set to alpha = 0.05. For all analyses, the hatching date was expressed in relative day from March 1.

Tarsus, wing, and head-beak lengths were used to estimate a body size index. More precisely, the body size index was estimated as the value of each individual on the first dimension (PC1) of a principal component analysis (PCA) including tarsus length, wing length, and head-beak length (variables were scaled before analysis). This index was calculated separately for adults and nestlings. PC1 explained 60.66% of body size variation for adult birds and 73.73% for fledglings. Body condition was obtained as the residuals of the regression between body mass and body size index (adults:  $R^2 = 0.44$ ,  $p < 0.001$ ; fledglings:  $R^2 = 0.47$ ,  $p < 0.001$ ).

Differences of morphological (body size index and body condition) and physiological parameters (ROM, OXY, RTL) were tested using linear models (function `lm`) for adults and linear mixed models (function `lmer` of “lme4” package, Bates et al., 2015) for fledglings and type III ANOVA. We used mixed models for fledglings to take into account the non-independence of fledglings from the same nest. The normality and the homoscedasticity of the residuals were checked using Kolmogorov-Smirnov test and Levène test respectively. To respect these conditions, the RTL was log-transformed. Moreover, to compare RTL measurements in spite of the dilution volume

change in the protocol, we applied a transformation to the data to obtain Z-scores (function “scale” in R) following the protocol described by Verhulst (2019). The data were scaled for each year, thus allowing comparison of the differences in distributions between sites per year without assay-dependent variations. The transformation was applied to the log-transformed data.

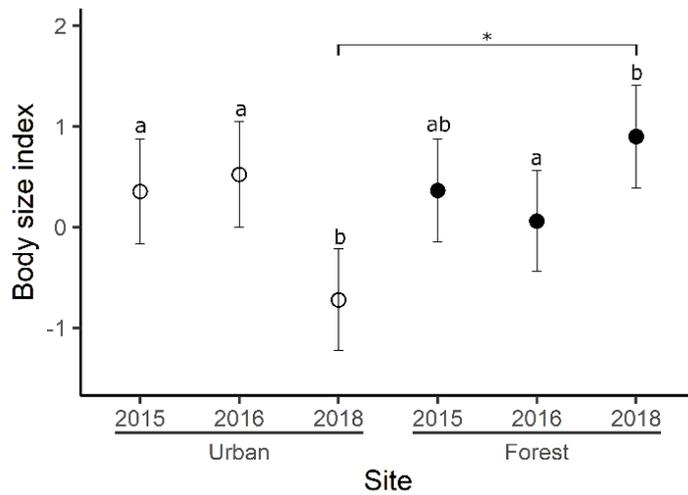
In models, we tested the effect of sites (urban and forest), year (as a categorical variable), and the interaction between site and year. We also included the following covariates: (i) hatching date (to take into account the timing of the breeding season), (ii) fledgling number (to take into account the investment in reproduction for adults and competition for young), and (iii) body condition (for models on physiological parameters only). For adult birds, we also added the effect of sex and the interaction between site (urban or forest) and sex. The interaction between sex and year was not included due to an important collinearity (Variance Inflation Factor > 10, O’Brien 2007). For fledglings, models also included the age and the brood identity as additive random effects and the body size as a covariate (for models on physiological parameters only), taking into account the birds’ growth during the studied period. Non-significant interactions in adult and fledgling models were sequentially removed from final models. Estimates of all statistical models are provided in appendix D of supplementary material.

## Results

### 1. Body size and condition

The body size of adults was significantly different between sites and sexes (Table 1). Urban breeders were significantly smaller than forest ones (Tukey,  $p = 0.002$ ) and males were significantly taller than females (Tukey,  $p < 0.001$ ). A significant positive correlation between body size and the fledgling number was also observed: smaller birds had fewer fledglings than taller ones. The body size of fledglings was significantly different between sites depending on the year (the site and year interaction was significant, as shown in Table 2 and Fig.1). Urban fledglings were smaller than forest fledglings in 2018 (Tukey,  $p < 0.001$ ), and no site differences were observed in 2015 (Tukey,  $p = 0.99$ ) nor in 2016 (Tukey,  $p = 0.14$ ). Urban fledglings were smaller in 2018 than in 2015 (Tukey,  $p = 0.004$ ) and 2016 ( $p < 0.001$ ). However, forest fledglings born in 2018 were taller than those born in 2016 (Tukey,  $p = 0.02$ ). For body condition, none of the explanatory variables was significant in adult birds (Table 1), whereas the body condition of fledglings varied significantly between urban and forest sites (Table 2), with a poorer condition in urban fledglings (Tukey,  $p = 0.004$ ). The fledgling body condition was also negatively

correlated with the number of fledglings in each brood (Table 2, see also Table D.2 of supplementary material).



**Figure 1)** Body size difference of great tit fledglings between urban and forest sites during three years. Differences between years were represented with different letters for a given site and site differences were represented with a bar for a given year. Mean predicted values of the statistical model presented in Table 2 are represented by circles and standard errors are represented by bars.

**Table 1.** Results of statistical analyses of morphological and physiological parameters of breeding adults between urban and forest sites during three years

	Body size (n=128)			Body condition (n=126)			ROM (n=98)			OXY (n=111)			RTL (n=120)		
	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
Site	9.91	1, 121	.002***	2.47	1, 119	.119	11.50	1, 88	<.001** *	7.34	1, 103	.008**	7.07	1, 110	.001
Sex	84.22	1, 121	<.001***	.38	1, 119	.540	.45	1, 88	.505	.06	1, 103	.810	1.43	1, 110	.234
Year	.88	2, 121	.417	.97	2, 119	.382	5.32	2, 88	.006**	12.38	2, 103	<.001***	2.40	2, 110	.095
Hatching date	.17	1, 121	.680	.04	1, 119	.837	16.11	1, 88	<.001** *	.48	1, 103	.489	9.44	1, 110	.003**
Fledgling number	5.79	1, 121	.018*	2.17	1, 119	.143	.004	1, 88	.951	.66	1, 103	.415	3.23	1, 110	.075
Body condition	...	...	...	...	...	...	.06	1, 88	.801	2.32	1, 103	.131	.02	1, 110	.896
Site*Year	...	...	...	...	...	...	3.93	2, 88	.023*	...	...	...	5.21	2, 110	.007**
Site*Sex	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...

Note. ROM corresponds to plasmatic concentration of reactive oxygen metabolites; OXY corresponds to plasmatic total antioxidant capacity and RTL corresponds to relative telomere length. RTL was transformed as Z-scores due to protocol modifications (see Material and methods for more details)

\* P < 0.05

\*\*P < 0.01

\*\*\*P < 0.001

**Table 2.** Results of statistical analyses of morphological and physiological parameters of fledglings between urban and forest sites during three years

	Body size (n=625)			Body condition (n=625)			ROM (n=299)			OXY (n=418)			RTL (n=314)		
	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>	<i>F</i>	<i>df</i>	<i>p</i>
Site	1.67	1, 614	.19	8.77	1, 616	.004**	1.80	1, 288	.171	2.02	1, 407	0.159	3.20	1, 303	.08
Year	9.24	2, 614	<0.001** *	1.31	2, 616	.273	5.73	2, 288	.005**	36.57	2, 407	<0.001** *	.17	2, 303	.85
Hatching date	3.15	1, 614	.08	3.36	2, 617	.070	0.000	1, 288	.999	.28	1, 407	0.60	.01	1, 303	.93
Fledgling number	3.60	1, 614	.06	11.61	2, 618	.001***	.34	1, 288	.560	.50	1, 407	0.481	.07	1, 303	.78
Body size	...	...	...	...	...	...	.66	1, 288	.417	4.41	1, 407	0.038	.49	1, 303	.49
Body condition	...	...	...	...	...	...	12.71	1, 288	<.001	2.63	1, 407	0.11	.06	1, 303	.80
Site*Year	13.35	2, 614	<.001***	...	...	...	3.23	2, 888	.044*	...	...	...	...	...	...

Note. ROM corresponds to plasmatic concentration of reactive oxygen metabolites; OXY corresponds to plasmatic total antioxidant capacity and RTL corresponds to relative telomere length. RTL was transformed as Z-scores due to protocol modifications (see Material and methods for more details)

\* P < 0.05

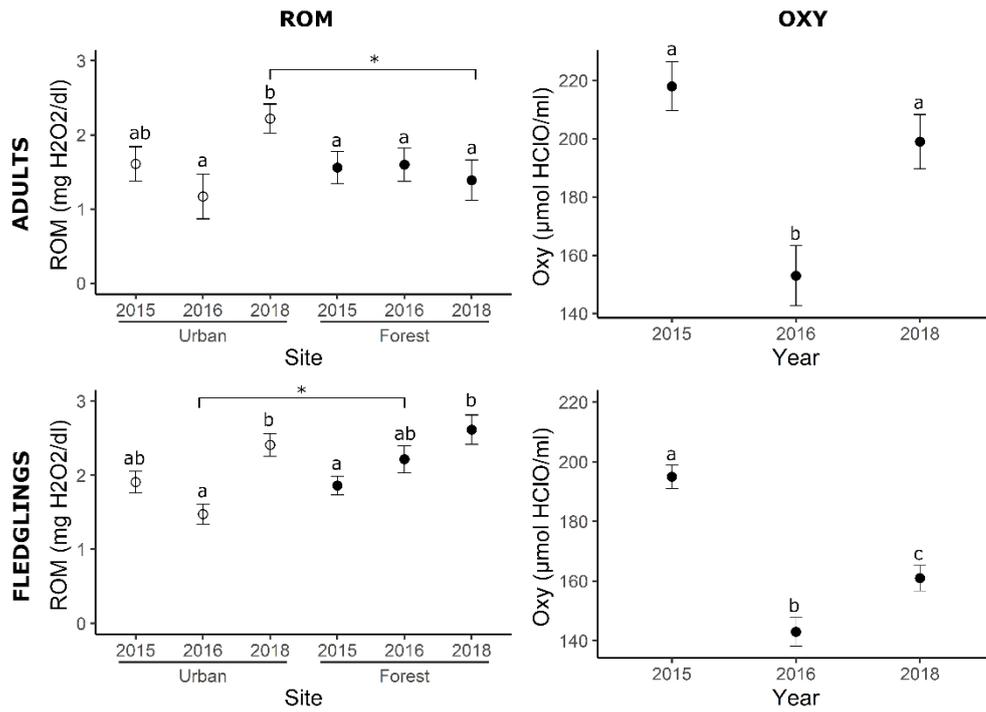
\*\*P < 0.01

\*\*\*P < 0.001

## 2. Oxidative stress

We considered plasmatic ROM and OXY concentrations to evaluate oxidative status. Both adults and fledglings showed a significant interaction between site and year for ROM plasmatic concentrations (Table 1 and 2, Fig. 2).

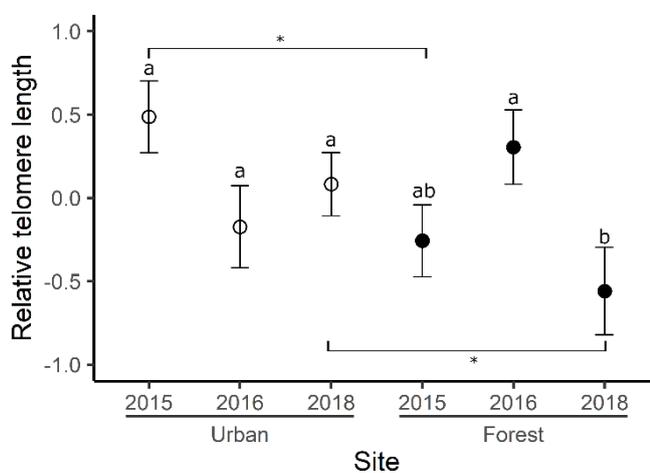
For adults, ROM concentrations were higher for urban breeders than forest breeders in 2018 (Tukey,  $p=0.014$ ) but not in 2015 (Tukey;  $p=0.88$ ) nor 2016 (Tukey,  $p=0.26$ ). Also, urban breeder ROM concentrations were higher in 2018 than in 2016 (Tukey,  $p=0.012$ ) but were similar in 2018 and 2015 (Tukey,  $p=0.13$ ). Plasmatic ROM concentration was also negatively correlated with the hatching date with later breeders having lower ROM concentrations (see also Table D.1 of supplementary materials). The plasmatic ROM concentration of fledglings was lower for urban birds than forest birds in 2016 (Tukey,  $p=0.009$ ) but not in 2015 (Tukey;  $p=0.49$ ) nor 2018 (Tukey,  $p=0.64$ ). As observed for adults, the urban fledglings ROM concentration were higher in 2018 than in 2016 (Tukey,  $p=0.003$ ) and as at the same level as in 2015 (Tukey,  $p=0.25$ ). Forest fledglings had also higher ROM concentrations in 2018, compared not to 2016 (Tukey,  $p=0.40$ ) but to 2015 (Tukey,  $p=0.01$ ). ROM concentration was significantly positively correlated to the body condition of fledglings (Table 2, see also Table D.2 of supplementary materials). The OXY concentration of adult birds differed significantly between sites and years (Table 1 and Fig.2). Urban breeders had higher OXY concentration than forest breeders (Tukey,  $p=0.007$ ) and concentrations in 2016 were significantly lower than those observed in 2015 (Tukey,  $p<0.001$ ) and 2018 (Tukey,  $p=0.004$ ). For fledglings, a significant year difference was also observed (Table 2 and Fig.2) with the same pattern (Tukey, all  $p<0.013$ ). The lowest concentration was observed in 2016 and the highest concentration in 2015. A positive correlation was also observed with body size (Table 2), meaning that taller fledglings had higher levels of OXY.



**Figure 2)** Oxidative status difference of great tit breeders and fledglings between urban and forest sites during three years. Differences between years were represented with different letters for a given site and site differences were represented with a bar for a given year. Mean predicted values of the statistical model presented in Tables 1 and 2 are represented by circles and standard errors are represented by bars.

### 3. Telomere length

RTL of adult birds was significantly explained by the interaction between sites and years (Table 1, Fig. 3). In 2015 and 2018, urban birds had longer RTL than forest birds (Tukey,  $p_{2015}=0.02$ , and  $p_{2018}=0.045$ ), but no difference was observed in 2016 (Tukey,  $p=0.15$ ). Differences between years in forest areas were observed and RTL appeared to be longer in 2016 compared to 2018 (Tukey,  $p=0.04$ ). The RTL was also negatively correlated to the hatching date (Table 1). Birds breeding later had shorter telomeres. However, for fledglings, none of the tested variables was significant (Table 2, see also Table D.1 of supplementary).



**Figure 3)** Relative telomere length difference for great tit breeders between urban and forest sites during three years. Yearly differences were represented with different letters for a given site and site differences were represented with a bar for a given year. Mean predicted values of the statistical model presented in Table 1 are represented by circles and standard errors are represented by bars.

## Discussion

This study aims to compare the physiology of urban and forest birds for several years to understand the impact of the urban environment on bird health and the yearly variation of traits in the different environments. We found inter-annual variation of some parameters between sites for both adults and fledglings. Some results are in opposition to our initial hypotheses.

No inter-annual variations were observed for adult morphological parameters (body size and body condition). Urban birds were consistently smaller than rural birds. Other studies have observed a smaller size of urban birds in the same species (Caizergues et al., 2018), and also in other species such as house sparrows (Meillère et al., 2015a; Seress et al., 2012) and blackbirds (Evans et al., 2009). An adaptive response to urban environments is the hypothesis proposed to explain this urban small size (Meillère et al., 2015). A smaller size offers better mobility, is more effective at avoiding predators (Liker et al., 2008; Møller, 2008), and reduces food requirements,

which can be advantageous in an environment with fewer prey (Gardner et al., 2011). Moreover, the body size divergence between urban versus forest was not observed for fledglings in 2015 and 2016, suggesting that the lower size of urban breeders found in this study would result from a selection of smaller individuals after fledgling (selection on survival or access to reproduction). Some studies revealed a lower size of fledglings in urban settings compared to forest great tits (Bailly et al., 2016; Biard et al., 2017; Caizergues et al., 2021; Corsini et al., 2020), blue tits (Corsini et al., 2020), or house sparrows (Meillère et al., 2015). However, it seems that these differences are correlated to the degree of urbanization to which the birds are exposed and are more pronounced in the largest cities (Biard et al., 2017; Meillère et al., 2017, 2015). Additionally, we found a smaller size of urban fledglings in 2018. Yearly variation of body size is also observed in another study on the same species that have been associated with a probable yearly variation of food quantity (Caizergues et al., 2021). Yet, as 2018 is a year with favorable weather, this result is possibly due to a difference in average age between urban and forest broods for that year. Urban fledglings in 2018 were slightly younger at capture than the forest ones (See Table A.1 of supplementary). Furthermore, fledglings showed a lower body condition in cities, as found in the literature (Bailly et al., 2016; Biard et al., 2017; Demeyrier et al., 2016). This is probably the consequence of lower availability of arthropods (caterpillars and spiders) observed in the urban site in Strasbourg (Saulnier et al. submitted) and in other cities (Jones and Leather, 2012; Peach et al., 2015). The body condition of fledglings was also negatively correlated to the fledgling number whatever the site and year. In an enlarged brood, competition increases between nestlings, and the provisioning capacity of the breeder is not sufficient to cover the food requirement of all nestlings (Demeyrier et al., 2016), leading to the decrease of lipid reserves in fledglings (Burness et al., 2000; Hõrak et al., 2000). In contrast, no site differences of body condition were observed for adults, as also reported in several other studies on great tits (Sepp et al., 2017). The similarity of body condition in breeders suggests that only birds with sufficient body condition can succeed at reproduction, and that birds with low body condition avoid or initiate and fail reproduction.

In this study, all physiological parameters in adults varied between years, and some also varied between sites. A higher plasmatic ROM concentration was measured in urban breeders in 2018, suggesting that the urban environment can be considered a stressful environment. This result is consistent with our prediction that proposes a higher oxidative stress in urban area and with conclusions of other studies (Giraudeau and McGraw, 2014; Herrera-Dueñas et al., 2014). In

addition, we found consistently higher plasma OXY concentrations for urban breeders compared to forest breeders. This same result has already been shown in the same species (Salmón et al., 2018a), although in most studies the opposite result was observed in the great tits (Hörak et al. 2004, Isaksson et al. 2007, Herrera-Dueñas et al. 2014, 2017). Considering that higher OXY concentration is correlated with increasing levels of corticosterone, this higher plasma OXY in urban areas can result in metabolic response to environmental constraints (Cohen et al., 2008). Isaksson (2020) suggest that different variations of oxidative markers depend on the intensity of stressors to which individuals are confronted. High antioxidant capacity associated with low oxidative damage could suggest that levels of urbanization are relatively low compared to detoxification capacity of birds (Isaksson, 2020) and that an increase of antioxidant capacity is sufficient to counteract oxidative damage. Interestingly, annual variations were observed for both ROM (only in the urban site) and OXY concentrations (same pattern in both sites), but these markers do not vary in the same direction for a given year. Environmental parameters can variate from one year to another as well as levels of stressor to which individuals are confronted (for example levels of pollutants, Lévy et al., 2018) or prey availability (Wawrzyniak et al., 2020)). Higher ROM concentrations and low OXY can result from acute stress related to an increase of stress factor in the environment. Lower OXY results from the depletion of dietary antioxidants (carotenoids or vitamin E), and the yearly variation of ROM could reflect to some extent variations in exogenous antioxidant availability. At the same time endogenous anti-oxidant molecules as glutathione or antioxidant enzymes (SOD or the CAT) can act in the process against ROS (Costantini and Verhulst, 2009) and have to be considered in future analyses to understand accurately the yearly variation of oxidative stress. However, no difference of these antioxidant enzymes activities was detected along an urbanization gradient in the same species (Salmón et al. 2018).

Similar inter-annual ROM and OXY patterns observed in adults were detected for fledglings. But contrary to adults, differences between sites were observed for OXY concentration and ROM concentration tends to be lower for urban chicks but only in 2016. Some other studies have shown mitigate effects of urbanization on nestling oxidative status (Isaksson et al., 2005; Salmón et al., 2018b). However, our study highlights the influence of growth and body condition on oxidative status at fledge. A positive correlation between body condition and ROM concentration was indeed found. The body condition of a nestling is partly related to its lipid reserve (Ardia and Clotfelter, 2007). However, there is a positive correlation between lipid peroxidation and

plasmatic lipid content (Pérez-Rodríguez et al., 2015). Higher levels of circulating lipids lead to peroxidation increasing and higher ROM concentration. Furthermore, OXY was also positively correlated with body size. It is possible that taller individuals had a higher metabolism, indeed it has been shown in coal tits (*Parus ater*) that nestlings with a higher metabolism had higher OXY than the others (Stier et al., 2014).

The higher urban OXY concentration and the absence of ROM differences (except in 2018) between sites in adults can also be related to a stronger selection of breeding individuals in the urban site. Only the best quality individuals, with high antioxidant defenses and high ability to neutralize oxidative damage, could survive and succeed to reproduce. This hypothesis is supported by the results on telomeres. Urban breeders had longer telomeres than forest breeders in 2015 and 2018. Higher telomere length is correlated to higher survival of birds (Hausmann et al., 2005; Salmón et al., 2017) and a longer lifespan (Hausmann and Vleck, 2002; Monaghan, 2012), and better fitness (Pauliny et al., 2006). Long telomeres in a constraining environment represent a high investment in self-maintenance (Giraudeau et al., 2019). Telomere length is negatively impacted by environmental stressors (Chatelain et al., 2020; Grunst et al., 2020) or by intrinsic parameters such as high oxidative stress (Epel et al., 2004). Thus, telomere length can be considered an indicator of bird quality in terms of health and survival. The fact that fledglings have similar telomere length between urban and forest areas and urban breeders have longer telomeres suggest that only good quality individuals are in the capacity to allocate energy in both self-maintenance and reproduction and, can survive and breed in their constrained environment. Furthermore, forest sites present low environmental constraints, individuals of lesser quality can also survive and successfully access reproduction, lowering the RTL average of the captured adults. A part of these results is supported by the work of (Salmón et al. 2017), which shows that only urban nestlings with longer telomeres survived and accessed to reproduction in their first year. However, the breeding selection occurs also for forest birds under harsh weather constraints as in 2016, leading to an absence of significant RTL difference between sites. Furthermore, since telomere size is correlated with the age of individuals, we can hypothesize that longer telomeres of urban birds were due to the strongest selection in favor of the younger breeders, although the survival is found, in some studies, higher in urban than forest birds (Evan et al. 2009) or to a higher mortality and emigration rate of older birds. Some results of 2018 provided in supplementary materials (see Table A.2 of appendix) revealed no difference between the sites in the proportion of young breeders (1 year old) and old breeders (> 1 year

old). However, we cannot exclude this hypothesis because the age repartition in the “old breeders” category is unknown.

RTL and ROM concentration were both negatively correlated with hatching date. This result means that late breeders had shorter telomeres but also lower ROM concentrations. Earlier breeders with longer telomeres is supported by other studies highlighting that earlier breeders are generally the most experimented breeders (Robertson and Rendell, 2001; Verhulst et al., 1995). The high ROM concentration suggests a cost of breeding too early in the breeding season, possibly due in this context to a mismatch between prey abundance and nestling energetic requirement. Prey abundance fluctuates during the season and a lag between prey availability and nestlings' food requirement can increase the energy expenditure required by adults to meet the needs of their chicks, which can increase stress in adults (Chamberlain et al., 2009; Thomas et al., 2001).

To conclude, the inter-annual variations in telomere length is due to a greater variance between forest individuals, as the urban environment seems to be more restrictive and highly selective. Our study seems to reveal that the urban environment acts as a filter where only individuals of good quality can survive and invest in their reproduction. Nevertheless, because we only captured adults when nestlings were between 8 to 15 days old, captured individuals do not necessarily reflect the state of health of all the urban individuals (breeders and non-breeders). Future studies could test this hypothesis by comparing the health parameters of successful and unsuccessful breeding birds. Moreover, the fact that we found in fledglings site differences only for some parameters (small body size and body condition in urban areas but no for physiological parameters) suggests that in Strasbourg, a medium-sized city, parental investment and reduced brood size limit the impact of environmental constraints during growth for fledglings compared to larger cities (Meillère et al., 2017). Finally, this study highlights the importance of inter-annual studies to understand the impact of urbanization on birds, particularly to identify underlying selection mechanisms. As oxidative responses are dependent on the level of stressors for birds, it would be relevant to consider both temporal and spatial environmental changes that individuals are facing in city to understand the physiological responses of organisms under urban stress.

## References

Ardia, Daniel R., and Ethan D. Clotfelter. 2007. “Individual Quality and Age Affect Responses to an Energetic Constraint in a Cavity-Nesting Bird.” *Behavioral Ecology* 18 (1): 259–66.

<https://doi.org/10.1093/beheco/arl078>.

- Avery, Mark I., and John R. Krebs. 2008. "Temperature and Foraging Success of Great Tits *Parus Major* Hunting for Spiders." *Ibis* 126 (1): 33–38. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1984.tb03661.x>.
- Bailly, Juliette, Renaud Scheifler, Sarah Berthe, Valérie Anne Clément-Demange, Matthieu Leblond, Baptiste Pasteur, and Bruno Faivre. 2016. "From Eggs to Fledging: Negative Impact of Urban Habitat on Reproduction in Two Tit Species." *Journal of Ornithology* 157 (2): 377–92. <https://doi.org/10.1007/s10336-015-1293-3>.
- Bates, Douglas, Martin Mächler, Benjamin M. Bolker, and Steven C. Walker. 2015. "Fitting Linear Mixed-Effects Models Using Lme4." *Journal of Statistical Software* 67 (1): 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>.
- Biard, Clotilde, François Brischoux, Alizée Meillère, Bruno Michaud, Manon Nivière, Stéphanie Ruault, Marie Vaugoyeau, and Frédéric Angelier. 2017. "Growing in Cities: An Urban Penalty for Wild Birds? A Study of Phenotypic Differences between Urban and Rural Great Tit Chicks (*Parus Major*)." *Frontiers in Ecology and Evolution* 5 (July): 1–14. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00079>.
- Blackburn, Elizabeth H., and Elissa S. Epel. 2012. "Telomeres and Adversity: Too Toxic to Ignore." *Nature*. Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/490169a>.
- Bókony, Veronika, Gábor Seress, Szabolcs Nagy, Ádám Z. Lendvai, and András Liker. 2012. "Multiple Indices of Body Condition Reveal No Negative Effect of Urbanization in Adult House Sparrows." *Landscape and Urban Planning* 104 (1): 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2011.10.006>.
- Burness, G.P., G.B. McClelland, S.L. Wardrop, and P.W. Hochachka. 2000. "Effect of Brood Size Manipulation on Offspring Physiology: An Experiment with Passerine Birds." *Journal of Experimental Biology* 203 (22): 3513–20. <https://doi.org/10.1242/jeb.203.22.3513>.
- Caizergues, Aude E., Anne Charmantier, Marcel M. Lambrechts, Samuel Perret, Virginie Demeyrier, Annick Lucas, and Arnaud Grégoire. 2021. "An Avian Urban Morphotype: How the City Environment Shapes Great Tit Morphology at Different Life Stages." *Urban Ecosystems* 24 (5): 929–41. <https://doi.org/10.1007/s11252-020-01077-0>.
- Caizergues, Aude E., Arnaud Grégoire, and Anne Charmantier. 2018. "Urban versus Forest Ecotypes Are Not Explained by Divergent Reproductive Selection." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285 (1882). <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0261>.
- Chamberlain, D. E., A. R. Cannon, M. P. Toms, D. I. Leech, B. J. Hatchwell, and K. J. Gaston. 2009. "Avian Productivity in Urban Landscapes: A Review and Meta-Analysis." *Ibis* 151 (1): 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2008.00899.x>.
- Chastel, Olivier, Henri Weimerskirch, and Pierre Jouventin. 1995. "Influence of Body Condition on Reproductive Decision and Reproductive Success in the Blue Petrel." *Auk* 112 (4): 964–72. <https://doi.org/10.2307/4089027>.
- Chatelain, Marion, Szymon M. Drobniak, and Marta Szulkin. 2020. "The Association between Stressors and Telomeres in Non-Human Vertebrates: A Meta-Analysis." *Ecology Letters* 23 (2): 381–98. <https://doi.org/10.1111/ele.13426>.
- Cohen, Alan A., Michaela Hau, and Martin Wikelski. 2008. "Stress, Metabolism, and Antioxidants in Two Wild Passerine Bird Species." *Physiological and Biochemical Zoology* 81 (4): 463–72. <https://doi.org/10.1086/589548>.
- Corsini, Michela, Eva Maria Schöll, Irene Di Lecce, Marion Chatelain, Anna Dubiec, and Marta Szulkin. 2020. "Growing in the City: Urban Evolutionary Ecology of Avian Growth Rates." *Evolutionary Applications*, September, evo.13081. <https://doi.org/10.1111/eva.13081>.

- Costantini, David, and Simon Verhulst. 2009. "Does High Antioxidant Capacity Indicate Low Oxidative Stress?" *Functional Ecology* 23 (3): 506–9. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01546.x>.
- Cox, Amelia R., Raleigh J. Robertson, Adam Z. Lendvai, Kennedy Everitt, and Frances Bonier. 2019. "Rainy Springs Linked to Poor Nestling Growth in a Declining Avian Aerial Insectivore (*Tachycineta Bicolor*)." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286 (1898): 20190018. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0018>.
- Criscuolo, François, Pierre Bize, Lubna Nasir, Neil B. Metcalfe, Chris G. Foote, Kate Griffiths, Elizabeth A. Gault, and Pat Monaghan. 2009. "Real-Time Quantitative PCR Assay for Measurement of Avian Telomeres." *Journal of Avian Biology* 40 (3): 342–47. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2008.04623.x>.
- Dawson, Russell D., and Gary R. Bortolotti. 2000. "Reproductive Success of American Kestrels: The Role of Prey Abundance and Weather." *The Condor* 102 (4): 814–22. <https://doi.org/10.1093/condor/102.4.814>.
- Demeyrier, Virginie, Marcel M. Lambrechts, Philippe Perret, and Arnaud Grégoire. 2016. "Experimental Demonstration of an Ecological Trap for a Wild Bird in a Human-Transformed Environment." *Animal Behaviour* 118 (August): 181–90. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.06.007>.
- Epel, E. S., E. H. Blackburn, J. Lin, F. S. Dhabhar, N. E. Adler, J. D. Morrow, and R. M. Cawthon. 2004. "Accelerated Telomere Shortening in Response to Life Stress." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (49): 17312–15. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407162101>.
- Evans, Karl L., Kevin J. Gaston, Stuart P. Sharp, Andrew McGowan, and Ben J. Hatchwell. 2009. "The Effect of Urbanisation on Avian Morphology and Latitudinal Gradients in Body Size." *Oikos* 118 (2): 251–59. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.17092.x>.
- Gardner, Janet L., Anne Peters, Michael R. Kearney, Leo Joseph, and Robert Heinsohn. 2011. "Declining Body Size: A Third Universal Response to Warming?" *Trends in Ecology & Evolution* 26 (6): 285–91. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.005>.
- Gil, Diego, and Henrik Brumm. 2013. *Avian Urban Ecology*. Edited by Diego Gil and Henrik Brumm. *Avian Urban Ecology*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:osobl/9780199661572.001.0001>.
- Giraudeau, Mathieu, Frederic Angelier, and Tuul Sepp. 2019. "Do Telomeres Influence Pace-of-Life-Strategies in Response to Environmental Conditions over a Lifetime and between Generations?" *BioEssays* 41 (3): 1800162. <https://doi.org/10.1002/bies.201800162>.
- Giraudeau, Mathieu, Afton Chavez, Matthew B. Toomey, and Kevin J. McGraw. 2015. "Effects of Carotenoid Supplementation and Oxidative Challenges on Physiological Parameters and Carotenoid-Based Coloration in an Urbanization Context." *Behavioral Ecology and Sociobiology* 69 (6): 957–70. <https://doi.org/10.1007/s00265-015-1908-y>.
- Giraudeau, Mathieu, and Kevin J. McGraw. 2014. "Physiological Correlates of Urbanization in a Desert Songbird." *Integrative and Comparative Biology* 54 (4): 622–32. <https://doi.org/10.1093/icb/1024>.
- Grunst, A. S., M. L. Grunst, L. Bervoets, R. Pinxten, and M. Eens. 2020. "Proximity to Roads, but Not Exposure to Metal Pollution, Is Associated with Accelerated Developmental Telomere Shortening in Nestling Great Tits." *Environmental Pollution* 256 (January): 113373. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113373>.
- Hall, Margaret E., Lubna Nasir, Francis Daunt, Elizabeth A. Gault, John P. Croxall, Sarah Wanless, and Pat Monaghan. 2004. "Telomere Loss in Relation to Age and Early Environment in Long-Lived Birds." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271 (1548): 1571–76. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2768>.
- Hausmann, Mark F., and Robert A. Mauck. 2008. "Telomeres and Longevity: Testing an Evolutionary Hypothesis." *Molecular Biology and Evolution* 25 (1): 220–28. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm244>.
- Hausmann, Mark F., and Carol M. Vleck. 2002. "Telomere Length Provides a New Technique for Aging Animals."

*Oecologia* 130 (3): 325–28. <https://doi.org/10.1007/s00442-001-0827-y>.

- Hausmann, Mark F, David W Winkler, and Carol M Vleck. 2005. "Longer Telomeres Associated with Higher Survival in Birds." *Biology Letters* 1 (2): 212–14. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0301>.
- Herrera-Dueñas, Amparo, Javier Pineda-Pampliega, María T. Antonio-García, and José I. Aguirre. 2017. "The Influence of Urban Environments on Oxidative Stress Balance: A Case Study on the House Sparrow in the Iberian Peninsula." *Frontiers in Ecology and Evolution* 5 (SEP): 106. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00106>.
- Herrera-Dueñas, Amparo, Javier Pineda, María Teresa Antonio, and José I. Aguirre. 2014. "Oxidative Stress of House Sparrow as Bioindicator of Urban Pollution." *Ecological Indicators* 42: 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.08.014>.
- Hörak, P., Helen Vellau, Indrek Ots, and Anders Pape Møller. 2000. "Growth Conditions Affect Carotenoid-Based Plumage Coloration of Great Tit Nestlings." *Naturwissenschaften* 87 (10): 460–64. <https://doi.org/10.1007/s001140050759>.
- Hörak, Peeter, Peter F. Surai, Indrek Ots, and Anders P. Møller. 2004. "Fat Soluble Antioxidants in Brood-Rearing Great Tits *Parus Major*: Relations to Health and Appearance." *Journal of Avian Biology* 35 (1): 63–70. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2004.03167.x>.
- Ibáñez-Álamo, Juan Diego, Javier Pineda-Pampliega, Robert L. Thomson, José I. Aguirre, Alazne Díez-Fernández, Bruno Faivre, Jordi Figuerola, and Simon Verhulst. 2018. "Urban Blackbirds Have Shorter Telomeres." *Biology Letters* 14 (3): 20180083. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0083>.
- Isaksson, Caroline. 2010. "Pollution and Its Impact on Wild Animals: A Meta-Analysis on Oxidative Stress." *EcoHealth* 7 (3): 342–50. <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0345-7>.
- Isaksson, Caroline. 2015. "Urbanization, Oxidative Stress and Inflammation: A Question of Evolving, Acclimatizing or Coping with Urban Environmental Stress." *Functional Ecology* 29 (7): 913–23. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12477>.
- Isaksson, Caroline. 2020. "Urban Ecophysiology: Beyond Costs, Stress and Biomarkers." *Journal of Experimental Biology* 223 (22). <https://doi.org/10.1242/jeb.203794>.
- Isaksson, Caroline, and Staffan Andersson. 2007. "Carotenoid Diet and Nestling Provisioning in Urban and Rural Great Tits *Parus Major*." *Journal of Avian Biology* 38 (5): 564–72. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0908-8857.04030.x>.
- Isaksson, Caroline, Patricia McLAUGHLIN, Patricia MONAGHAN, and Staffan ANDERSSON. 2007. "Carotenoid Pigmentation Does Not Reflect Total Non-Enzymatic Antioxidant Activity in Plasma of Adult and Nestling Great Tits, *Parus Major*." *Functional Ecology* 21 (6): 1123–29. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01317.x>.
- Isaksson, Caroline, Jonas Örnborg, Eiríkur Stephensen, and Staffan Andersson. 2005. "Plasma Glutathione and Carotenoid Coloration as Potential Biomarkers of Environmental Stress in Great Tits." *EcoHealth* 2 (2): 138–46. <https://doi.org/10.1007/s10393-005-3869-5>.
- Jones, Elizabeth L., and Simon R. Leather. 2012. "Invertebrates in Urban Areas: A Review." *European Journal of Entomology* 109 (4): 463–78. <https://doi.org/10.14411/eje.2012.060>.
- Krijgsveld, K. L., G. H. Visser, and S. Daan. 2003. "Foraging Behavior and Physiological Changes in Precocial Quail Chicks in Response to Low Temperatures." *Physiology and Behavior* 79 (2): 311–19. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00117-3).
- Lévy, Marine, Josephine Al-Alam, Cyprien Ridacker, Sylvie Massemin, and Maurice Millet. 2018. "Use of XAD®-2

- Passive Air Samplers for Monitoring Environmental Trends of PAHs, PCBs and Pesticides in Three Different Sites in Strasbourg and Its Vicinity (East of France).” *Atmospheric Environment* 195 (December): 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.09.052>.
- Liker, A., Z. Papp, V. Bókony, and Á. Z. Lendvai. 2008. “Lean Birds in the City: Body Size and Condition of House Sparrows along the Urbanization Gradient.” *Journal of Animal Ecology* 77 (4): 789–95. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01402.x>.
- Marzluff, John M. 2001. “Worldwide Urbanization and Its Effects on Birds.” In *Avian Ecology and Conservation in an Urbanizing World*, 19–47. Boston, MA: Springer US. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1531-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1531-9_2).
- Meillère, Alizée, François Brischoux, Pierre Yves Henry, Bruno Michaud, Roger Garcin, and Frédéric Angelier. 2017. “Growing in a City: Consequences on Body Size and Plumage Quality in an Urban Dweller, the House Sparrow (*Passer Domesticus*).” *Landscape and Urban Planning* 160 (April): 127–38. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2016.12.014>.
- Meillère, Alizée, François Brischoux, Charline Parenteau, and Frédéric Angelier. 2015. “Influence of Urbanization on Body Size, Condition, and Physiology in an Urban Exploiter: A Multi-Component Approach.” *PLoS ONE* 10 (8): 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135685>.
- Milenkaya, Olga, Daniel H. Catlin, Sarah Legge, and Jeffrey R. Walters. 2015. “Body Condition Indices Predict Reproductive Success but Not Survival in a Sedentary, Tropical Bird.” Edited by André Chiaradia. *PLOS ONE* 10 (8): e0136582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136582>.
- Møller, Anders Pape. 2008. “Flight Distance of Urban Birds, Predation, and Selection for Urban Life.” *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63 (1): 63–75. <https://doi.org/10.1007/s00265-008-0636-y>.
- Monaghan, Pat. 2012. “Telomeres and Longevity.” *Aging*, February 2012. <https://doi.org/10.18632/aging.100437>.
- O’Brien, Robert M. 2007. “A Caution Regarding Rules of Thumb for Variance Inflation Factors.” *Quality and Quantity* 41 (5): 673–90. <https://doi.org/10.1007/s11135-006-9018-6>.
- Pauliny, Angela, Richard H. Wagner, Jakob Augustin, Tibor Szép, and Donald Blomqvist. 2006. “Age-Independent Telomere Length Predicts Fitness in Two Bird Species.” *Molecular Ecology* 15 (6): 1681–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02862.x>.
- Peach, Will J., John W. Mallord, Nancy Ockendon, Chris J. Orsman, and William G. Haines. 2015. “Invertebrate Prey Availability Limits Reproductive Success but Not Breeding Population Size in Suburban House Sparrows *Passer Domesticus*.” Edited by Rob Robinson. *Ibis* 157 (3): 601–13. <https://doi.org/10.1111/ibi.12264>.
- Pérez-Rodríguez, Lorenzo, Ana A. Romero-Haro, Audrey Sternalski, Jaime Muriel, Francois Mougeot, Diego Gil, and Carlos Alonso-Alvarez. 2015. “Measuring Oxidative Stress: The Confounding Effect of Lipid Concentration in Measures of Lipid Peroxidation.” *Physiological and Biochemical Zoology* 88 (3): 345–51. <https://doi.org/10.1086/680688>.
- R Development Core Team. 2021. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Edited by R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. <http://www.r-project.org/>.
- Robertson, Raleigh J., and Wallace B. Rendell. 2001. “A Long-Term Study of Reproductive Performance in Tree Swallows: The Influence of Age and Senescence on Output.” *Journal of Animal Ecology* 70 (6): 1014–31. <https://doi.org/10.1046/j.0021-8790.2001.00555.x>.
- Salmón, P., J. F. Nilsson, A. Nord, S. Bensch, and Caroline Isaksson. 2016. “Urban Environment Shortens Telomere Length in Nestling Great Tits, *Parus Major*.” *Biology Letters* 12 (6): 20160155. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0155>.
- Salmón, Pablo, Johan F Nilsson, Hannah Watson, Staffan Bensch, and Caroline Isaksson. 2017. “Selective

- Disappearance of Great Tits with Short Telomeres in Urban Areas." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284 (1862). <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1349>.
- Salmón, Pablo, Emilie Stroh, Amparo Herrera-Dueñas, Maria von Post, and Caroline Isaksson. 2018. "Oxidative Stress in Birds along a NO<sub>x</sub> and Urbanisation Gradient: An Interspecific Approach." *Science of the Total Environment* 622–623 (x): 635–43. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.354>.
- Salmón, Pablo, Hannah Watson, Andreas Nord, and Caroline Isaksson. 2018. "Effects of the Urban Environment on Oxidative Stress in Early Life: Insights from a Cross-Fostering Experiment." *Integrative and Comparative Biology* 58 (5): 986–94. <https://doi.org/10.1093/icb/icy099>.
- Saulnier, Agnès, Josefa Bleu, Anne Boos, Islah El Masoudi, Pascale Ronot, Sandrine Zahn, Mirella Del Nero, and Sylvie Massemin. 2020. "Consequences of Trace Metal Cocktail Exposure in Zebra Finch (*Taeniopygia Guttata*) and Effect of Calcium Supplementation." *Ecotoxicology and Environmental Safety* 193 (November 2019): 110357. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110357>.
- Schlicht, Lotte, and Bart Kempnaers. 2020. "The Effects of Season, Sex, Age and Weather on Population-Level Variation in the Timing of Activity in Eurasian Blue Tits *Cyanistes Caeruleus*." *Ibis* 162 (4): 1146–62. <https://doi.org/10.1111/IBI.12818>.
- Sepp, Tuul, Kevin J. McGraw, Ants Kaasik, and Mathieu Giraudeau. 2017. "A Review of Urban Impacts on Avian Life-history Evolution: Does City Living Lead to Slower Pace of Life?" *Global Change Biology* 24 (4): 1452–69. <https://doi.org/10.1111/gcb.13969>.
- Seress, Gábor, Veronika Bókony, Ivett Pipoly, Tibor Szép, Károly Nagy, and András Liker. 2012. "Urbanization, Nestling Growth and Reproductive Success in a Moderately Declining House Sparrow Population." *Journal of Avian Biology* 43 (5): 403–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2012.05527.x>.
- Stauffer, Janina, Bineet Panda, Tapio Eeva, Miia J. Rainio, and Petteri Ilmonen. 2017. "Telomere Damage and Redox Status Alterations in Free-Living Passerines Exposed to Metals." *Science of the Total Environment* 575: 841–48. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.131>.
- Stier, Antoine, Anne Delestrade, Sandrine Zahn, Mathilde Arrivé, François Criscuolo, and Sylvie Massemin-Challet. 2014. "Elevation Impacts the Balance between Growth and Oxidative Stress in Coal Tits." *Oecologia* 175 (3): 791–800. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-2946-2>.
- Thomas, D. W., J. Blondel, P. Perret, M. M. Lambrechts, and J. R. Speakman. 2001. "Energetic and Fitness Costs of Mismatching Resource Supply and Demand in Seasonally Breeding Birds." *Science* 291 (5513): 2598–2600. <https://doi.org/10.1126/science.1057487>.
- Verhulst, S., J. H. van Balen, and J. M. Tinbergen. 1995. "Seasonal Decline in Reproductive Success of the Great Tit: Variation in Time or Quality?" *Ecology* 76 (8): 2392–2403. <https://doi.org/10.2307/2265815>.
- Wawrzyniak, J., M. Gładalski, A. Kaliński, M. Bańbura, M. Markowski, J. Skwarska, P. Zieliński, and J. Bańbura. 2020. "Differences in the Breeding Performance of Great Tits *Parus Major* between a Forest and an Urban Area: A Long Term Study on First Clutches." *The European Zoological Journal* 87 (1): 294–309. <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1766125>.

**Acknowledgements:**

We would like to thank Caroline, Alice and all the students who assisted us in the field and contributed to collect and analyze the data. We also thank the *Université de Strasbourg*, the *Eurometropole of Strasbourg*, the associations *Société Régionale de Protection des Oiseaux (S.R.P.O)*, *Campus Vert* and A. Gros for their authorization to install and monitor nest boxes along the gradient.

**Ethic approval**

This work is in accordance with the French legislation concerning the capture and the biological sampling of wildlife. SM, JB and PU received ringing licenses and authorizations for blood sampling from the CRBPO (National Museum of Natural History) as part of a research program led by SM (PP N°673). The protocol has been approved by the French national ethical committee n°35 and approved by the French ministry of research (project APAFIS# 9160-2017030316182730 v2).

**Fundings**

This work was supported by ZAEU and by the “BIOECO-MET” project of the Program PEPs FaiDoRa of CNRS. AS is also the recipient of a Ph.D. grant from the French Ministry of Research.

**Author's contribution**

**Agnès Saulnier:** Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing- original draft and Review & Editing, Visualization. **Josefa Bleu:** Validation, Formal analysis, Investigation, Data curation, Writing- original draft and review & Editing, Visualization and Supervision. **Anne Boos:** Methodology, Validation, Investigation, Resources, Writing- Review & Editing. **Sandrine Zahn:** Methodology, Validation, Investigation, Resources, Writing- Review & Editing. **Pascale Ronot:** Methodology, Validation, Investigation, Writing- Review & Editing. **Islah El Masoudi:** Methodology, Validation, Investigation, Writing- Review & Editing. **Emilio R. Rojas:** Investigation, Data curation, Writing- Review & Editing. **Pierre Uhlrich:** Investigation, Data curation, Writing- Review & Editing. **Mirella Del Nero:** Writing- Review & Editing, Funding acquisition. **Sylvie Massemin:** Conceptualization, Validation, Formal analysis, Investigation, Resources, Data Curation, Writing - Original Draft and Review & Editing, Visualization, Supervision, Project administration, Funding acquisition

## Chapitre 2

---

### 2.2. Le milieu urbain exerce-t-il un rôle de filtre sur la qualité des individus ?

#### Contexte

Plusieurs paramètres morphologiques et physiologiques mesurés précédemment chez les reproducteurs urbains tels que de meilleures défenses antioxydante, des télomères plus longs laissent supposer que le milieu urbain exercerait un rôle de filtre pour l'accès à la reproduction en ville basé sur la qualité des individus. Le milieu urbain étant un milieu contraignant, il est possible que seuls les individus de bonne qualité puissent mener à bien la reproduction, les individus de mauvaise qualité ne pouvant pas initier la reproduction ou abandonnant de manière précoce. Dans ce cas, les valeurs des traits physiologiques observés chez les reproducteurs augmenteront par rapport à leurs valeurs réelles dans la population générale. Le but de cette étude était donc de tester cette hypothèse du filtre urbain pour l'accès à la reproduction, en comparant la qualité des reproducteurs à celle de la population générale en hiver pour y déceler des différences. Mais, tandis que les traits d'histoire de vie et la longueur des télomères varient avec l'âge des individus, il est possible que nos résultats indiquent que les reproducteurs urbains sont plus jeunes que les reproducteurs forestiers, c'est pourquoi nous avons également considéré l'âge de nos oiseaux sur chaque site. Pour déterminer la qualité des individus nous avons mesuré la condition corporelle et la longueur des télomères des individus. Nous avons également mesuré la taille des individus pour mieux comprendre le caractère adaptatif de ce paramètre.

#### Résultats

Aucune différence de condition corporelle n'a été observée entre les sites et entre les saisons. En revanche, les oiseaux urbains étaient plus petits que les oiseaux forestiers comme observés précédemment. Mais de manière intéressante, les reproducteurs urbains étaient également plus petits que les oiseaux capturés en hiver sur le même site. Les individus urbains présentaient également des télomères plus longs que les individus forestiers, mais seulement en hiver. Aucune différence n'a été observée chez les reproducteurs.

#### Conclusion

Ces résultats tendent à montrer qu'une plus petite taille conférerait un avantage en milieu urbain pour accéder à la reproduction. Par exemple, une petite taille accroît la manœuvrabilité ce qui peut par exemple conférer un avantage pour échapper aux prédateurs ou se déplacer et fourrager dans une matrice urbaine complexe. Mais l'origine de phénotype en ville reste encore à déterminer, d'autant plus que certaines études semblent montrer qu'une plus petite taille pourrait être liée à des troubles de croissance chez les poussins urbains, encore visible à l'âge adulte. Pour confirmer l'avantage d'une taille corporelle plus petite en ville, il faudrait tester la

corrélation entre cette taille et la survie des oiseaux. De plus, les résultats obtenus pour les télomères ne soutiennent pas l'hypothèse du filtre urbain et semblent soutenir l'existence d'un coût plus important de la reproduction en ville. Mais des études à plus long-terme sont nécessaires pour comprendre la dynamique de ce paramètre entre les saisons pour chacun des sites.

Ce chapitre 2.2 est présenté sous la forme d'un manuscrit publié dans le journal *Birds*

**Manuscrit 3- Saulnier, A., Bleu, J., Lemonnier, G., Uhlrich, P., Zahn, S. and Massemin, S. 2022**  
Does the urban environment act as a filter on the individual quality of birds ? *Birds* 3:84-98,  
Special issue « Feature paper of bird 2021 » (manuscript 3)

## Article

# Does the Urban Environment Act as a Filter on the Individual Quality of Birds?

Agnès Saulnier <sup>1,\*</sup>, Josefa Bleu <sup>1,2</sup> , Gildas Lemonnier <sup>1,2</sup>, Pierre Uhlrich <sup>1,2</sup>, Sandrine Zahn <sup>1,2</sup>  and Sylvie Massemin <sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Département d'Ecologie, Physiologie et Ethologie, Institut Pluridisciplinaire Hubert Curien, UMR 7178 CNRS-Université de Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France; josefa.bleu@iphc.cnrs.fr (J.B.); gildas.lemonnier@iphc.cnrs.fr (G.L.); pierre.uhlrich@iphc.cnrs.fr (P.U.); sandrine.zahn@iphc.cnrs.fr (S.Z.); sylvie.massemin@iphc.cnrs.fr (S.M.)

<sup>2</sup> ZAEU, Maison Interuniversitaire des Sciences de l'Homme-Alsace (MISHA), 5, allée du Général Rouvillois, CS 50008, CEDEX, 67083 Strasbourg, France

\* Correspondence: agnes.saulnier@iphc.cnrs.fr

**Simple Summary:** The urban environment is considered to be challenging for urban birds due to the deep modification of biotic and abiotic factors compared to natural habitats. However, some studies on physiology have showed that urban breeders appear to be of better health than rural breeders. A hypothesis can explain these results: cities act as a filter on individuals, and only the best-performing birds can access and succeed in reproduction. To test this hypothesis, we compared the quality of urban and forest Great Tits before and during breeding to highlight potential differences between the general population (winter) and breeders in each site. Quality was estimated from body size and body condition, as well as telomere length, a DNA marker of bird health and longevity. No differences in body condition were observed. However, urban birds were smaller than forest birds, and, in the city only, breeders were smaller than birds captured in winter. These results highlight that urban habitats potentially favor smaller birds. Finally, urban individuals had longer telomeres than forest ones, but only in winter. The decrease in telomere length between winter and reproduction only in the city suggests a higher cost of reproduction in the city compared to the forest.

**Abstract:** Phenotypic divergences of birds are common between urban and natural habitats and can result from different selective pressures between habitats or maladaptation to the city. No uniform patterns were observed, especially concerning markers of bird health, such as, for example, telomere length. Telomeres are involved in maintaining genome integrity and naturally shorten with age, but environmental stressors can accelerate their attrition. Thus, telomere length can be an indicator of individual quality. Some studies showed that urban breeders had longer telomeres than forest individuals. Two hypotheses can explain this result: (1) urban breeders are younger than forest breeders, and (2) cities act as a filter on individuals and only high-quality birds can successfully reproduce. In this context, we compared the age category (molting pattern) and morphological and physiological characteristics of urban and forest Great Tits before and during breeding. No differences in age or body condition were observed. However, urban breeders were smaller and had shorter telomeres than birds captured in winter. Urban birds had longer telomeres than forest birds, only in winter. These results highlight that urban habitats potentially favor smaller birds. However, the decrease in telomere length between winter and reproduction only in the city suggest a higher cost of reproduction in the city compared to the forest.

**Keywords:** urbanization; telomere; selection; *Parus major*; individual quality



**Citation:** Saulnier, A.; Bleu, J.; Lemonnier, G.; Uhlrich, P.; Zahn, S.; Massemin, S. Does the Urban Environment Act as a Filter on the Individual Quality of Birds? *Birds* **2022**, *3*, 84–98. <https://doi.org/10.3390/birds3010007>

Academic Editor: Jukka Jokimäki

Received: 30 November 2021

Accepted: 26 January 2022

Published: 5 February 2022

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Each individual must optimize the energy allocation between survival and reproductive investment in order to maximize its fitness because resources are limited in the

field [1,2]. These optimized trade-offs between somatic maintenance and reproduction depend on individual capacity to exploit these resources [3]. Some individuals more efficient in resource acquisition are able to reduce the trade-off and allocate energy to both reproduction and self-maintenance, allowing high reproductive success while limiting the impact of reproduction on their survival [4,5]. These individuals are so-called of better 'quality', and will display a higher level of individual performance [5,6]. In this case, phenotypic traits such as morphological, physiological and behavioral ones are positively correlated with both fitness components, namely reproduction and survival [6,7]. Heterogeneity in individual quality and performance will therefore depend on environmental constraints. To some extent, resource limitations will favor good-quality individuals which are able to survive and reproduce, while poor-quality individuals exhibit high reproductive costs [6]. However, too harsh conditions may decrease the heterogeneity due to the important mortality of poor-quality birds, leading to a homogenization of the phenotypes. For a given phenotype, individual performance can also fluctuate with age and/or experience [8–10]. This implies that individual quality can vary over time. In fact, experimented birds tend to have a better reproductive success than first-year breeders [8,11,12], and the maturation hypothesis [13] supports the suggesting that this may be due to improvements in some skills, such as foraging ability [12], better timing of reproduction [14,15], or the increasing efficiency of the endocrine system (i.e., increase in prolactin levels) [16].

The urban environment, whose area extent is increasing every year with human population expansion (United Nations 2018), is considered to be challenging for urban birds [17–19] due to its deep modification of biotic and abiotic factors compared to natural habitats. In fact, among other things, urbanization leads to habitat fragmentation and a significant decrease in vegetal cover, as well as an increasing lighting duration and noise levels, a local temperature increase and chronic exposure to numerous toxic chemical compounds [20]. Changes in interspecific relationships have also been observed, resulting in a decrease in invertebrate availability during bird reproduction [21,22] or the modification of predator species, with a higher prevalence of opportunist nest predators [23] such as corvid predators [24,25] and mesopredators such as feral cats [26,27]. Modified avian productivity is also observed in cities [28,29]. Some studies have reported a decreasing reproductive success among passerine birds [18,30–32], while others showed no difference or a better reproductive success rate [29]. Even when buildings, artificial nest boxes or human structures offer new nesting opportunities, especially for cavicole species [24], insect availability during the breeding period remains lower [22,33], and food nutritional quality is inadequate [34–36]. Thus, the energy expenditure associated with foraging is higher in the city [36,37], as well as parental nest attendance [38], potentially leading to higher energy expenditure for urban birds than forest birds.

At the scale of bird communities, moderate urbanization leads to an increase in species richness [39]. All the same, homogenization of bird communities has been observed in cities, with the same urban-tolerant species thriving from one site to another [40,41] and exhibiting similar functional traits [42,43]. For these urban-tolerant species, physiological and morphological divergences are observed in many studies when comparing rural and urban populations [29]. Among these differences, many studies have shown that urban birds are often smaller and lighter than their rural counterparts [18,44,45], although this pattern is not always recurrent [46]. The question of the adaptive functions of these morphological divergences remains open. In the one hand, higher food predictability in cities due to anthropogenic food provisioning reduces the necessity of energetic reserves [47], leading to lighter birds. Smaller and lighter birds are able to escape from predators more quickly [48,49], an advantage for survival and access to reproduction. On the other hand, morphological differences may be the result of growth impairment related to nutritional deficiencies [18,45,50] or greater competition between individuals for access to resources [47]. Considering that a smaller size and weaker body condition may be indicators of poorer quality [44] due to a negative relationship with the reproduction [6,51] and survival of

birds [52,53], these studies tend to show that urbanization contributes to a decrease in the quality of individuals.

Physiological and genomic changes are also observed in urban individuals, and several studies suggest environmental pressures on individual health and survival [29]. Telomeres, non-coding repeat sequences in the distal region of chromosomes, contribute to maintaining genetic integrity during cell division [54]. The attrition of telomeres determines the senescence of the cells [55]. The age-dependent attrition of telomeres is observed in many species [56], and thus telomere length and attrition rate can be considered as a marker of longevity [57,58]. In addition, exposure to chemical pollutants [59,60], noise pollution [61,62] or excessive stress [63] contribute to accelerating the attrition of telomeres, in particular by influencing the oxidative status of individuals [64–67]. Telomere length is therefore representative of an individual's ability to maintain somatic integrity in the face of environmental constraints and to cope with the energetic cost of reproduction [4], thus reflecting individual quality [68]. Although some studies have shown that urban individuals have shorter telomeres than forest individuals [69], our previous results (Saulnier et al., submitted) and another study showed an opposite pattern for Great Tits [70]. These results suggest that the urban environment plays a selective role, where only high-quality individuals are able to survive and/or reproduce in the city. In particular, in studies on Great Tits, breeders consist of individuals that have been able to invest energy in reproduction while being able to invest in self-maintenance because they are generally caught when nestlings are already 1 week old, when the risk of desertion is lowest. Birds that fail their reproduction early (egg laying or early hatching) are not included, and thus breeders are not representative of the general population. Another possibility to explain the longer telomeres in urban breeders is, as telomeres tend to shorten with age, that birds are younger in the city than in the forest, with mature individuals either dying or migrating to more favorable sites less constraining for the reproduction.

The first aim of this study was therefore to determine whether the urban environment really plays a filtering role on the quality of the individuals living in this environment. In this context, we monitored an urban population and a forest population of Great Tits nesting in artificial nest boxes in the Eurometropole of Strasbourg (Alsace, France). Adult birds were caught during winter and spring in order to compare the quality of individuals in the population before the breeding period and the population of breeders for both sites. The quality of birds was assessed using telomere length, morphology and reproductive success of birds. Following the hypothesis of the filtering role of the urban environment on bird quality, we expected to observe longer telomeres, larger size and better body condition for individuals captured during the breeding period compared to individuals captured in winter in the city, whereas no difference would be detected in the forest population. Based on molting pattern, the age category of the individuals (2 years old young breeders versus older breeders >2 years old) was also estimated in order to test the hypothesis of younger breeders. The second aim of this study was to test the existence of reproductive costs in terms of body condition and telomere length using the longitudinal data of individuals captured in winter and recaptured during the breeding period. Considering higher reproductive constraints in the city, we expected a greater decrease in body condition and telomere length in the urban site than the forest site.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Study Site and Animal Sampling

This study, conducted between February and June 2019, is part of a long-term monitoring of populations of the Great Tits (*Parus major*) living in artificial nest boxes along an urbanization gradient in the Eurometropole of Strasbourg (Alsace, France). The Great Tit is a common passerine that breeds easily in artificial nest boxes, facilitating the monitoring of reproduction and adult captures. Moreover, this species is considered to be an urban adapter, and is able to live in both anthropogenic and natural areas. Great Tits breed between April and June and lay, on average, 7.5 eggs in the city and 9 eggs in forests (in our

populations, Saulnier et al., submitted), which are incubated for approximately 13 days. Two populations were monitored: an urban population living in different urban parks and tree-lined walkways in the core area of Strasbourg (48.5793 N; 7.7677 W, population density = 3488 inhab./km<sup>2</sup>), and a forest population living in La Wantzenau forest within 12–20 km of Strasbourg (48.6480 N; 7.8337 W, population density = 231 inhab./km<sup>2</sup>). The urban site is characterized mostly by no-vegetation (roads, bare rock, soil, and building) and low-vegetation (herbaceous and small bushes) surfaces, whereas the forest site is an alluvial forest composed of tree species such as ash, beech, sycamore, maple, and oak. Some of our previous results (Saulnier et al., submitted) show that the pollutant concentrations of the two sites are similar. However, concerning the food availability, urban birds are often fed at bird feeders in winter by residents, especially in urban parks, but the invertebrate abundance is 1.5- to 2-times less than in forests during reproduction.

Individuals from both sites were captured during two sessions: one in winter (between February and March), after birds disperse but before breeding, and one during reproduction (first clutch, April–May). Great Tits are mostly insectivorous during the breeding period, but in winter they are granivorous, and are frequently found near bird feeders. Two methods were used simultaneously to capture individuals in winter. The first method consisted of using trap feeders placed as close as possible to areas where humans fed birds (mostly for urban sites). The second method was the use of mist nets with dimensions of 10 × 2.5 m placed preferentially near dense vegetation areas. The low vegetation cover made the nets overtly visible to the birds in urban sites, and the majority of urban individuals were caught with the trap feeders (21/28 individuals). On contrary, in the forest site, birds are not accustomed to feeders and no birds were captured with the trap feeder. During the breeding period, adults were captured using a trapdoor system installed at the entrance to the nest boxes. The capture occurred when nestlings were between 8 and 16 days old (before 8 days, nest desertion probability is high and after 16 days, the risk of early fledging is very high). Thus, we only captured birds that successfully raised nestlings until 8 days old. During the breeding season, we also monitored the reproduction of birds to estimate the breeding success. For each occupied nest box, we recorded the laying date, the clutch size, the hatching date ( $\pm 0.5$  d), the number of hatchings and the number of fledglings. The number of hatchings was calculated as the difference between clutch size and the number of unhatched eggs. Thirty nest boxes were occupied by Great Tits among the 92 monitored boxes in the urban site, and 36 nest boxes were occupied among the 65 monitored boxes in the forest site (see Appendix A for more details on nest box occupation rate). Only 3 nests were deserted before hatching, all in the city. Several desertions at the nestling stage were observed in both sites: 7 and 2 nests were deserted in the urban and forest sites, respectively. One nest was also predated in the forest site, but before the capture of adults. The nest predation rate in our study sites was relatively low, and did not exceed 2 to 3 nests per year and per site. The major predators observed were domestic cats in the city and some *Mustelidae* species in the forest.

All captured individuals were ringed with a metal ring for identification. The recapture rate of fledglings in the recruited population was very low, and the number of individuals with known age was only 12 birds (4 and 8 birds in the urban and forest sites, respectively). For this reason, the age of birds was estimated from the color of the primary coverts on the wings. This technique allowed a distinction between individuals in their second year (2 years old or 2 y.o.) with a partial post-juvenile molt (bluish edges only in greater coverts) of the previous year from older individuals (>2 years old or >2 y.o.) with a complete post-breeding molt and all wing feathers with bluish edges (see Appendix B for more details on sample size). Individuals were also sexed using the width of the ventral black tie (larger for males), but also with the presence of a brood patch for females during reproduction.

Several morphometric measurements were used to estimate the body size and body condition of the birds: body mass, measured with a precision balance ( $\pm 0.1$  g), tarsus length and head-to-beak distance (from the back of the head to the tip of the beak), measured with a caliper ( $\pm 0.1$  mm) and length of closed, flattened wing, measured with a ruler ( $\pm 0.5$  mm).

Finally, for each individual, we took a blood sample (75  $\mu$ L) from the brachial vein using a heparinized capillary after skin breach with a sterile needle. In the field, the blood samples were kept at +4 °C in a cooler. At the end of each daily field session, the samples were centrifuged at 4000  $\times$  *g* for 10 min to separate the plasma from the erythrocytes. Then, samples were stored at –80 °C until laboratory analysis.

In winter, 28 individuals were captured in the city and 30 in the forest. Among these individuals, 16 were recaptured during the breeding period in the urban site and 15 in the forest site. During the breeding season, 31 individuals not previously captured in winter were also captured in the urban site and 40 in the forest site. This work was conducted in accordance with the guidelines of the French legislation concerning the capture and biological sampling of wildlife, and was approved by the Bas-Rhin department prefect, a French national ethical committee and the CRBPO (National Museum of Natural History)—see more details in the Institutional Review Board Statement.

### 2.2. Relative Telomere Length Analysis

The relative telomere length (RTL) was measured using a quantitative polymerase chain reaction (qPCR) from DNA extracted from the erythrocytes of birds. This method gives a relative length corresponding to a ratio between the length of amplified telomeres sequence (T) and the length of an amplified control gene sequence (S), which is identical for all individuals. The control gene used for this species is the *Parus major* zinc finger protein (ZENK) gene (GenBank: EF568148). The qPCR method for RTL measurement in the bird was described and validated by Criscuolo et al. [71].

The DNA extraction was realized on a column using the NucleoSpin® Blood Quick Pure (Macherey-Nagel®, Düren, Germany) kit from erythrocytes diluted at 1:40 in PBS 1X. The qPCR was performed on a 96-well plate. The reaction volume in each well was 10  $\mu$ L with 2 ng of DNA. Each sample was measured in duplicate, and on each plate, an inter-plate control sample, a negative control (DNase-free water), and a standard range obtained by the cascade dilution of a DNA control (8, 4, 2, 1 and 0.5 ng) as a control of amplification efficiency were deposited. Amplification of telomere sequences and the control gene took place on separate plates. The amplification cycle was performed with a final volume of 10  $\mu$ L per well with 2 ng of DNA (2  $\mu$ L), and 8  $\mu$ L of reaction mix containing a GoTaq® qPCR (Promega, Madison, WI, USA). For the control gene, amplification started with 2 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 56 °C and 1 min 30 s at 72 °C. The conditions of telomere amplification were similar except for the number of cycles and the elongation step: 30 cycles of 15 s at 95 °C, 30 s at 56 °C and 30 s at 72 °C. Both assays were followed by melting curve analysis. Primers sequences are provided in Appendix C. The mean efficiency of amplification for the control gene was  $97.5 \pm 4.9\%$  and  $99.9 \pm 4.5\%$  for telomeres. The mean intra-individual Cq (number of cycles necessary to detect amplified DNA above basal signal) variation was  $1.50 \pm 1.33\%$  for the control assay and  $2.51 \pm 2.39\%$  for the telomere assay. The mean inter-run Cq variation was 2.40% and 4.90% for the control gene and telomeres, respectively. In total, 151 samples were analyzed. Ten birds were excluded from the telomere analysis either because (1) we did not manage to obtain a sufficient amount of blood ( $n = 7$ ), or (2) the sample quality was not sufficient ( $n = 3$ ). These individuals were excluded from the telomere analysis.

### 2.3. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using R software (version 4.1.0, [72]) with a significance threshold set to  $\alpha = 0.05\%$ . All tested models were followed with type II ANOVA, and post hoc significance effects of interaction, or factor variables, were tested using Tukey tests. The model application conditions were tested using the Kolmogorov–Smirnov test (normality), the Levene test (homoscedasticity), and the collinearity test (variance inflation factor < 5). For all analyses, telomeres were z-transformed [73], and the hatching date was expressed as the relative day from 1 March.

Tarsus length, head-to-beak distance and wing length were scaled and included in a principal component analysis (PCA) to estimate a body size index for each bird. The body size index corresponded to the first dimension of the PCA and explained 62.26% of the total variation. This body size index was used to estimate the body condition of birds, which corresponded to the residuals of the linear regression between body mass and body size index ( $R^2 = 0.37$ ,  $p < 0.001$ ). The residuals of body mass associated with the integrative measure of structure size is a reliable size-independent index of body condition [74,75]. We aimed to compare the quality of birds between seasons and sites. To address this aim, we used mixed models with the entire dataset, i.e., including all caught birds. The differences in age class were tested using a generalized linear mixed model with a binomial family (function `glmer` (package `lme4` [76]), 0: 2 y.o. birds, 1: >2 y.o. birds). The differences in body condition, body size index and RTL were tested using T linear mixed models (function `lmer`, package `lme4`). In all models, bird ID was included as a random factor to take into account recaptures. Each model included the following covariates: the site (urban or forest), the season (winter or reproduction), the sex, the interaction between site and season, and the interaction between site and sex. For body size index, body condition and RTL, the age and the interaction between sites and age was also included in the models. For RTL, the body condition was also included in the model. Non-significant interactions were removed sequentially.

The second aim was to test the individual changes in telomere length and body condition with longitudinal data. For this, we used only a subset of the dataset, including only birds that were captured on both occasions. Changes in body condition and RTL were calculated by subtracting the measure made during breeding to the measure made during winter. Linear models (function `lm`) included the site, the sex and the age as explanatory variables, but also the fledgling number and the hatching date, to take into account reproductive investment and the timing of breeding. For the RTL model, winter RTL was also included to take into account the initial telomere length in telomere attrition.

### 3. Results

Age of captured birds was significantly different between sex, whatever the season or the site (Table 1, also see Appendix D for estimates). Captured females were younger than captured males (Tukey,  $p < 0.001$ ). For body condition, none of the tested variables were significant (Table 1, also see Appendix D for estimates).

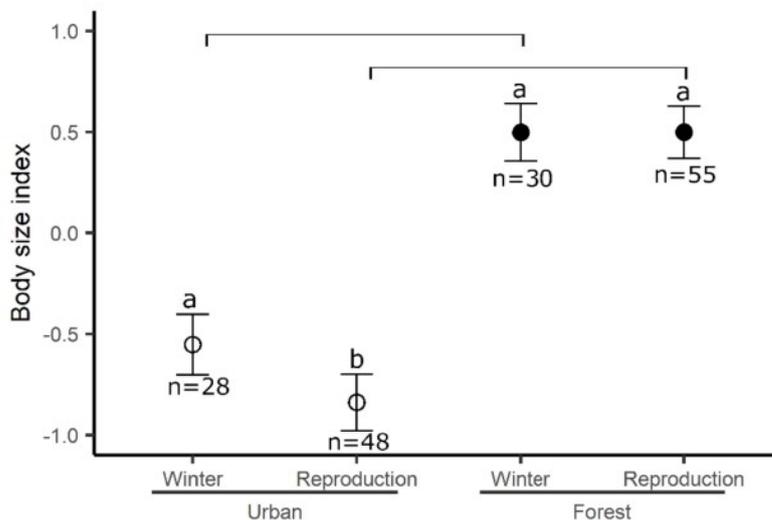
**Table 1.** Result of statistical analyses of morphological and genomic parameters between urban and forest birds and between seasons (winter and reproduction).

Variable	Age (n = 161)			Body Size Index (n = 161)			Body Condition (n = 161)			RTL (n = 151)		
	Chi <sup>2</sup>	df	p	F	df	p	F	df	p	F	df	p
Site	0.156	1, 154	0.693	45.66	1, 153	<b>&lt;0.001</b>	0.6002	1, 149	0.440	0.548	1, 142	0.461
Sex	61.35	1, 154	<b>&lt;0.001</b>	39.97	1, 153	<b>&lt;0.001</b>	1.6297	1, 149	0.203	0.395	1, 142	0.531
Season	0.400	1, 154	0.527	4.46	1, 153	<b>0.042</b>	3.9457	1, 149	0.051	0.623	1, 142	0.432
Age				5.82	1, 153	<b>0.017</b>	1.1800	1, 149	0.280	0.812	1, 142	0.370
Body condition										0.577	1, 142	0.450
Site × Age												
Site × Season				4.18	1, 153	<b>0.048</b>				4.525	1, 142	<b>0.037</b>
Site × Sex												

Note: RTL means relative telomere length. Significant values (under  $p = 0.05$ ) are in bold.

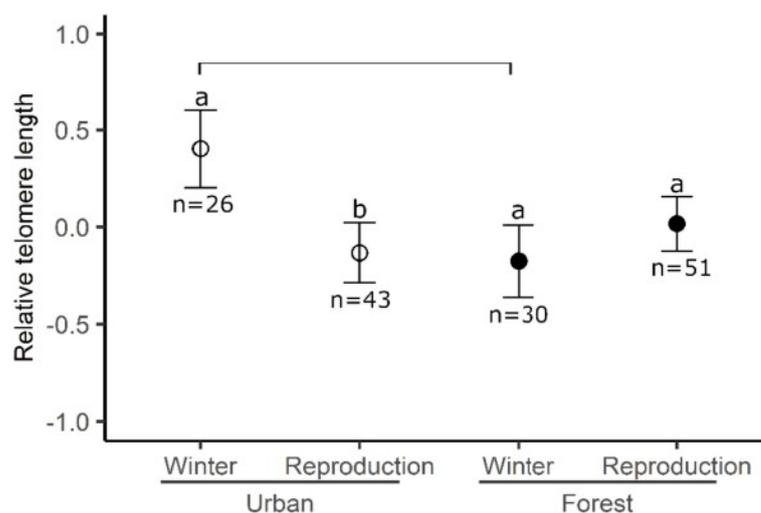
For the body size index, a significant interaction between the season and the site was observed (Table 1, Figure 1, Appendix C). Forest birds were larger than urban birds in both seasons (Tukey, all  $p < 0.001$ ). However, the difference was more important during the reproduction season. In the urban environment, individuals captured during the reproductive season were smaller than birds captured during the winter (Tukey,  $p = 0.005$ ). The

body size index also varied significantly according to the age of birds—young individuals tended to be smaller than older ones (Tukey,  $p = 0.02$ ). A significant effect of sex was also observed, with smaller females than males (Tukey,  $p < 0.001$ ).



**Figure 1.** The body size of birds between sites across seasons. Means and standard errors are represented. Different letters represent significant differences between seasons for the same site and bars represent the difference between sites for the same season (see text for details).

The interaction between the season and the site was also significant for RTL (Table 1, Figure 2, see also Appendix D for estimates). Urban birds in winter had longer telomeres than urban birds captured during reproduction (Tukey;  $p = 0.039$ ) and forest birds in winter (Tukey,  $p = 0.034$ ). No site-dependent differences in telomeres were observed during reproduction (Tukey,  $p = 0.48$ ).



**Figure 2.** The relative telomere length of birds between sites across seasons. Means and standard errors are represented. Different letters represent significant differences between seasons for the same site and bars represent the difference between sites for the same season (see text for details).

Ultimately, we analyzed variation in body condition and RTL for birds captured in both seasons. None of the tested variables significantly explained change in body condition or change in RTL between winter and reproduction (Table 2, also see Appendix D for estimates).

**Table 2.** Result of statistical analyses of morphological and genomic parameters changes between seasons for re-caught birds.

Variable	Body Condition ( <i>n</i> = 27)			RTL ( <i>n</i> = 23)		
	F	df	<i>p</i>	F	df	<i>p</i>
Site	0.048	1, 21	0.829	0.161	1, 16	0.694
Sex	0.523	1, 21	0.478	1.105	1, 16	0.310
Age	2.287	1, 21	0.146	0.069	1, 16	0.796
Fledging number	0.850	1, 21	0.367	0.689	1, 16	0.419
Hatching date	0.111	1, 21	0.742	2.778	1, 16	0.115
RTL Winter				0.527	1, 16	0.479

Note: RTL means relative telomere length.

#### 4. Discussion

No differences in body condition were observed between sites or seasons. The body condition before breeding is correlated with breeding success [51,77] due to the high energetic requirements associated with reproduction. Nevertheless, a difference in body condition is not consistently observed in studies on urbanization in different bird species, especially for adult birds [29]. The lack of prey in cities is compensated for by anthropogenic food, which is more reliable and abundant. However, human-provided foods are often of poor quality compared to natural ones, often containing an inadequate protein content, and can lead to potential physiological impairments [78]. However, our study highlighted that urban individuals had a smaller body size than forest individuals, whatever the season, and that, for the urban site only, birds captured during breeding were smaller than birds captured during winter. The smaller size of urban individuals is a common pattern, and has been found in many studies [79–81]. Several hypotheses can explain this result. Some studies tend to show that smaller size is a response to microclimates and urban heat islands according to Bergmann's law [46]. Urban pressures during the early stages of life can also lead to growth delays and impairment [18,50] that may still be visible in adulthood. Other studies highlight the advantages of a smaller size in an urban environment. In fact, a smaller size improves the maneuverability of birds, but also the climb rate and the maximum speed [82]. The flight performance improvement can ensure better mobility in a complex and fragmented urban matrix, but it also ensures better avoidance of predators [44,83,84]. Following this hypothesis, the smaller body size of urban breeders compared to winter birds suggests that the urban environment would have a filtering role based on bird morphology, with a smaller size conferring an advantage regarding reproduction success, potentially since these birds are more agile or less prone to predation. Therefore, these size differences are either the result of micro-evolutionary processes or due to phenotypic plasticity resulting from environmental constraints, as demonstrated in a different population of the same species [80]. Further studies are required to determine the selective pressure exerted by the urban environment on the body size, for example by testing the correlation between body size and survival.

Our results also point to a positive relationship between body size and the age of birds, whatever the site or season. As the body size index is partly correlated with the wing size, this relationship may be the result of feather quality and molt stage of the birds. This hypothesis is supported by a correlation observed between wing lengths and age in a study on common blackbirds [46]: younger blackbirds tended to have shorter wings than older birds. In fact, for multiple passerine species, including Great Tits, feather quality and length tend to increase between the post-fledging partial molt and the post-breeding adults molts [85,86]. However, no age-distribution difference between sites or seasons were observed, suggesting that smaller breeders occur regardless of the age of birds. No difference in age distributions also suggests that, although the urban environment imposes high reproductive constraints [28], both experimented and non-experimented birds have the potential to reproduce and may succeed.

The direction of the change in telomere length in urban birds was opposite to that in our prediction concerning the filter hypothesis for the city. In fact, our results demonstrate longer telomeres for urban individuals in winter compared to the breeding period. On the other hand, as expected by the filter hypothesis, no difference between season was detected in forest birds for this parameter. Long telomeres are generally associated with a better health and survival [57,87] and longevity [88], and can be considered as a quality index for most animal species. Longer telomeres for urban birds during winter might suggest that environmental pressures favor individuals that can manage their somatic maintenance in harsh environments such as in the city compared to forests. However, the hypothesis of younger individuals in the city cannot be totally excluded either. Although our models did not show any difference in proportions of individuals in the 2 y.o. and >2 y.o. categories, it is possible that age differences exist within the >2 y.o. category. In this case, longer telomeres in winter in urban birds would be the consequence of higher mortality or emigration of older birds. These populations of Great Tits have been followed since 2015, but the recapture rate is still very low, restricting longitudinal studies based on known age. To test our hypothesis concerning the age effect on telomere attrition rate, this experiment should be carried out over several years on known-age birds.

In addition, the lack of difference in telomere length between sites during the breeding season is not consistent with a previous study on the same species that showed that telomeres were longer in urban than in forest birds [70]. Nevertheless, we showed in a previous study on the same population longer telomeres in urban breeders (Saulnier et al., submitted), but not every year. In fact, this study showed that the different length of telomeres between urban and forest breeders was not significant during years with harsh weather conditions. During the year of the present study, despite a high hatching success (89.4% in the city and 97% in the forest site), the number of fledglings was very low in the city (4.5 in the city and 7.1 in the forest), notably because of cold temperatures during rearing. Some studies highlighted the impact of reproductive costs on telomere length [4,89,90] through a trade-off between reproductive investment and somatic maintenance [4]. Harsh weather conditions during rearing might increase the reproductive cost related to the foraging of birds faced with the increased energy requirements of nestlings for thermoregulation [91], but also to a decrease in prey availability [92]. Then, the shorter telomeres observed in urban individuals during the breeding season therefore seem to reflect the higher cost of breeding in years with unfavorable weather conditions. The absence of a seasonal change in telomere length in re-caught birds and the absence of a correlation with the fledging number may not seem consistent with this hypothesis. Nevertheless, the sample size of re-caught birds was small, and this study was realized during a single year. It would be interesting to carry out this experiment across several years with contrasting weather conditions to properly understand the correlations between telomere length, reproductive costs and weather in the city.

Additionally, a potential influence of the capture technique on the seasonal variation of telomere length and body size pattern cannot be excluded. The trap feeder system required the birds to enter into a cage. It is conceivable that this system may select for bolder and lesser neophobic birds, or that there is a specific cognition aspect where the mist net and nest box capture techniques are more random and less selective. Some studies on birds showed that bolder birds had a lower maximum corticosterone concentration [93], higher antioxidant capacity [67,94] and also a lower concentration of reactive oxygen metabolites, leading to lower oxidative stress. The observation of higher telomere length for urban birds in winter might therefore be due to the selection of birds with a higher capacity for self-maintenance or less metabolic cost, impacting telomeres. In the same way, the trap feeders were placed on artificial food supply spots, which are an essential part of the winter diet of urban birds. It could be conceivable that bigger individuals, requiring higher energy requirements, favor these spots more than smaller individuals, thereby increasing their chance of being caught.

## 5. Conclusions

In conclusion, our results reveal morphological and genomic differences between winter individuals and breeders, but the question of the filtering role of the city remains open. If we consider that a smaller size confers an advantage in an urban environment, and that smaller individuals are of greater quality, then the urban environment does indeed have a filtering role on the quality of individuals. However, more studies are necessary to confirm the advantage of a smaller body size in the city, especially to test the correlation between body size and bird survival. However, the results obtained for telomere length during the reproduction period do not support the filter hypothesis. These results rather support a higher cost of reproduction in the city dependent on weather conditions. Long-term studies are therefore necessary to improve the understanding of selection mechanisms that take place in cities and the dynamics associated with inter-annual weather variations.

**Author Contributions:** Conceptualization, A.S., J.B. and S.M.; methodology, A.S., J.B., S.Z. and S.M.; validation, A.S., J.B. and S.M.; formal analysis, A.S.; investigation, A.S., J.B., P.U., G.L., S.Z. and S.M.; resources, J.B. and S.M.; data curation, A.S.; writing—original draft preparation, A.S., J.B. and S.M.; writing—review and editing, A.S., J.B., P.U., G.L., S.Z. and S.M.; visualization, A.S.; supervision, S.M.; project administration, J.B. and S.M.; funding acquisition, S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research received no external funding. A.S. is the recipient of a PhD grant from the French Ministry of Research.

**Institutional Review Board Statement:** The study was conducted according to the guidelines of the French legislation concerning the capture and biological sampling of wildlife, and was approved by the Bas-Rhin department prefect (since 2015), the French regional ethical committee n°35 (project APAFIS# 9160-2017030316182730 v2, 2017), and S.M., J.B., A.S. and P.U. received ringing licenses and authorizations for blood sampling from the CRBPO (National Museum of Natural History) as part of a research program led by SM (PP N°673) obtained in 2014.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** The dataset is part of a long-term study that is still ongoing and not yet deposited in a repository. However, it will be available on request, so please contact us.

**Acknowledgments:** We would like to thank Noé Rehspringer and Natacha Garcin and all students who assisted in the field and contributed to collecting and analyzing data. We thank our editor, Jukka Jokimäki, and our two reviewers for their useful comments on this manuscript. We also thank the Université de Strasbourg, the Eurometropole of Strasbourg, and the associations Société Régionale de Protection des Oiseaux (S.R.P.O) and Campus Vert.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## Appendix A

**Table A1.** Geographical Coordinates of the Nest Box Groups on each Site.

Site	Groupe	Coordinates (Lat. Long.)	Type	Nb Nestboxes
Urban	Campus 1	48.5843 N; 7.7637 W	Urban square	26
	Campus 2	48.5794 N; 7.7677W	Busy road	11
	Citadelle	48.5759 N; 7.7748 W	Urban park	40
	Heyritz	48.5727 N; 7.7442 W	Urban square	15
Forest	La Wantzenau	48.6480 N; 7.8337 W	Alluvial forest	65

## Appendix B

**Table A2.** Number of Birds in each Age Category at Different Seasons for Urban and Forest Site.

	Urban						Forest					
	Winter			Reproduction			Winter			Reproduction		
	F	M	Total	F	M	Total	F	M	Total	F	M	Total
2 years old	4	7	11	16	5	21	8	6	14	20	9	29
>2 years old	5	12	17	9	18	27	4	12	16	12	14	26
Total	9	19	28	25	23	48	12	18	30	32	23	55

## Appendix C

**Table A3.** Primers Sequence for qPCR RTL Analysis.

	Forward	Reverse
<b>Control gene</b> <i>P. major</i> Zinc finger protein (GenBank:EF568148)	ZENK1: 5'-TACATGTGCCATGGTTTTGC-3'	ZENK2: 5'-AAGTGTCTCCCAAAGAAG-3'
<b>Telomeres</b>	Tel1b: 5'-CGGTTTGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTT-3'	Tel2b: 5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3'

## Appendix D. Estimates of Generalized Linear Model Used for Morphological and Physiological Parameters

**Table A4.** Difference of quality parameters between seasons for each site.

	Age	Body Size	Body Condition	Relative Telomere Length
	Estimate (SE)	Estimate (SE)	Estimate (SE)	Estimate (SE)
Intercept	-9.17 (1.96)	-0.9 (0.2)	0.07 (0.17)	0.27 (0.25)
Site [Forest]	-0.65 (1.66)	1.05 (0.21)	-0.1 (0.13)	-0.58 (0.27)
Sex [M]	20.67 (2.67)	1.11 (0.17)	-0.18 (0.14)	0.11 (0.18)
Season [Reproduction]	-0.92 (1.45)	-0.29 (0.1)	0.23 (0.11)	-0.54 (0.25)
Age [2 years old]		-0.43 (0.17)	-0.15 (0.14)	0.16 (0.17)
Body condition				0.08 (0.11)
Site [Forest]:Season [Reproduction]		0.29 (0.14)		0.73 (0.34)

**Table A5.** Change of body condition and telomere length with reproduction for re-caught birds.

	Body Condition	Relative Telomere Length
	Estimate (SE)	Estimate (SE)
Intercept	-1.83 (2.62)	-3.83 (2.46)
Site [Forest]	-0.14 (0.63)	0.25 (0.61)
Sex [M]	0.27 (0.38)	-0.35 (0.34)
Fledging number	0.08 (0.09)	-0.06 (0.07)
Hatching date	0.02 (0.05)	0.08 (0.05)
Age [2 years old.]	0.56 (0.37)	-0.09 (0.35)
RTL Winter		-0.03 (0.23)

## References

1. Stearns, S.C. *The Evolution of Life Histories*; Oxford University Press: Oxford, UK, 1992.
2. Lailvaux, S.P.; Husak, J.F. The life history of whole-organism performance. *Q. Rev. Biol.* **2014**, *89*, 285–318. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. McNamara, J.M.; Houston, A.I. State-dependent life histories. *Nature* **1996**, *380*, 215–221. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Sudyka, J. Does reproduction shorten telomeres? Towards integrating individual quality with life-history strategies in telomere biology. *BioEssays* **2019**, *41*, 1900095. [[CrossRef](#)]

5. Wilson, A.J.; Nussey, D.H. What is individual quality? An evolutionary perspective. *Trends Ecol. Evol.* **2010**, *25*, 207–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Blums, P.; Nichols, J.D.; Hines, J.E.; Lindberg, M.S.; Mednis, A. Individual quality, survival variation and patterns of phenotypic selection on body condition and timing of nesting in birds. *Oecologia* **2005**, *143*, 365–376. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Vedder, O.; Bouwhuis, S. Heterogeneity in individual quality in birds: Overall patterns and insights from a study on common terns. *Oikos* **2018**, *127*, 719–727. [[CrossRef](#)]
8. Peralta-Sánchez, J.M.; Colmenero, J.; Redondo-Sánchez, S.; Ontanilla, J.; Soler, M. Females are more determinant than males in reproductive performance in the house sparrow *Passer domesticus*. *J. Avian Biol.* **2020**, *51*, e02240. [[CrossRef](#)]
9. Dukas, R. Animal expertise: Mechanisms, ecology and evolution. *Anim. Behav.* **2019**, *147*, 199–210. [[CrossRef](#)]
10. Forslund, P.; Pärt, T. Age and reproduction in birds—Hypotheses and tests. *Trends Ecol. Evol.* **1995**, *10*, 374–378. [[CrossRef](#)]
11. Pitera, A.M.; Branch, C.L.; Sonnenberg, B.R.; Benedict, L.M.; Kozlovsky, D.Y.; Pravosudov, V.V. Reproduction is affected by individual breeding experience but not pair longevity in a socially monogamous bird. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2021**, *75*, 1–11. [[CrossRef](#)]
12. Espie, R.H.M.; Oliphant, L.W.; James, P.C.; Warkentin, I.G.; Lieske, D.J. Age-dependent breeding performance in Merlins (*Falco columbarius*). *Ecology* **2000**, *81*, 3404–3415. [[CrossRef](#)]
13. Hamman, J.; Cooke, F. Age effects on clutch size and laying dates of individual female Lesser Snow Geese *Anser caerulescens*. *Ibis* **2008**, *129*, 527–532. [[CrossRef](#)]
14. Wiktander, U.; Olsson, O.; Nilsson, S.G. Age and Reproduction in Lesser Spotted Woodpeckers (*Dendrocopos minor*). *Auk* **2001**, *118*, 624–635. [[CrossRef](#)]
15. Hatch, M.I.; Westneat, D.F. Age-related patterns of reproductive success in house sparrows *Passer domesticus*. *J. Avian Biol.* **2007**, *38*, 603–611. [[CrossRef](#)]
16. Riechert, J.; Chastel, O.; Becker, P.H. Why do experienced birds reproduce better? Possible endocrine mechanisms in a long-lived seabird, the common tern. *Gen. Comp. Endocrinol.* **2012**, *178*, 391–399. [[CrossRef](#)]
17. Isaksson, C.; Andersson, S. Carotenoid diet and nestling provisioning in urban and rural Great Tits *Parus major*. *J. Avian Biol.* **2007**, *38*, 564–572. [[CrossRef](#)]
18. Biard, C.; Brischoux, F.; Meillère, A.; Michaud, B.; Nivière, M.; Ruault, S.; Vaugoyeau, M.; Angelier, F. Growing in cities: An urban penalty for wild birds? A study of phenotypic differences between urban and rural Great Tit chicks (*Parus major*). *Front. Ecol. Evol.* **2017**, *5*, 1–14. [[CrossRef](#)]
19. Vaugoyeau, M.; Adriaensen, F.; Artemyev, A.; Bañbura, J.; Barba, E.; Biard, C.; Blondel, J.; Bouslama, Z.; Bouvier, J.C.; Campronon, J.; et al. Interspecific variation in the relationship between clutch size, laying date and intensity of urbanization in four species of hole-nesting birds. *Ecol. Evol.* **2016**, *6*, 5907–5920. [[CrossRef](#)]
20. Gil, D.; Brumm, H. (Eds.) *Avian Urban Ecology*; Oxford University Press: Oxford, UK, 2013; ISBN 9780199661572.
21. Jones, E.L.; Leather, S.R. Invertebrates in urban areas: A review. *Eur. J. Entomol.* **2012**, *109*, 463–478. [[CrossRef](#)]
22. Fenoglio, M.S.; Rossetti, M.R.; Videla, M. Negative effects of urbanization on terrestrial arthropod communities: A meta-analysis. *Glob. Ecol. Biogeogr.* **2020**, *29*, 1412–1429. [[CrossRef](#)]
23. MacLeod, R.; Barnett, P.; Clark, J.; Cresswell, W. Mass-dependent predation risk as a mechanism for house sparrow declines? *Biol. Lett.* **2006**, *2*, 43–46. [[CrossRef](#)]
24. Marzluff, J.M. Worldwide urbanization and its effects on birds. In *Avian Ecology and Conservation in an Urbanizing World*; Springer: Boston, MA, USA, 2001; pp. 19–47.
25. Sorace, A.; Gustin, M. Distribution of generalist and specialist predators along urban gradients. *Landsc. Urban Plan.* **2009**, *90*, 111–118. [[CrossRef](#)]
26. Rodewald, A.D.; Kearns, L.J. Shifts in dominant nest predators along a rural-to-urban landscape gradient. *Condor* **2011**, *113*, 899–906. [[CrossRef](#)]
27. Van Heezik, Y.; Smyth, A.; Adams, A.; Gordon, J. Do domestic cats impose an unsustainable harvest on urban bird populations? *Biol. Conserv.* **2010**, *143*, 121–130. [[CrossRef](#)]
28. Chamberlain, D.E.; Cannon, A.R.; Toms, M.P.; Leech, D.I.; Hatchwell, B.J.; Gaston, K.J. Avian productivity in urban landscapes: A review and meta-analysis. *Ibis* **2009**, *151*, 1–18. [[CrossRef](#)]
29. Sepp, T.; McGraw, K.J.; Kaasik, A.; Giraudeau, M. A review of urban impacts on avian life-history evolution: Does city living lead to slower pace of life? *Glob. Chang. Biol.* **2018**, *24*, 1452–1469. [[CrossRef](#)]
30. Wawrzyniak, J.; Gładalski, M.; Kaliński, A.; Bañbura, M.; Markowski, M.; Skwarska, J.; Zieliński, P.; Bañbura, J. Differences in the breeding performance of Great Tits *Parus major* between a forest and an urban area: A long term study on first clutches. *Eur. Zool. J.* **2020**, *87*, 294–309. [[CrossRef](#)]
31. Halfwerk, W.; Holleman, L.J.M.; Lessells, C.M.; Slabbekoorn, H. Negative impact of traffic noise on avian reproductive success. *J. Appl. Ecol.* **2011**, *48*, 210–219. [[CrossRef](#)]
32. Bailly, J.; Scheifler, R.; Berthe, S.; Clément-Demange, V.A.; Leblond, M.; Pasteur, B.; Faivre, B. From eggs to fledging: Negative impact of urban habitat on reproduction in two tit species. *J. Ornithol.* **2016**, *157*, 377–392. [[CrossRef](#)]
33. Peach, W.J.; Mallord, J.W.; Ockendon, N.; Orsman, C.J.; Haines, W.G. Invertebrate prey availability limits reproductive success but not breeding population size in suburban House Sparrows *Passer domesticus*. *Ibis* **2015**, *157*, 601–613. [[CrossRef](#)]

34. Bailly, J.; Faivre, B.; Bernard, N.; Sage, M.; Crini, N.; Driget, V.; Garnier, S.; Rieffel, D.; Scheifler, R. Multi-element analysis of blood samples in a passerine species: Excesses and deficiencies of trace elements in an urbanization study. *Front. Ecol. Evol.* **2017**, *5*, 6. [[CrossRef](#)]
35. Isaksson, C.; Johansson, A.; Andersson, S. Egg yolk carotenoids in relation to habitat and reproductive investment in the Great Tit *Parus major*. *Physiol. Biochem. Zool.* **2008**, *81*, 112–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Jarrett, C.; Powell, L.L.; McDevitt, H.; Helm, B.; Welch, A.J. Bitter fruits of hard labour: Diet metabarcoding and telemetry reveal that urban songbirds travel further for lower-quality food. *Oecologia* **2020**, *193*, 377–388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Hinsley, S.A.; Hill, R.A.; Bellamy, P.E.; Harrison, N.M.; Speakman, J.R.; Wilson, A.K.; Ferns, P.N. Effects of structural and functional habitat gaps on breeding woodland birds: Working harder for less. *Landsc. Ecol.* **2008**, *23*, 615–626. [[CrossRef](#)]
38. Estes, W.A.; Mannan, R.W. Feeding behavior of cooper’s hawks at urban and rural nests in southeastern arizona. *Condor* **2003**, *105*, 107–116. [[CrossRef](#)]
39. Blair, R.B. Land use and avian species diversity along an urban gradient. *Ecol. Appl.* **1996**, *6*, 506–519. [[CrossRef](#)]
40. Clergeau, P.; Croci, S.; Jokimäki, J.; Kaisanlahti-Jokimäki, M.L.; Dinetti, M. Avifauna homogenisation by urbanisation: Analysis at different European latitudes. *Biol. Conserv.* **2006**, *127*, 336–344. [[CrossRef](#)]
41. McKinney, M.L. Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biol. Conserv.* **2006**, *127*, 247–260. [[CrossRef](#)]
42. Croci, S.; Butet, A.; Clergeau, P. Does urbanization filter birds on the basis of their biological traits? *Condor* **2008**, *110*, 223–240. [[CrossRef](#)]
43. Kurucz, K.; Purger, J.J.; Batáry, P. Urbanization shapes bird communities and nest survival, but not their food quantity. *Glob. Ecol. Conserv.* **2021**, *26*, e01475. [[CrossRef](#)]
44. Liker, A.; Papp, Z.; Bókony, V.; Lendvai, Á.Z. Lean birds in the city: Body size and condition of house sparrows along the urbanization gradient. *J. Anim. Ecol.* **2008**, *77*, 789–795. [[CrossRef](#)]
45. Meillère, A.; Brischoux, F.; Parenteau, C.; Angelier, F. Influence of urbanization on body size, condition, and physiology in an urban exploiter: A multi-component approach. *PLoS ONE* **2015**, *10*, 1–19. [[CrossRef](#)]
46. Evans, K.L.; Gaston, K.J.; Sharp, S.P.; McGowan, A.; Hatchwell, B.J. The effect of urbanisation on avian morphology and latitudinal gradients in body size. *Oikos* **2009**, *118*, 251–259. [[CrossRef](#)]
47. Shochat, E. Credit or debit? Resource input changes population dynamics of city-slicker birds. *Oikos* **2004**, *106*, 622–626. [[CrossRef](#)]
48. Møller, A.P. Successful city dwellers: A comparative study of the ecological characteristics of urban birds in the Western Palearctic. *Oecologia* **2009**, *159*, 849–858. [[CrossRef](#)]
49. Caizergues, A.E.; Charmantier, A.; Lambrechts, M.M.; Perret, S.; Demeyrier, V.; Lucas, A.; Grégoire, A. An avian urban morphotype: How the city environment shapes Great Tit morphology at different life stages. *Urban Ecosyst.* **2021**, *24*, 929–941. [[CrossRef](#)]
50. Meillère, A.; Brischoux, F.; Henry, P.Y.; Michaud, B.; Garcin, R.; Angelier, F. Growing in a city: Consequences on body size and plumage quality in an urban dweller, the house sparrow (*Passer domesticus*). *Landsc. Urban Plan.* **2017**, *160*, 127–138. [[CrossRef](#)]
51. Milenkaya, O.; Catlin, D.H.; Legge, S.; Walters, J.R. Body condition indices predict reproductive success but not survival in a sedentary, tropical bird. *PLoS ONE* **2015**, *10*, e0136582. [[CrossRef](#)]
52. Lamb, J.S.; O’Reilly, K.M.; Jodice, P.G.R. Physical condition and stress levels during early development reflect feeding rates and predict pre-And post-fledging survival in a nearshore seabird. *Conserv. Physiol.* **2016**, *4*, cow060. [[CrossRef](#)]
53. Hőrak, P.; Tegelmann, L.; Ots, I.; Møller, A.P. Immune function and survival of Great Tit nestlings in relation to growth conditions. *Oecologia* **1999**, *121*, 316–322. [[CrossRef](#)]
54. Blackburn, E.H. Structure and function of telomeres. *Nature* **1991**, *350*, 569–573. [[CrossRef](#)]
55. Blackburn, E.H. Telomeres and telomerase: Their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett.* **2005**, *579*, 859–862. [[CrossRef](#)]
56. Tricola, G.M.; Simons, M.J.P.; Atema, E.; Boughton, R.K.; Brown, J.L.; Dearborn, D.C.; Divoky, G.; Eimes, J.A.; Huntington, C.E.; Kitaysky, A.S.; et al. The rate of telomere loss is related to maximum lifespan in birds. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2018**, *373*, 20160445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Haussmann, M.F.; Mauck, R.A. Telomeres and longevity: Testing an evolutionary hypothesis. *Mol. Biol. Evol.* **2008**, *25*, 220–228. [[CrossRef](#)]
58. Monaghan, P.; Metcalfe, N.B.; Torres, R. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: Mechanisms, measurements and interpretation. *Ecol. Lett.* **2009**, *12*, 75–92. [[CrossRef](#)]
59. Stauffer, J.; Panda, B.; Eeva, T.; Rainio, M.J.; Ilmonen, P. Telomere damage and redox status alterations in free-living passerines exposed to metals. *Sci. Total Environ.* **2017**, *575*, 841–848. [[CrossRef](#)]
60. Blévin, P.; Angelier, F.; Tartu, S.; Bustamante, P.; Herzke, D.; Moe, B.; Bech, C.; Gabrielsen, G.W.; Bustnes, J.O.; Chastel, O. Perfluorinated substances and telomeres in an Arctic seabird: Cross-sectional and longitudinal approaches. *Environ. Pollut.* **2017**, *230*, 360–367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
61. Meillère, A.; Brischoux, F.; Ribout, C.; Angelier, F. Traffic noise exposure affects telomere length in nestling house sparrows. *Biol. Lett.* **2015**, *11*, 20150559. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Grunst, A.S.; Grunst, M.L.; Bervoets, L.; Pinxten, R.; Eens, M. Proximity to roads, but not exposure to metal pollution, is associated with accelerated developmental telomere shortening in nestling Great Tits. *Environ. Pollut.* **2020**, *256*, 113373. [[CrossRef](#)]

63. Young, R.C.; Welcker, J.; Barger, C.P.; Hatch, S.A.; Merklings, T.; Kitaiskaia, E.V.; Haussmann, M.F.; Kitaysky, A.S. Effects of developmental conditions on growth, stress and telomeres in black-legged kittiwake chicks. *Mol. Ecol.* **2017**, *26*, 3572–3584. [[CrossRef](#)]
64. Boonekamp, J.J.; Bauch, C.; Mulder, E.; Verhulst, S. Does oxidative stress shorten telomeres? *Biol. Lett.* **2017**, *13*, 20170164. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Chatelain, M.; Drobniak, S.M.; Szulkin, M. The association between stressors and telomeres in non-human vertebrates: A meta-analysis. *Ecol. Lett.* **2020**, *23*, 381–398. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Epel, E.S.; Blackburn, E.H.; Lin, J.; Dhabhar, F.S.; Adler, N.E.; Morrow, J.D.; Cawthon, R.M. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 17312–17315. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Kim, S.-Y.; Velando, A. Antioxidants safeguard telomeres in bold chicks. *Biol. Lett.* **2015**, *11*, 20150211. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Haussmann, M.F.; Winkler, D.W.; Vleck, C.M. Longer telomeres associated with higher survival in birds. *Biol. Lett.* **2005**, *1*, 212–214. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
69. Ibáñez-Álamo, J.D.; Pineda-Pampliega, J.; Thomson, R.L.; Aguirre, J.I.; Díez-Fernández, A.; Faivre, B.; Figuerola, J.; Verhulst, S. Urban blackbirds have shorter telomeres. *Biol. Lett.* **2018**, *14*, 20180083. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Salmón, P.; Nilsson, J.F.; Watson, H.; Bensch, S.; Isaksson, C. Selective disappearance of Great Tits with short telomeres in urban areas. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2017**, *284*, 20171349. [[CrossRef](#)]
71. Criscuolo, F.; Bize, P.; Nasir, L.; Metcalfe, N.B.; Foote, C.G.; Griffiths, K.; Gault, E.A.; Monaghan, P. Real-time quantitative PCR assay for measurement of avian telomeres. *J. Avian Biol.* **2009**, *40*, 342–347. [[CrossRef](#)]
72. R Development Core Team. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*; R Foundation for Statistical Computing, Ed.; R Development Core Team: Vienna, Austria, 2021; ISBN 3-900051-07-0.
73. Verhulst, S. Improving comparability between qPCR-based telomere studies. *Mol. Ecol. Resour.* **2020**, *20*, 11–13. [[CrossRef](#)]
74. Labocha, M.K.; Hayes, J.P. Morphometric indices of body condition in birds: A review. *J. Ornithol.* **2012**, *153*, 1–22. [[CrossRef](#)]
75. Hayes, J.P.; Shonkwiler, J.S. Morphological indicators of body condition: Useful or wishful thinking? *Body Compos. Anal. Anim.* **2001**, *10*, 8–38. [[CrossRef](#)]
76. Bates, D.; Mächler, M.; Bolker, B.M.; Walker, S.C. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *J. Stat. Softw.* **2015**, *67*, 1–48. [[CrossRef](#)]
77. Chastel, O.; Weimerskirch, H.; Jouventin, P. Influence of body condition on reproductive decision and reproductive success in the Blue Petrel. *Auk* **1995**, *112*, 964–972. [[CrossRef](#)]
78. Isaksson, C.; Andersson, M.N.; Nord, A.; Von Post, M.; Wang, H.L. Species-dependent effects of the urban environment on fatty acid composition and oxidative stress in birds. *Front. Ecol. Evol.* **2017**, *5*, 1–13. [[CrossRef](#)]
79. Corsini, M.; Schöll, E.M.; Di Lecce, I.; Chatelain, M.; Dubiec, A.; Szulkin, M. Growing in the city: Urban evolutionary ecology of avian growth rates. *Evol. Appl.* **2020**, *14*, 69–84. [[CrossRef](#)]
80. Caizergues, A.E.; Grégoire, A.; Charmantier, A. Urban versus forest ecotypes are not explained by divergent reproductive selection. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2018**, *285*, 20180261. [[CrossRef](#)]
81. McDonnell, M.J.; Hahs, A.K. Adaptation and Adaptedness of Organisms to Urban Environments. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **2015**, *46*, 261–280. [[CrossRef](#)]
82. Hedenstrom, A.; Möller, A.P. Morphological adaptations to song flight in passerine birds: A comparative study. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **1992**, *247*, 183–187. [[CrossRef](#)]
83. Möller, A.P. Flight distance of urban birds, predation, and selection for urban life. *Behav. Ecol. Sociobiol.* **2008**, *63*, 63–75. [[CrossRef](#)]
84. Gosler, A.G.; Greenwood, J.J.D.; Perrins, C. Predation risk and the cost of being fat. *Nature* **1995**, *377*, 621–623. [[CrossRef](#)]
85. Kiat, Y.; Sapir, N. Life-history trade-offs result in evolutionary optimization of feather quality. *Biol. J. Linn. Soc.* **2018**, *125*, 613–624. [[CrossRef](#)]
86. Pap, P.L.; Barta, Z.; Tökölyi, J.; Vágási, I.C. Increase of feather quality during moult: A possible implication of feather deformities in the evolution of partial moult in the Great Tit *Parus major*. *J. Avian Biol.* **2007**, *38*, 471–478. [[CrossRef](#)]
87. Giraudeau, M.; Angelier, F.; Sepp, T. Do telomeres influence pace-of-life-strategies in response to environmental conditions over a lifetime and between generations? *BioEssays* **2019**, *41*, 1800162. [[CrossRef](#)]
88. Heidinger, B.J.; Blount, J.D.; Boner, W.; Griffiths, K.; Metcalfe, N.B.; Monaghan, P. Telomere length in early life predicts lifespan. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2012**, *109*, 1743–1748. [[CrossRef](#)]
89. Bauch, C.; Becker, P.H.; Verhulst, S. Telomere length reflects phenotypic quality and costs of reproduction in a long-lived seabird. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **2013**, *280*, 20122540. [[CrossRef](#)]
90. Angelier, F.; Weimerskirch, H.; Barbraud, C.; Chastel, O. Is telomere length a molecular marker of individual quality? Insights from a long-lived bird. *Funct. Ecol.* **2019**, *33*, 1076–1087. [[CrossRef](#)]
91. Krijgsveld, K.L.; Visser, G.H.; Daan, S. Foraging behavior and physiological changes in precocial quail chicks in response to low temperatures. *Physiol. Behav.* **2003**, *79*, 311–319. [[CrossRef](#)]
92. Avery, M.I.; Krebs, J.R. Temperature and foraging success of Great Tits *Parus major* hunting for spiders. *Ibis* **1984**, *126*, 33–38. [[CrossRef](#)]

- 
93. Atwell, J.W.; Cardoso, G.C.; Whittaker, D.J.; Campbell-Nelson, S.; Robertson, K.W.; Ketterson, E.D. Boldness behavior and stress physiology in a novel urban environment suggest rapid correlated evolutionary adaptation. *Behav. Ecol.* **2012**, *23*, 960–969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
  94. Herborn, K.A.; Coffey, J.; Larcombe, S.D.; Alexander, L.; Arnold, K.E. Oxidative profile varies with personality in European greenfinches. *J. Exp. Biol.* **2011**, *214*, 1732–1739. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



## BOX 1

---

### Urbanisation et qualité spermatique chez la mésange charbonnière

*En préparation*

Saulnier, A., Bleu, J., Humann S., Mata, A., Lemonnier, G., Uhlrich, Zahn, S. and Massemin, S.

#### Contexte

L'augmentation de la population mondiale a entraîné une transformation profonde et rapide des habitats naturels et l'apparition de nouvelles pressions de sélection pour la faune sauvage. Ces nouvelles contraintes ont un rôle de filtre pour la biodiversité : seules les espèces capables de s'adapter parviennent à se maintenir et à prospérer en ville. Mais chez ces espèces et en particulier pour les populations urbaines d'oiseaux, bien que la survie semble plus élevée en ville, le succès reproducteur est plus faible en ville que pour les populations forestières (Chamberlain et al., 2009). Plus particulièrement, chez la mésange charbonnière, les individus urbains ont de plus petites pontes, produisent moins de jeunes et de moins bonne qualité (i.e condition corporelle plus faible). Notre étude a également mis en évidence un succès d'éclosion plus faible bien que ce paramètre ne soit pas toujours observé (Sepp et al., 2017). Le milieu urbain est un milieu contraignant : la pollution chimique, la pollution lumineuse et sonore, le dérangement humain et une faible disponibilité alimentaire (invertébrés) sont autant de facteurs de stress pouvant impacter la physiologie des individus et conduire à une diminution de l'investissement reproducteur. Chez les femelles, cela se traduit par une diminution du nombre d'œufs pondus, mais également par une diminution de leur qualité. Certains éléments essentiels au développement de l'embryon comme des caroténoïdes ou certains acides gras sont en concentrations moins importantes dans les œufs en ville (Isaksson et al., 2008; Toledo et al., 2016) et peuvent impacter ce succès d'éclosion et la qualité des poussins (Giordano, 2014). Les effets maternels et le caractère adaptatif de la modulation de la taille de ponte et de la qualité des œufs face aux contraintes, ont fait l'objet de nombreuses études. Pourtant, un autre facteur, beaucoup moins étudié, peut aussi expliquer ce déclin du succès reproducteur : la qualité spermatique des mâles.

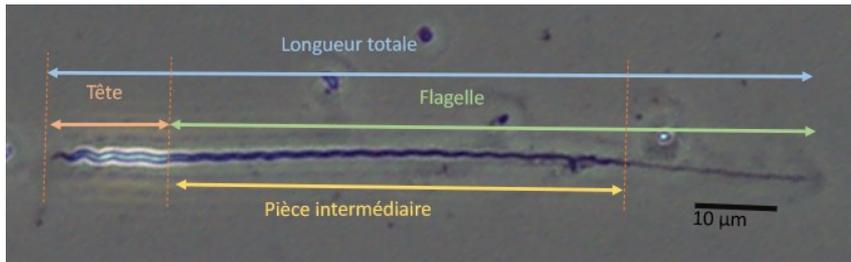
La qualité spermatique d'un individu détermine sa fertilité et impactera le succès d'éclosion des œufs. Mais cette qualité spermatique peut également impacter la qualité de la descendance, notamment par des mécanismes de sénescence de la lignée germinale (Preston et al., 2015; Schagdarsurengin and Steger, 2016; Sharma et al., 2015). La qualité spermatique d'un individu est définie à travers plusieurs paramètres : la densité spermatique (concentration en spermatozoïdes dans l'éjaculat), la morphologie des spermatozoïdes, la longévité et la motilité spermatique. Plusieurs études ont montré que cette qualité spermatique pouvait être impactée

par la qualité de la nourriture (Mangiagalli et al., 2010), une augmentation du stress oxydatif (Bisht et al., 2017; Helfenstein et al., 2010a; Mora et al., 2017) ou l'exposition à des polluants chimique même à faible dose (Dauwe et al., 2004b; Humann-Guillemintot et al., 2019; Yang et al., 2020). Or, les individus urbains sont susceptibles d'être exposés à un ensemble de contraintes en ville. Il est donc possible que l'ensemble de ces paramètres puissent impacter négativement la qualité spermatique des mâles urbains qui elle-même impacterait le succès reproducteur. À notre connaissance aucune étude n'a encore évalué les effets de l'urbanisation sur ce paramètre en ville. Le but de cette étude était donc d'évaluer la qualité spermatique (morphologie, densité, longévité et motilité) des mâles de populations urbaines et forestières de mésanges charbonnières pour déterminer les conséquences de l'urbanisation sur ces paramètres. Ensuite, le lien entre ces paramètres et le succès reproducteur des individus a été testé dans les deux milieux étudiés. D'après les résultats obtenus précédemment nous nous attendions à observer un succès d'éclosion plus faible et une qualité spermatique moins bonne pour les individus urbains, qui se traduiraient par une plus faible densité spermatique, une diminution de la motilité et de la longévité des spermatozoïdes et des différences morphologiques.

### Méthodes

Cette étude a été réalisée sur des populations urbaines et forestières de mésanges charbonnières nichant au sein de l'Eurométropole de Strasbourg durant la reproduction entre avril et, mai (1<sup>ère</sup> ponte) 2021. Sur l'ensemble des nichoirs suivis, le succès d'éclosion (nombre d'œufs éclos/nombre d'œufs total pour les nichoirs où au moins 1 œuf a éclos) a été calculé pour 62 nichoirs ( $N_{ville}=26$ ,  $N_{forêt}=36$ ). Les différences de succès d'éclosion entre les sites ont été testées en utilisant un modèle GLM à loi quasibinomiale avec une pondération du succès par la taille de ponte. Ce modèle contenait le site en variable explicative et la date de ponte en covariable.

Les mâles ont été capturés au nichoir quand les poussins avaient entre 8 et 15 jours. Seuls 9 individus de chaque site ont pu être capturés. Chaque mâle capturé a été bague, mesuré (aile, tarse, tête-bec) et pesé. L'âge des individus a également été estimé grâce aux patterns de mue (2A ou >2A). Le sperme des individus a été collecté grâce à un micro capillaire gradué après stimulation de l'éjaculation par massage cloacal (Humann-Guillemintot et al., 2019). Le sperme collecté est déposé dans un microtube. Pour les mesures de densité spermatique, 0,2µL de cet éjaculat est dilué dans 9,8µL d'un tampon DMSO-Serum Bovine Fœtal (1:10). Puis, une fois au laboratoire, ces échantillons sont dilués au 20<sup>ème</sup> dans du PBS avant d'être déposés sur une lame de Neubauer pour un comptage cellulaire au microscope. Pour la morphologie des spermatozoïdes, une goutte d'éjaculat (pointe de cône) est diluée dans du formol 10% avant d'être déposée et étalée sur une lame en verre puis séchée à l'air libre. Une fois de retour au laboratoire, les lames sont rincées à l'eau claire puis des captures d'image sont réalisées sous microscope (GX400) en contraste de phase pour être ensuite analysées sous ImageJ. Plusieurs paramètres ont été mesurés : la tête, la longueur du flagelle, la longueur de la pièce intermédiaire (riche en mitochondries) et la longueur totale (Fig. 1).

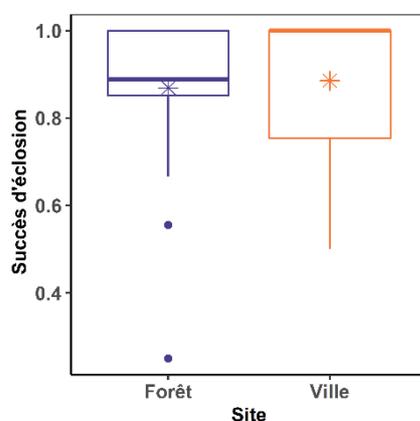


**Figure 1** - Spermatozoïde de mésange charbonnière

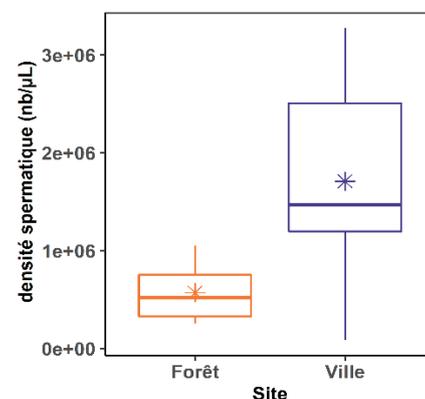
Des difficultés techniques ne nous ont malheureusement pas permis de mesurer la motilité et la longévité des spermatozoïdes cette année-là. Les différences morphologiques ont été testées grâce à des modèles linéaires suivis d'ANOVA de Type II avec le site en variable explicative et la date de ponte et l'âge des individus comme co-variable.

### Résultats préliminaires & discussion

Le succès d'éclosion était similaire entre les deux sites (GLM quasibinomiale,  $F = 0.11$ ,  $p = 0.75$ , Fig.2) durant cette saison de reproduction. Bien que le succès d'éclosion soit en moyenne plus faible chez cette espèce sur plusieurs années. (Wawrzyniak et al., 2020), il n'est pas rare d'observer une absence de différence entre les populations naturelles et urbaines (Sepp et al., 2017). Un résultat similaire avait également été observé à Strasbourg en 2018 (Chapitre 1).



**Figure 2** - Succès d'éclosion pour chaque site en 2021

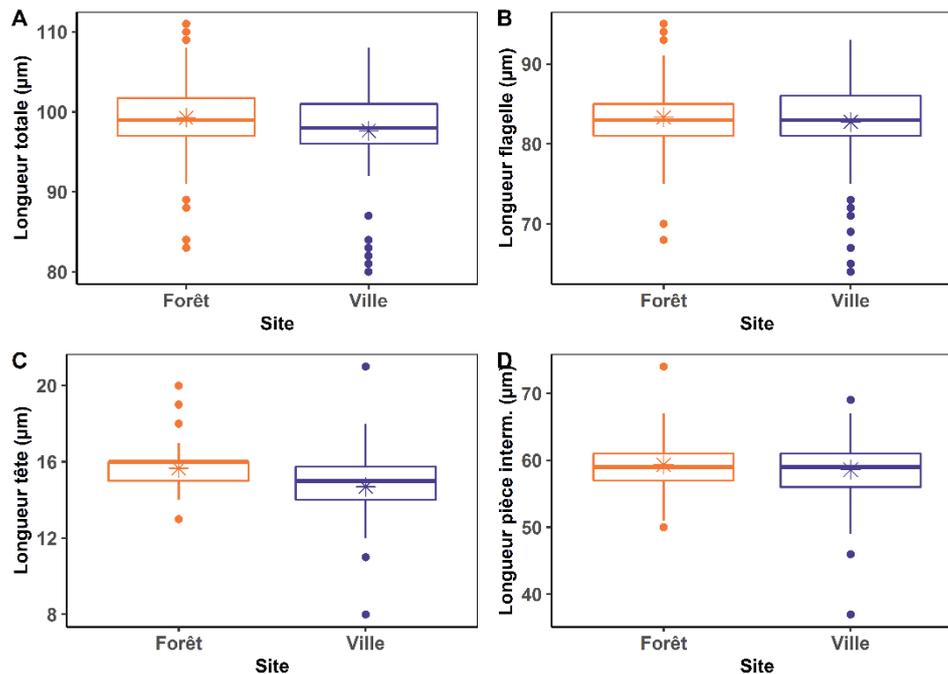


**Figure 3** - Densité spermatique pour chaque site en 2021

Un succès d'éclosion similaire entre les deux sites peut être également lié à l'absence de différence observée entre les sites pour la densité spermatique. Effectivement, nos résultats suggèrent que le nombre de spermatozoïdes par éjaculat est équivalent en ville et en forêt ( $F = 0.96$ ,  $p = 0.35$ , Fig. 3). Le stress oxydatif et l'exposition à certains polluants peuvent altérer la production de spermatozoïdes au niveau des testicules soit en altérant les fonctions de l'axe hypothalamo-hypophyséogonadique (Rana, 2014) soit en générant des inflammations et des

lésions tissulaires (Shao et al., 2018). À l'échelle des spermatozoïdes, une augmentation du stress oxydatif et les dégâts cellulaires associés (peroxydation des lipides et dommages ADN) vont générer l'apoptose des cellules ce qui contribue à diminuer la fertilité des mâles. (Bisht et al., 2017). Il est possible qu'aucune différence n'ait été observée pour ce paramètre du fait des meilleures capacités antioxydantes des reproducteurs urbain (Chapitre 2.1). Selon l'hypothèse du filtre urbain (Chapitre 2.2), ce résultat peut être lié au fait que seuls les individus de meilleure qualité parviennent à se reproduire en ville.

Nos résultats montrent également très peu de différence entre les sites concernant les paramètres morphologiques des spermatozoïdes. Parmi les 4 paramètres mesurés, seule la longueur de la tête était significativement différente entre les sites ( $F = 7,77$ ,  $p = 0,01$ , Fig. 3C), les spermatozoïdes des individus urbains avaient une tête plus petite (Tukey,  $p = 0,03$ ). Les autres paramètres morphologiques (le flagelle, la pièce intermédiaire et la longueur totale) n'étaient pas différents entre les sites (toutes les  $p > 0,38$ ). La morphologie des spermatozoïdes est un proxy de la qualité spermatique pour une espèce donnée, car elle est corrélée à la motilité et à la longévité qui sont des indices de performance. (Losdat and Helfenstein, 2018; Simmons and Fitzpatrick, 2012). Chez le moineau friquet par exemple, une plus petite tête est associée à une vitesse de nage plus élevée (Yang et al., 2020) mais a contrario chez la mésange charbonnière, la longueur de la pièce intermédiaire (riche en mitochondrie fournissant de l'énergie au flagelle) et la longueur totale semblent être de meilleurs proxys de ces paramètres (Losdat and Helfenstein, 2018). Il est donc difficile de conclure quant à l'impact de ces différences morphologiques sans tester la corrélation avec la performance. Plus que la longueur de chacune de ces parties, les ratios entre ces différentes parties sont également susceptibles d'impacter leur hydrodynamisme. Par exemple des spermatozoïdes avec un ratio tête/flagelle plus petit seront plus véloces (Helfenstein et al., 2010b). Nous avons donc testé les différences entre les sites pour ce ratio tête/flagelle, mais aucune différence n'a été observée ( $F = 2,37$ ,  $p = 0,15$ ).



**Figure C-** Longueur A) totale, B) du flagelle, C) de la tête et D) de la pièce intermédiaire des spermatozoïdes pour chaque site.

D'autres paramètres morphologiques vont également être explorés dans le futur comme le pourcentage de spermatozoïdes anormaux, qui peut être un indicateur de l'investissement dans la lignée germinale des individus, mais également la longueur des télomères dans les spermatozoïdes, un indicateur de sénescence des cellules (Thilagavathi et al., 2013) qui peut impacter la fertilité du mâle, mais également la qualité de sa descendance (Sharma et al., 2015).

Pour finir, aucun paramètre de qualité spermatique n'était significativement corrélé au succès d'éclosion de la nichée ( $p > 0,85$ ). Mais il ne faut pas oublier que la mésange charbonnière est une espèce monogame sociale. Des copulations extra paires sont souvent observées chez cette espèce et à plus forte fréquence en ville (Pipoly et al., 2019). L'absence de corrélation peut être liée au fait que le mâle dans un nichoir n'est pas le mâle qui a fécondé les œufs éclos. De plus, ce paramètre engendre une compétition spermatique entre les mâles, pouvant imposer un investissement plus grand dans la qualité spermatique pour maximiser ses chances de fécondation de la femelle (Simmons and Fitzpatrick, 2012). Les femelles stockant les spermatozoïdes dans des tubules de stockage spermatiques, la compétition spermatique impose un compromis sur la morphologie des spermatozoïdes : des spermatozoïdes rapides assurent de coloniser ces tubules avant les rivaux et augmentent les chances de fertilisation si celle-ci a lieu immédiatement après accouplement, mais ils sont également rapidement éliminés. A contrario des spermatozoïdes plus lents vont avoir une meilleure longévité dans les tubules. (Helfenstein et al., 2010b). Ce compromis peut entraîner une plus grande variabilité intra-individuelle de la

## PARTIE 1

morphologie des spermatozoïdes pour maximiser les chances de fécondation. Comme nous avons peu d'individus, celle-ci peut masquer partiellement les différences interindividuelles.

Pour conclure, notre étude a montré peu de différences de la qualité spermatiques entre les mâles urbains et forestiers. Néanmoins, le succès d'éclosion étant comparable entre les sites, il est possible que des différences plus marquées soit observables les années où celui-ci est différent. Les paramètres morphologiques seuls ne permettent pas de déterminer complètement la qualité du sperme, les analyses de motilité et de longévité réalisées prochainement pourront nous renseigner sur le lien existant entre morphologie et performance.

## Discussion partie 1

---

L'urbanisation rapide des habitats et les changements environnementaux associés posent de nouveaux défis pour la faune urbaine et Strasbourg, la 8<sup>ème</sup> ville la plus peuplée de France n'échappe pas à la règle. Le premier objectif de ce travail était, grâce à des approches corrélatives en milieu urbain, de caractériser les contraintes environnementales liées à l'urbanisation (Chapitre 1) et d'en observer les conséquences reproductives (Chapitre 1) et physiologiques (Chapitre 2) chez les populations de mésanges charbonnières pour mieux comprendre les mécanismes sous-jacents influençant la densité des populations en ville. Le second objectif était d'explorer l'importance des variations interannuelles de ces paramètres et notamment les variations liées aux conditions météorologiques pendant la reproduction (Chapitre 1). Ainsi, j'ai mis en évidence un succès reproducteur plus faible chez les mésanges urbaines. Ce succès reproducteur plus faible semblait associé à la réduction du couvert végétal et de la disponibilité alimentaire, mais il semblait surtout corrélé aux conditions météorologiques pendant la reproduction contrairement au succès des individus forestiers (Chapitre 1). J'ai également mis en évidence des différences morphologiques entre les oiseaux urbains et forestiers avec des adultes plus petits que leurs congénères ruraux et des poussins avec une plus faible condition corporelle à l'envol (Chapitre 2.1). En revanche pour la physiologie des individus, les poussins des deux sites présentent peu de différences. Cependant, chez les adultes urbains, certains paramètres tels que des télomères plus longs pourraient refléter une meilleure qualité individuelle ou un investissement somatique plus grand. Certains de ces résultats semblent pencher en faveur de l'hypothèse d'une divergence de rythme de vie entre les populations urbaines et forestières tandis que d'autres semblent au contraire la réfuter. La variabilité interannuelle pour l'ensemble de ces paramètres qu'elle soit dépendante ou non de la météorologie, amène également une piste de réflexion quant à la grande variabilité des réponses phénotypiques observées dans la littérature.

### *Effet de l'urbanisation et des ressources alimentaires sur le phénotype des oiseaux*

Ces approches corrélatives ont mis en évidence un impact de l'urbanisation sur les traits reproductifs des mésanges étudiés. Effectivement, quelle que soit l'année, la taille de ponte et le nombre de poussins à l'envol étaient systématiquement plus faibles pour la population urbaine que pour la population forestière. Ces résultats, montrant un investissement reproducteur plus faible, ont été largement observés chez d'autres populations urbaines de la même espèce (Caizergues et al., 2018; Charmantier et al., 2017; Wawrzyniak et al., 2015) mais également chez d'autres espèces (Chamberlain et al., 2009). L'hypothèse la plus largement retenue pour expliquer ce résultat est la plus faible disponibilité en proies en ville (Chamberlain et al., 2009; Evans and Gawlik, 2020). Dans notre étude, l'analyse des paramètres environnementaux semble effectivement aller dans le sens de cette hypothèse. La diminution importante du couvert végétal observée à Strasbourg semble avoir des répercussions sur la disponibilité en invertébrés pendant la reproduction et sur les populations de mésanges étudiées. De plus, cette réduction du couvert végétal peut également contribuer à diminuer les surfaces d'habitat favorables et à

augmenter la fragmentation de cet habitat. Cela peut contribuer à entraîner une augmentation de la densité des nichées dans les zones favorables et conduire à une compétition intraspécifique (Han et al., 2019), mais également rendre la recherche alimentaire plus laborieuse (Jarrett et al., 2020). Il est possible aussi qu'une part de l'énergie allouée à la reproduction soit détournée pour la protection du territoire (MacLean and Seastedt, 2015)

La quantité de ressources disponibles est l'un des facteurs les plus importants dans la détermination du timing et de l'investissement reproducteur chez les oiseaux (Martin, 1987; Nilsson, 1994). En effet, si ces ressources sont insuffisantes, l'individu doit faire un compromis entre son investissement reproducteur et la recherche en ressources. Mais quand nous avons mesuré la condition corporelle des adultes, aussi bien avant (Chapitre 2.2) que pendant la reproduction (Chapitre 2.1), aucune différence n'a été mise en évidence entre le milieu urbain et la forêt. Les réserves énergétiques d'un individu peuvent conditionner son entrée en reproduction (Chastel et al., 1995; Martin, 1987). L'absence de différence observée entre les individus pendant la reproduction peut simplement refléter le fait que les individus ayant une condition corporelle trop faible n'ont pas initié de reproduction. Dans ce cas, il est possible que d'autres facteurs puissent jouer sur les différences observées entre les sites, par exemple la qualité des ressources. Les mesures de polluants réalisées dans l'environnement, les proies et les individus n'ont pas mis en évidence de différences significatives entre les sites. Mais il est possible que la production des œufs soit contrainte par d'autres paramètres que nous n'avons pas mesurés tels qu'un déficit en éléments essentiels comme le calcium (Shriver et al., 2020), les caroténoïdes (Isaksson et al., 2008) ou en acides gras (Andersson et al., 2015) qui peuvent jouer un rôle important dans l'investissement reproducteur. Ces éléments ont également un rôle clé dans la régulation de la balance oxydative et les processus inflammatoires et d'intégrité cellulaire (Isaksson, 2015). Il est donc également possible que les femelles puissent privilégier l'utilisation de ces ressources pour leur propre maintenance en réduisant la part allouée à la production d'œufs (Marshall and Uller, 2007), ce qui pourrait expliquer les meilleures défenses oxydatives observées en ville chez les adultes pendant la reproduction (Chapitre 2.1). La qualité des ressources et la modulation de leurs concentrations dans les œufs peuvent également être responsables du succès d'éclosion plus faible observé en ville dans notre étude, la qualité des œufs impactant directement le développement des embryons. Mais une absence d'éclosion peut également être synonyme d'un échec de fécondation par le mâle. Certaines études se sont attachées à mesurer la qualité des œufs en milieu urbain (Isaksson et al., 2008; Toledo et al., 2016) et le lien corrélatif positif entre cette qualité et le succès reproducteur des femelles (Hargitai et al., 2016; Ruuskanen et al., 2019). Mais, à ma connaissance, aucune étude n'a testé l'impact que le milieu urbain pouvait avoir sur la qualité spermatique des mâles chez l'oiseau. Or, la qualité spermatique des mâles peut également dépendre de la qualité des ressources dont ils disposent (Blount et al., 2001; Mangiagalli et al., 2010) et du maintien de la balance oxydative au sein des lignées germinales (Bisht et al., 2017). À titre d'exemple, la supplémentation en caroténoïde augmente la qualité du sperme et la fertilité chez le poulet (*Gallus gallus domesticus*) (Mangiagalli et al., 2010). En 2021, nous avons mené une expérience visant à comparer la qualité spermatique des reproducteurs urbains et forestiers pour tester l'impact de l'urbanisation sur ce paramètre et le lien corrélatif avec le succès reproducteur. Seule la morphologie et la densité

spermatique ont été évaluées (Box 1), des contraintes techniques ne nous ayant pas permis de mesurer les paramètres de motilité et viabilité des spermatozoïdes qui sont essentiels pour déterminer la qualité spermatique. Cette expérience sera réitérée au cours de cette saison 2022. Mais pour comprendre plus précisément le rôle du milieu urbain sur l'investissement reproducteur et la qualité des gamètes, une analyse plus approfondie de la qualité des ressources disponibles, en termes d'antioxydants, d'acide gras et de minéraux essentiels, serait nécessaire. Contrairement aux poussins dont le régime alimentaire est principalement composé d'invertébrés pendant cette période, il ne faut pas négliger l'apport en nourriture anthropique pour les adultes, surtout en ville. Ces mesures devraient être réalisées à la fois dans les proies et dans les ressources anthropiques (e.g. mangeoires).

La plus faible disponibilité alimentaire observée en ville semble également expliquer que la condition corporelle des poussins urbains soit plus faible à l'envol que celle de leurs congénères forestiers, le nombre de proies disponibles étant insuffisant pour couvrir leurs besoins nutritionnels. Ce résultat a d'ailleurs été mis en évidence dans d'autres études (Biard et al., 2017; Caizergues et al., 2021). Les effets de l'urbanisation sur la taille des poussins (Chapitre 2.1) semblent dépendants de l'intensité de l'urbanisation à laquelle ils sont exposés (Biard et al., 2017). Un lien corrélatif entre la proportion de surfaces bétonnées et la croissance a été mis en évidence chez la même espèce en ville (Corsini et al., 2020). Il est possible que les paramètres environnementaux mesurés en ville ne soient pas suffisants pour aboutir à des retards de croissance chez les poussins. Une analyse des différences de tailles à plus fine échelle au sein de la matrice urbaine permettrait de distinguer ces différents effets. L'absence de différence de taille chez les poussins alors même qu'elle est observée chez les adultes peut également laisser supposer que contrairement au milieu naturel, le milieu urbain favoriserait les individus de petite taille, car elle présenterait un avantage face aux contraintes urbaines. Mais l'impact de ses divergences morphologiques sur la fitness des individus reste néanmoins à démontrer, bien que nous ayons mis en évidence pour les individus les plus petits en ville un accès privilégié à la reproduction (Chapitre 2.2).

### *Un phénotype lié à une divergence de rythme de vie entre ville et forêt ?*

Selon l'hypothèse de la divergence des rythmes de vie entre les populations urbaine et forestière, le succès reproducteur plus faible des individus urbains serait lié à une réduction du nombre de jeunes produits en faveur d'une plus grande maintenance somatique.

Effectivement, la taille de ponte réduite observée en ville peut témoigner d'une différence de stratégie reproductive entre les populations urbaine et forestière. La quantité de proies étant limitée, les reproducteurs urbains maximisent leur fitness en produisant moins de jeunes, mais en allouant à chacun des poussins une quantité de nourriture suffisante. Cette stratégie permet de maximiser la qualité de ces poussins et leurs chances de survie tandis que les reproducteurs forestiers misent sur le nombre de jeunes produits (Martin, 1987; Sepp et al., 2017). L'augmentation de la taille de nichée augmente la compétition entre les jeunes pour les ressources (Stier et al., 2015). Le compromis existant entre la taille de nichée et la qualité des jeunes est d'ailleurs illustré par la corrélation négative entre la condition corporelle et la taille

de nichée mise en évidence pour nos populations de mésanges (Chapitre 2.1). Lorsqu'on compare le taux d'envol entre nos sites d'études, il est soit similaire entre les deux sites, soit inférieur en ville selon l'année considérée (Chapitre 1). La survie des poussins avant envol ne semble donc pas favorisée par la réduction de la taille de ponte en ville. De plus, comme dit précédemment, la condition corporelle des poussins urbains reste plus faible que leurs congénères ruraux, quelle que soit l'année. Or, ce paramètre est directement corrélé à la survie post-envol des poussins en milieu naturel (Naef-Daenzer et al., 2001). Dans une étude chez la mésange charbonnière, Corsini et al. (2010) ont testé la corrélation entre le gradient d'urbanisation, la masse des poussins et leur survie à différents âges. Ils ont pu mettre en évidence que l'urbanisation tendait à augmenter la mortalité des poussins les plus légers entre 2 et 15 jours, mais que cette corrélation n'était plus significative entre 15 et 25 jours. Il est possible que bien que le taux d'envol soit similaire entre les deux sites certaines années, on observe une mortalité accrue des jeunes ayant quitté le nid en ville, notamment pour les poussins ayant une masse inférieure à la masse critique de survie post-envol (15,69 g, Naef-Daenzer et al., 2001). En effet, la survie post-envol des individus est associée à une prédation importante des jeunes ayant une mauvaise condition corporelle (Naef-Daenzer et al., 2001). Néanmoins, la modification des pressions de prédateurs liée à des différences de prédateurs, la présence de nourriture alternative ou des comportements anti-prédation plus efficaces (Eötvös et al., 2018) peuvent potentiellement tempérer les effets d'une condition plus faible chez les poussins urbains. De plus, la présence de nourriture anthropique et la stabilité des températures contribuent à rendre le milieu urbain plus prévisible que le milieu naturel, réduisant la nécessité d'avoir des réserves énergétiques importantes (Shochat, 2004). Il serait donc intéressant d'observer la corrélation entre la condition corporelle et la survie des poussins après envol, voire le succès reproducteur futur, pour pouvoir mesurer les conséquences à long terme d'un stress nutritionnel précoce. Il est donc difficile à l'heure actuelle de pouvoir affirmer que les individus urbains développent un rythme de vie lent (slow pace of life) par rapport aux individus forestiers.

En revanche, si on considère les traits physiologiques des individus, certaines de nos observations viennent effectivement étayer l'hypothèse d'un rythme de vie plus lent en ville. Chez les poussins, très peu de différences ont été mises en évidence entre les deux sites, mais les poussins urbains présentaient moins de dégâts oxydatifs que les poussins forestiers selon les années. Chez les adultes, en revanche, les individus urbains présentaient des télomères plus longs que leurs congénères forestiers et de meilleures défenses antioxydantes. Des télomères plus longs sont les marqueurs d'une meilleure résistance au stress oxydatif et d'une meilleure maintenance somatique (Chatelain et al., 2020; Louzon et al., 2019) mais le lien entre ce phénotype et la survie ainsi que la longévité de nos individus n'a pas encore été clairement établi chez la mésange charbonnière. Il existe néanmoins une étude qui montre chez cette espèce une disparition sélective des individus avec les télomères les plus courts en ville (Salmón et al., 2017). Des défenses antioxydantes plus élevées témoignent également d'une meilleure résistance au stress oxydatif, même si elles peuvent à terme s'avérer coûteuses énergétiquement pour l'individu (Isaksson, 2020). Il convient également de remettre ce résultat en perspective avec la signification de ce biomarqueur. Les OXY, le marqueur utilisé pour mesurer les défenses

antioxydantes dans notre étude, est un indice global permettant de mesurer la concentration d'un ensemble d'antioxydants non enzymatiques. Chez des individus pour lesquels le volume de prélèvement est limité, il présente l'avantage d'obtenir un maximum d'informations en minimisant le nombre de mesures. Par conséquent, nos mesures d'antioxydants sont à la fois représentatives de l'investissement de l'individu dans la production endogène de molécules antioxydantes comme le glutathion, et représentatives de la teneur en antioxydants alimentaires comme la vitamine E et les caroténoïdes (Costantini and Verhulst, 2009). Ainsi, ce marqueur pourrait être partiellement représentatif d'une différence de la qualité des ressources entre les sites. Cette hypothèse pourrait également expliquer l'absence de symétrie des résultats obtenus pour les dégâts oxydatifs et pour les capacités antioxydantes (Chapitre 2.1). La mesure d'autres marqueurs du statut oxydatif pourrait donc compléter les résultats mis en évidence durant cette étude. Ces résultats bien que prometteurs restent donc insuffisants pour déterminer l'existence d'une divergence réelle de rythme de vie entre les individus. Pour avoir un aperçu global du phénotype de nos populations, d'autres mesures seraient intéressantes à explorer comme la mesure du métabolisme de repos, les réponses immunitaires ou la pression parasitaire à laquelle les oiseaux sont exposés. Mais surtout, il est indispensable de tester la corrélation de ces paramètres avec la survie des individus pour véritablement conclure à l'existence d'un compromis différent entre reproduction et survie en ville. Quelques études utilisant des techniques de Capture-Marquage-Recapture (CMR) ont démontré une meilleure survie des adultes en ville (Hörak & Lebreton, 2008, Evans et al. 2015) mais le lien entre les traits physiologiques et la survie des individus chez les adultes reste encore très méconnu. De plus, en ce qui concerne les traits reproductifs, notre étude ne s'est focalisée que sur les premières pontes, or certaines études tendent à montrer que les individus urbains sont plus susceptibles d'initier une seconde ponte que leurs congénères ruraux (Charmantier et al., 2017). Il serait pertinent de mesurer le succès reproducteur au sein de chaque population en tenant compte de ces secondes pontes pour obtenir des données précises sur l'investissement reproducteur total lors d'une saison.

### *Le milieu urbain exerce-t-il un rôle de filtre sur la qualité des individus ?*

D'un autre côté, l'hypothèse d'une divergence de rythme de vie n'est pas la seule qui peut être retenue pour expliquer ces résultats. Dans cette étude, nous avons également tenté de tester l'existence de différences d'âge entre nos populations pour expliquer la longueur plus importante des télomères chez les individus urbains. En effet, il est connu que les télomères tendent à raccourcir avec l'âge chez de nombreuses espèces (Tricola et al., 2018) et il semblerait que ce soit également le cas chez la mésange charbonnière (Atema et al., 2019) même si des exceptions existent. Cependant le faible nombre d'oiseaux d'âge connu, c'est-à-dire les oiseaux bagués à la naissance et recapturés comme reproducteurs (12 oiseaux sur les 4 années de suivi), et l'utilisation des patterns de mue ne nous ont pas permis de rejeter complètement l'hypothèse d'individus reproducteurs en moyenne plus jeunes en ville. Même si le nombre d'oiseaux dans les deux catégories d'âge était similaire entre les sites, il est possible que des différences puissent exister au sein de la dernière catégorie (oiseaux de deux ans et plus) (Chapitre 2.2). De plus, les mécanismes de sénescences contribuent à modifier les stratégies d'histoire de vie d'un individu.

L'augmentation de l'effort reproducteur affecte négativement la reproduction et la survie future d'un individu (Velando et al. 2006). Les jeunes individus ayant de plus grandes perspectives de reproduction prioriseront donc la maintenance somatique pour maximiser le nombre de jeunes produits à long terme, tandis que les individus les plus âgés prioriseront davantage l'investissement dans leur reproduction actuelle au détriment de leur maintenance somatique (Velando 2006), leurs perspectives de reproductions futures étant limitées. Ainsi, il est possible que les différences reproductives et physiologiques observées soient liées à des différences d'âge des reproducteurs. L'accès à l'âge des individus pourrait également nous permettre de mieux comprendre la répartition des individus les plus âgés entre les deux sites et de déterminer si les patterns de sénescence sont différents entre ville et forêt.

D'autre part, alors qu'une différence de télomère a été observée chez les adultes, aucune de ces différences n'a en revanche été observée chez les poussins laissant supposer d'une disparition sélective des individus avec les télomères les plus courts en ville. Ce phénomène avait également été observé chez d'autres populations de la même espèce (Salmón et al., 2017). De la même manière, de meilleures défenses antioxydantes et des télomères plus longs chez les individus urbains auraient pu laisser supposer que seuls les individus de bonne qualité parvenaient à accéder à la reproduction, mais notre étude visant à tester cette hypothèse présente des résultats mitigés suggérant davantage un coût plus important de la reproduction en ville. D'autres aspects restent également à élucider, notamment le possible caractère adaptatif de la plus petite taille des adultes qui semblent conférer un avantage pour l'accès à reproduction, et de manière générale l'origine des divergences phénotypiques observées en ville. Il faudrait déterminer si elles sont liées à des variations génétiques ou à de la plasticité phénotypique.

### *Rôle de la météorologie et de l'environnement pour une meilleure compréhension des variations phénotypiques*

Ce travail de thèse a mis en évidence l'importance de considérer l'aspect temporel dans les études portant sur les effets de l'urbanisation sur les organismes. Effectivement, bien que certains paramètres semblent fixes entre les années comme la taille de ponte, d'autres ne le sont pas comme les différences de longueurs de télomères entre les populations et le taux d'envol des poussins. De manière intéressante, nous avons mis en évidence une corrélation significative entre l'impact des conditions météorologiques pendant l'élevage des jeunes et leur survie jusqu'à l'envol en ville alors que cette relation ne semblait pas significative en forêt. Mais paradoxalement alors que la survie des poussins en ville semblait décliner avec une augmentation des précipitations et une diminution de la température, c'est en forêt que l'on observe le plus de variations interannuelles en termes de nombre de poussins. L'étude des paramètres physiologiques et morphologiques dans le chapitre 2.1 semble également soutenir des effets plus marqués de la météorologie en forêt chez les poussins même si la corrélation entre la physiologie et les paramètres météorologique n'a pas encore pu être testée. Par exemple, les poussins présentaient moins de dégâts oxydatifs en ville pour la plus mauvaise des trois années (2016). Il est néanmoins possible que ces résultats soient liés à une mortalité accrue des individus avec le plus de dégâts oxydatifs, ou une plus petite taille en ville avant que ceux-ci soient prélevés. Il serait peut-être pertinent de réitérer ces mesures à un stade plus précoce,

notamment lors de la période de thermodépendance des poussins (entre 2 et 8 jours). De la même manière chez les adultes, les différences observées entre les populations pour la longueur des télomères étaient liées à des variations interannuelles pour la population forestière.

Nous pouvons soulever néanmoins quelques limites à cette approche. Nous sommes parties du postulat qu'il n'y avait pas de différence de température entre les sites, car les données de température des capteurs placés sous les nicherons pendant la reproduction ne présentaient aucune différence significative entre les sites. Nous avons par conséquent utilisé les données d'une station Météo France située dans un parc urbain de Strasbourg. Cependant, ces données étant davantage représentatives des conditions en ville, cela peut expliquer l'absence de corrélation entre les paramètres météorologiques et les paramètres reproducteurs, alors même que de plus grandes variations dans le nombre de jeunes et dans les traits physiologiques sont observées en forêt. Néanmoins, l'absence de différence des dates d'éclosion entre les sites semble cohérente avec les mesures réalisées, la plupart des études semblant associer une avancée de la phénologie en ville à des températures moyennes plus élevées. Mais le phénomène d'îlot de chaleur urbain (ICU) a été observé dans de nombreuses villes de tailles plus ou moins grandes, bien qu'il puisse être mitigé par la présence d'espaces verts et de surfaces en eau au sein de la ville (Yoo, 2018). L'intensité de l'ICU peut également varier au cours des saisons. Le fait qu'il n'ait pas été détecté au printemps dans mon travail ne signifie pas qu'il en est de même le reste de l'année (Roth, 2012). Il est possible que celui-ci soit plus perceptible en hiver ou encore en été. D'ailleurs, la fluctuation interannuelle observée pour la phénologie de la reproduction des populations urbaines et forestières semble également montrer la nécessité de prendre en compte l'impact des paramètres météorologiques pendant l'hiver sur les paramètres reproducteurs, notamment pour l'initiation de la reproduction (Charmantier et al., 2008; Vedder, 2012). Alors que notre étude tend à démontrer les conséquences négatives d'une diminution de température et d'une forte pluviométrie durant la reproduction, nous n'avons pas pu observer les conséquences de fortes chaleurs sur cette reproduction. Or certaines études tendent à montrer qu'au contraire les individus urbains présenteraient une tolérance thermique plus importante que leurs congénères forestiers (Bonier et al., 2007). Un suivi à plus long terme serait donc nécessaire pour comprendre l'ensemble des variations des paramètres reproducteurs associées aux paramètres météorologiques sur les deux sites.

Enfin, alors que nous avons mis en évidence des différences interannuelles importantes pour le phénotype des individus, nous n'avons pas pris en compte cet aspect temporel pour les facteurs environnementaux considérés dans ce travail. Or, si on veut comprendre comment l'urbanisation impacte la dynamique des populations, il faut également tenir compte de la dynamique des facteurs environnementaux. Certains paramètres comme la pollution ou la biomasse d'invertébrés peuvent évoluer rapidement d'une année à l'autre. Par exemple, une étude menée par Lévy et al. (2018) sur la qualité de l'air à Strasbourg, a révélé une diminution drastique des HAP et des PCB entre 2013 et 2016. L'évolution interannuelle de la pollution et de la biomasse en invertébrés sur chacun des sites permettrait par exemple de mieux comprendre comment les conditions météorologiques influencent le succès reproducteur des individus. Il serait également intéressant d'observer plus finement les variations microclimatiques locales liées à la proportion en surfaces bétonnées autour de chacun des nicherons.

*La caractérisation du milieu urbain, vers des mesures à fines échelles*

De manière générale, lorsque que nous avons caractérisé le milieu urbain, nous nous sommes attachés à mesurer une multitude de paramètres différents aussi bien en terme de pollution qu'en terme de couvert végétal et de disponibilité alimentaire alors que la plupart des études visant à étudier l'impact du milieu urbain se focalisent généralement sur un seul paramètre d'intérêt (e.g les mesures de pollution) ou restent purement qualitatif (dichotomie ville/milieu naturel sans caractérisation particulière des sites) (Szulkin et al., 2020). Rares sont les études qui proposent de caractériser le milieu urbain avec autant de paramètres (Caizergues et al. 2021). Néanmoins, la description de l'environnement proposée dans cette étude est loin d'être exhaustive. Pour caractériser plus précisément les différences entre nos sites d'études, d'autres paramètres tels que la fréquence de dérangement par l'Homme, ou encore la pollution lumineuse et sonore seraient indispensables. De plus, la majorité des mesures environnementales et des nichoirs suivis pendant cette étude se situaient dans des parcs urbains, qui sont loin de représenter l'hétérogénéité de la matrice urbaine. L'installation de nichoirs supplémentaires couvrant l'ensemble du gradient urbain et une mesure à plus fine échelle des paramètres environnementaux (e.g. pour chaque nichoir) permettraient d'établir des corrélations plus précises entre les traits d'histoire de vie et les paramètres environnementaux. De plus, les caractéristiques urbaines observées à Strasbourg ne sont pas forcément identiques à celles observées dans d'autres villes. Bien que de nombreuses caractéristiques soient communes à la plupart des villes, les niveaux de stress auxquels les individus sont confrontés peuvent varier d'un site à l'autre, expliquant en partie la grande variabilité de phénotypes observés chez différentes populations d'une même espèce. Pour avoir un aperçu global des conséquences phénotypiques associées à l'urbanisation, il convient donc de réaliser des répliques au sein de villes différentes soumises à différentes pressions de sélection. C'est ce que propose un projet ANR, URBANTIT, initié par Sylvie Massemin et coll. en 2019. Ce projet vise à tester les adaptations phénotypiques de la mésange charbonnière à la vie en ville en comparant les populations urbaines et forestières de plusieurs sites en France (Montpellier, Dijon, Strasbourg, Besançon et Toulouse), mais également en tenant compte de l'hétérogénéité à fine échelle le long d'un gradient d'urbanisation au sein de chaque site. Grâce à ce projet, le nombre de nichoirs installés sur nos sites d'étude a considérablement augmenté, favorisant de facto le nombre de captures et de contrôles des individus. Les résultats obtenus durant les prochaines années permettront donc d'adresser l'ensemble des problématiques soulevées pendant cette thèse comme 1) la corrélation entre les divergences phénotypiques observées entre les populations et l'âge des individus ; 2) l'estimation de la survie à long terme des individus et du lien corrélatif avec les paramètres physiologiques et 3) approfondir l'hypothèse de l'existence d'un filtre urbain basé sur la qualité des individus.

## PARTIE 2 – Approches expérimentales

---

Impact des cocktails de  
micropolluants sur la physiologie du  
diamant mandarin  
(*Taeniopygia guattata*)





## Chapitre 3

---

### Conséquences de l'exposition à de cocktails d'éléments traces métalliques représentatifs de l'exposition urbaine chez le diamant mandarin et rôle de la supplémentation en calcium

3.1) Conséquences de l'exposition à un cocktail de métaux traces chez le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*) et effet d'une supplémentation en calcium.

#### Contexte

L'urbanisation entraîne une densification des populations et une concentration des activités anthropiques en ville qui peuvent conduire au relargage de nombreux polluants dans l'environnement. Parmi ces polluants, on trouve des éléments métalliques et métalloïdes normalement présents à l'état de trace dans l'environnement et désignés sous le nom d'élément trace métallique ou ETM. Or, de nombreuses études expérimentales menées en laboratoire sur chacun de ces ETM isolés ou sur l'interaction entre deux métaux, ont révélé des effets toxiques sur la physiologie notamment sur le statut oxydatif. Mais, ces études reflètent rarement l'exposition réelle à laquelle les individus peuvent être confrontés en ville : une exposition chronique à un cocktail d'ETM essentiels (*i.e.* indispensables aux processus biologiques). De plus, la pollution urbaine peut entraîner une acidification des sols qui réduisent la biodisponibilité en calcium dans l'environnement et dans les proies. Or, la disponibilité en calcium peut limiter l'accumulation des ETM et protéger contre leurs effets délétères. Le premier but de notre étude était donc d'évaluer de manière expérimentale la toxicité d'un cocktail d'ETM représentatif d'une exposition urbaine chez le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*). Le second but de notre étude était de mettre en avant l'importance de la disponibilité en calcium pour lutter contre l'accumulation et la toxicité des ETM. Nous avons donc exposé des diamants mandarins mâles à un cocktail de huit métaux et métalloïdes (As, Pb, Cu, Zn, Co, Cd, Ni et Cr) en concentrations représentatives de celle observées à Strasbourg et nous les avons supplémentés ou non en calcium. Nous avons réalisé un suivi de la concentration des métaux dans le sang et de leurs effets sur le statut oxydatif et la longueur des télomères de nos animaux.

#### Résultats

L'exposition au cocktail a entraîné une accumulation de l'ensemble des ETM les plumes des oiseaux, ainsi qu'une augmentation de l'As et du Pb dans le sang. Mais chez le groupe supplémenté en calcium, ce minéral semble avoir stimulé l'accumulation en éléments essentiels comme le Zn, le Cr et le Ni dans les plumes et réduit celle des éléments non essentiels comme l'As et le Pb. Les concentrations sanguines de Pb et d'As étaient également plus faibles chez les groupes supplémentés en calcium. Or, les oiseaux présentant une concentration plus élevée de

Cd, en As et en Pb dans les plumes présentaient des télomères plus courts ce qui laisse supposer des effets protecteurs de la supplémentation en calcium face à la toxicité des éléments non essentiels soit directement, soit par l'intermédiaire de l'accumulation en éléments essentiels. En revanche, aucun effet marqué n'a été montré sur le statut oxydatif des individus.

### Conclusion

Ces résultats suggèrent que les cocktails d'ETM en concentrations similaires à celles observées en ville peuvent avoir des effets délétères sur la physiologie des individus et sur leur survie potentielle. Ils soulignent également l'importance que peut avoir la biodisponibilité en calcium pour pallier les effets toxiques des ETM non essentiels. Des études complémentaires sur les effets de ces cocktails pendant la reproduction permettraient de mettre en évidence le rôle des ETM dans le compromis d'allocation d'énergie entre la reproduction et la maintenance somatique chez les oiseaux.

Cette partie de chapitre est présentée sous la forme d'un manuscrit publié dans *Ecotoxicology and Environmental Safety*

Le *supplementary material* a été placé dans les annexes de ce manuscrit de thèse.

**Manuscrit 4 - Saulnier, A.,** Bleu, J., Boos, A., El Masoudi, I., Ronot, P., Zahn, S., Del Nero, M. and Massemin, S. 2020. Consequences of trace metal cocktail exposure in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) and effect of calcium supplementation. - *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 193: 110357. (manuscrit 4)



## Consequences of trace metal cocktail exposure in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) and effect of calcium supplementation

Agnès Saulnier\*, Josefa Bleu, Anne Boos, Islah El Masoudi, Pascale Ronot, Sandrine Zahn, Mirella Del Nero, Sylvie Massemin

Université de Strasbourg, CNRS, IPHC, UMR 7178, F-67000, Strasbourg, France

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Urban pollution  
Oxidative stress  
Telomeres  
Metal toxicity  
Birds

### ABSTRACT

Trace metal elements are significant stressors in urban areas. Their harmful effects on physiological parameters are demonstrated, but current laboratory studies are not representative of wild chronic exposure to a trace metal cocktail. Calcium can reduce the accumulation and toxicity of several metals, but soil acidification in cities leads to a decrease in bioavailability of this element. The objective of this study was to investigate the accumulation and toxicity of a trace metal cocktail representative of urban exposure on passerine birds, and test the importance of calcium availability on these toxic effects. We exposed zebra finches (*Taeniopygia guttata*) to a cocktail of seven metals and one metalloid in drinking water, with or without calcium supplementation. We monitored the concentration of metals in the blood and feathers, and their effects on oxidative status and telomere length. The metal cocktail led to higher concentration of all elements in the feathers, and of arsenic and lead in the blood. Birds with a higher concentration of cadmium, arsenic and lead in the feathers had shorter telomeres, but no impact of the cocktail was detected on oxidative status. Birds of the 'calcium' group and the 'calcium and metal' group accumulated higher concentrations of zinc, chromium and nickel in feathers. The 'calcium and metal' group also accumulated lower concentrations of arsenic and lead in feathers compared to the 'metal' group. Our results suggest that chronic exposure to a cocktail of metals at low concentrations has deleterious effects on birds, which can be limited through calcium intake.

### 1. Introduction

Trace metal elements (TME), including those commonly called 'heavy metals' by misuse of language (Duffus, 2002) in reference to their potential toxicity (e.g. lead (Pb), cadmium (Cd)), are by definition naturally present in the environment in low concentration (under 1000 ppm in the earth's crust). However, anthropogenic activities such as the combustion of fossil fuels, road traffic or industry, lead to massive releases of these metals into the environment (Järup, 2003). These activities are mainly concentrated in urban areas, leading to higher levels of TME in cities than in natural habitats. Multiple studies in polluted areas revealed that TME-pollution at very high concentrations could be related to several damages to birds physiology, primarily oxidative balance (Berglund et al., 2014; Espín et al., 2017; Sánchez-Virosta et al., 2019). Chronic exposure to TME leads to their accumulation in different tissues such as the kidneys, liver, muscles, or for birds, in the feathers (Dauwe et al., 2005; Espín et al., 2016a). Accumulation can lead to the production of reactive oxygen species (ROS) via direct (Fenton) or indirect (mitochondria dysfunction) reactions

(Koivula and Eeva, 2010; Leonard et al., 2004). In response to the production of ROS, the organism could increase the production of antioxidants such as enzymes and radical scavengers (Berglund et al., 2007; Rainio et al., 2015). Glutathione (GSH) is a major antioxidant in metal-related oxidative stress. GSH can reduce ROS, but can also chelate pro-oxidant metal ions through a reaction catalysed by glutathione peroxidase (GPx) to make them biologically inert and facilitate their elimination (Koivula and Eeva, 2010). Inversely, some metals, notably Pb and cadmium Cd, can also deplete this antioxidant (Espín et al., 2014b; Fraga, 2005). Glutathione metabolism is a reliable marker of pollutant exposure in urban areas (Isaksson, 2010) and is frequently used as a metal-stress biomarker (Berglund et al., 2014; De la Casa-Resino et al., 2015; Espín et al., 2014a; Rainio et al., 2013). Non-neutralised ROS leads to oxidative stress and can cause macromolecular damage on proteins and lipids leading to the apparition of reactive oxygen metabolite (ROM), but also on DNA. In particular, it can lead to accelerated erosion of telomeres, which results in early ageing of organisms (Boonekamp et al., 2017; Epel et al., 2004). Stauffer et al. (2017) showed that great tits' nestlings (*Parus major*) living in a

\* Corresponding author. Université de Strasbourg, CNRS, IPHC, UMR 7178, 23 rue du Loess, F-67000, Strasbourg, France.  
E-mail address: [agnes.saulnier@iphc.cnrs.fr](mailto:agnes.saulnier@iphc.cnrs.fr) (A. Saulnier).

polluted environment had shorter telomeres than chicks living in an unpolluted environment. However, in urban environments, a previous study on the same species showed that telomere length is a predictor of birds' survival, with a selective disappearance of individuals who had shorter telomeres (Salmón et al., 2017). Yet, the correlation with metal exposure was not demonstrated.

Laboratory studies, in a controlled environment, are necessary to tease apart the effects of TME pollution on oxidative balance and telomere length. Laboratory studies have shown that the toxicity of metals are strongly regulated by competition processes between metals (Goyer, 1997; Levander, 1978; Wah Chu and Chow, 2002; Yenice et al., 2015). Some TME, such as zinc (Zn) and copper (Cu), are crucial for biological processes and are therefore called 'essential'. Others, such as lead (Pb) and mercury (Hg), are non-essential to biological processes and are directly toxic to organisms. Antagonistic relationships between these two types of metals have been demonstrated. Essential TME can limit the accumulation and thereby, the deleterious effects of non-essential metals (Goyer, 1997; Levander, 1978). For example, Zn has an antagonistic impact on tissue accumulation and toxicity of Pb (Prasanthi et al., 2010). There may also be synergistic effects between metals, with increased toxicity of cocktail metals compared to the sum of the toxicities of each metal separately (Wah Chu and Chow, 2002). But only a few laboratory studies have been conducted on cocktails containing more than two metals (Stankevičiūtė et al., 2018; Wah Chu and Chow, 2002; Zhu et al., 2004) especially on a bird model (Scheuhammer, 1996; Yenice et al., 2015). However, in cities, animals are exposed to diffuse pollution, i.e. a cocktail of numerous TME at low concentration, containing essential and non-essential metals and metalloid. Also, exposure to TME is often associated with emissions of Sulphur dioxide (SO<sub>2</sub>) and Nitrogen oxides (NO<sub>x</sub>) in urban areas, which leads to soil acidification and limits the bioavailability of essential elements such as calcium (Ca) in the environment (Scheuhammer, 1991). Ca is crucial for reproduction in birds but is also known to limit the absorption and toxicity of some metals such as Pb or Cd (Eeva and Lehtikoinen, 2004; Goyer, 1997). For example, Snoeijs et al. (2005) have shown that Ca supplementation in zebra finch resulted in lower Pb concentrations in the kidney and bones and prevented lead inhibition of second humoral responses. Several studies have also recently shown that Ca supplementation could increase the antioxidant capacity to cope with metal-related oxidative stress (Espín et al., 2016c; Sánchez-Virosta et al., 2019).

In this study, we propose to test the effects of a TME cocktail on the physiology of a bird species, the zebra finch (*Taeniopygia guttata*), and in addition, the impact of Ca supplementation on the harmful effects of TME. For this purpose, we exposed birds to a cocktail of 7 trace metals (Cu, Zn, Pb, Cd, chromium (Cr), nickel (Ni) and cobalt (Co)) and 1 metalloid (arsenic (As)), whose concentrations are representative of exposure in a medium-sized city (337.61 km<sup>2</sup>, 491 000 inhabitants). In the text below, we use TME to refer to both metalloids and metals. First, we measured the changes in blood and feather TME concentrations, molecular damages linked to ROS, the production of antioxidants such as GSH, and telomere length. Second, we evaluated the effect of Ca on these measures (pattern of accumulation, harmful effects on physiology) to evaluate the importance of its availability. Hence, half of the birds were supplemented with Ca. An increase of TME concentrations in the blood and feathers of the TME-exposed group was expected, in association with an increase of ROM, which are representative of oxidative damages on lipids and proteins, telomere shortening and a modification in antioxidants levels (increase or decrease). An antagonistic effect of Ca on TME concentration and less harmful impacts in Ca-supplemented birds were also predicted.

## 2. Material and methods

### 2.1. Animals and experimental design

Experimentation was performed from February to April during the non-breeding period. Forty adult male zebra finches in their first year were randomly distributed in four groups of 10 individuals in cages of 150 × 70 × 100 cm<sup>3</sup> in a room with artificial lighting on a 14 h light – 10 h night cycle. To ensure homogeneity between cages, absence of significant differences in body mass and individual size (represented by tarsus size) between groups was verified at the beginning of the experiment (ANOVA test,  $p > 0.05$ ). Each group had *ad libitum* access to seed mix (tropical finches Prestige Versele laga©) which contains low levels of Ca (1 mg/g). After a two weeks habituation period, each group received a specific treatment provided in bottles of weakly mineralised drinking water (Montcalm©). Administration of the treatment via drinking water permits to control birds' consumption and to know with accuracy the amount of TME consumed. Indeed, zebra finch is granivorous. Administration of the treatment by diet borne would have required to spike the seeds with a solution of the TME cocktail. The TME would have been located on the surface of seeds. However, birds usually remove the outer layer of the seed before eating them. In these conditions, control of the exposure to a precise quantity of TME would not have been possible.

Treatment lasted for 57 days, with fresh preparations supplied every two days. We measured the quantity of water drunk for each cage after each replacement of cocktail bottles (no difference between groups,  $p > 0.05$ ). The duration of treatment was based on previous laboratory studies, which show significant physiological effects for similar exposure (Chatelain et al., 2016a; Dauwe et al., 2006; Scheuhammer, 1991). Two groups received a TME cocktail associated with either low or high Ca diet. The two other groups received only low or high Ca diet, without the TME cocktail. There is a lack of data on the effects of urban TME cocktail in birds in a controlled laboratory situation. Thus, to prepare a cocktail representative of urban exposure, the composition and concentrations of the TME cocktail were determined on the basis of fecal TME concentrations measurement of great tits captured in the Eurometropolis of Strasbourg, France (see Table A1 Of Supplementary materials for more details). Among the detected elements in great tits' feces, TME chosen for the cocktail were the TME whose concentrations are regulated by European legislation and/or which are known to have deleterious effects on birds. Fecal TME concentrations are correlated with food TME concentrations (Bel'skii et al., 1995; Dauwe et al., 2004) and represent both the non-assimilated portion of TME in food and the portion that has been assimilated and excreted. Thus, it represents the minimal exposure of birds. Moreover, these measures of fecal TME concentrations allow to assess the proportion of each TME in a cocktail. These concentrations are representative of the minimal chronic exposure in a medium-size city. Only Pb concentration was increased in the cocktail (1ppm measured but 10ppm in the cocktail) to work on values closer than those used in previously published experiments (Chatelain et al., 2016b; Dauwe et al., 2006; Snoeijs et al., 2005). Finally, the TME cocktail contained 10 ppm (48.3 μM) of Pb (pure metal concentration prepared from PbCl<sub>2</sub>), 0.7 ppm (13.5 μM) of Cr (as Cr (NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>), 1 ppm (13.3 μM) of As (as NaAsO<sub>2</sub>), 100 ppm (1.5 mM) of Zn (as ZnCl<sub>2</sub>), 24 ppm (0.4 mM) of Cu (as CuCl<sub>2</sub>), 0.5 ppm (8.5 μM) of Ni (NiCl<sub>2</sub>), 0.2 ppm (3.4 μM) of Co (as CoCl<sub>2</sub>) and 0.1 ppm (0.9 μM) of Cd (CdCl<sub>2</sub>). Groups with high Ca diet received 1% Ca in food (seed + water as CaCl<sub>2</sub>) associated with *ad libitum* cuttlefish bones. Low Ca diet groups received 0.3% Ca in food, in accordance with the minimum recommended intake for this species and to avoid deprivation effects (Tully et al., 2000). Ca supplementation on water is regularly used in both wild (Poulin and Brigham, 2001) and laboratory (Damron and Flunker, 1995) studies. In brief, we had four groups: (1) 'TME' group: TME cocktail + Ca 0.3%, (2) 'TME + Ca' group: TME cocktail + Ca 1%, (3) 'Ca' group: Ca 1%, (4) 'Ctrl' group: Ca 0.3%. Three

birds died on the first 30 days of treatment (1 individual in 'TME + Ca' group, 1 in 'Ca' group and 1 in 'Ctrl' group) and were not included in analyses. To avoid an effect of cage position, we switched top cages with bottom cages after 29 days of experimentation. This experiment has been approved by the French national ethical committee n°35 (project APAFIS#12020–2017101116394831 v5).

## 2.2. Sampling

Before the treatment, tarsus length was measured with a calliper ( $\pm 0.1$  mm) and body mass ( $\pm 0.1$  g) with a precision scale. Blood and feathers were collected to measure physiological parameters and concentrations of TME in different tissues. During the experiment, birds and collected blood samples were weighed every two weeks. For blood samples, 100  $\mu$ L was taken from the brachial vein using 100  $\mu$ L heparinised capillaries and separated into two tubes of 50  $\mu$ L. One tube was immediately frozen at  $-20$  °C for TME concentration analyses. The other one was centrifuged at 1700 RCF for 10 min to separate plasma and erythrocytes before being conserved at  $-20$  °C for two months. Laboratory analyses were performed immediately after the end of the experimentation. On each bird, the right fourth primary feather was collected at 0 and 29 days of treatment. In this species, feathers are typically fully regrown in 26 days (Zann, 1996). Removed feathers were immediately frozen at  $-20$  °C for further TME concentration analyses.

## 2.3. TME analyses in feather and blood

TME concentrations were monitored in feathers and blood of birds. These two compartments were selected to realise non-invasive and longitudinal sampling. Moreover, the concentrations of TME in feather and blood are good indicators of metal exposure (Lodeni and Solonen, 2013).

Blood samples were weighted for digestion to assure a lower uncertainty on the TME concentration measurements than with volume sampling. Nitric acid solution ( $\text{HNO}_3$  68%, trace quality) was added and the mixture was heated to 60 °C for 2 h. Then, digested samples were diluted with deionized water before analyses. The added quantity of nitric acid and deionized water was calculated for each sample following this proportion: 0.025 g of blood + 0.25 mL of  $\text{HNO}_3$  + deionized water QSP 2.5 g. Using the same proportions of acid and water for all samples whatever the sample weight leads to better control of matrix effects during the measurements.

Total feathers (3–6 mg depending on samples) were dehydrated overnight at 80 °C. Dried feathers were weighted and washed in 0.25 M NaOH and three ultrapure water baths according to the protocol described in Frantz et al. (2012). Then, feathers were fully covered with 1 mL of pure  $\text{HNO}_3$  solution (68%, TraceMetal grade, Fischer Chemicals) and digested overnight at 40 °C before dilution with ultrapure water to a final volume of 5 mL. The concentration of each TME of the cocktail was determined by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS Agilent 7700) and was expressed in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  of blood samples or in  $\mu\text{g}/\text{kg}$  dry mass for feather samples. TME concentration was determined using a calibration curve prepared by dilutions of a multi-element certified standard (10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , CPI International). Indium 10 ppb (1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , CPI International) was used as an internal standard (See Table A2 for the operational conditions of ICP-MS analysis). Analyses were performed on day 0, day 14, day 29, day 43 and day 57 for blood samples and on day 0 and day 29 for feather samples.

For both method, blanks were prepared and measured in the same way as blood and feather samples. Numerous values were under the limit of detection (LOD) of the instrument for blood analyses (See Table A2 of Supplementary Material for the LOD of the ICP-MS analysis). For each TME, the instrumental LOD was calculated as the mean + 3 standard deviation of 9 blank sample measurements. The method LOD reported in Tables A2.1 and A.2.1 could change between the samples as the method LOD is impacted by the dilution factor, which depends on

the sample mass available for analysis. Indeed, blood mass depends on the blood collected and is different according to individuals. Specificity of the analytical methods was checked by recovery measurements of spiked samples. Recovery values were 90–110% for all elements.

## 2.4. Physiological analyses in erythrocytes and plasma

Relative telomere length (RTL) was measured on erythrocytes (day 0, day 29 and day 57), by quantitative real-time amplification method (qPCR) adapted for birds, following the method of Criscuolo et al. (2009). DNA was extracted and purified with Nucleospin® Blood QuickPure kits (from Macherey-Nagel©). Then, the quantity and purity of the extracted DNA were measured using a microvolume spectrometer, the Nanodrop 1000 (Thermo scientific©). The control used was glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene, specific of the zebra finch. Primers used for this control was GAPDH-F: 5'-AACCAGCAAGTACGATGACAT-3' and GAPDH-R: 5'-CCATCAGCAGCAGCC TTCA-3' diluted to 5 nM. Primers used for telomere were Tel1b: 5'-CGGTTTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3' and Tel2b 5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT-3' diluted to 5 nM. Amplification cycle was performed with 5 ng of DNA per well, and we used the GoTaq® qPCR mix (Promega, Madison, USA). Conditions for telomere amplification started with 2 min at 95 °C followed by 30 cycles of 30 s at 56 °C, 30 s at 72 °C and 1 min 15 s at 95 °C. For GAPDH, amplification started with 2 min at 95 °C followed by 40 cycles of 1 min at 60 °C and 1 min at 95 °C. Each plate includes a serial dilution of referent individual's DNA (20 ng, 10 ng, 5 ng, 2.5 ng and 1.25 ng). These are used as a standard curve to control the amplification efficiency, which was 102.6% for GAPDH and 98.0% for telomere. Both negative control (water) and melting curves were run for each plate to check for non-specific amplification and primer-dimer artefacts. Each sample was run in duplicate. The RTL corresponds to the ratio (T/S) of telomere repeat copy number (T) to control gene copy number (S). The sample corresponding to the referent individual was designated 'golden sample' with a ratio (T/S) arbitrarily set to 1. Mean intra-individual Cq (number of cycles necessary to detect amplified DNA above basal signal) variation was  $0.57 \pm 0.04\%$  for GAPDH assay and  $1.62 \pm 0.12\%$  for telomere assay. Mean inter-run Cq variation was  $0.48 \pm 0.05\%$  and  $1.95 \pm 0.27\%$  for GAPDH and telomere respectively.

## 2.5. Oxidative stress measurement

To evaluate oxidative damage, we measured ROM such as hydroperoxides concentration in bird's plasma (day 0, day 29, day 57). Hydroperoxides are a result of oxidation of several molecules like lipid or glucoside by ROS. Measures were performed using the d-ROM test (diacron-reactive oxygen metabolite test, Diacron, Italy), adapted in 96 wells plate. Briefly, 200  $\mu$ L of the provided acid buffer combined to a chromogenic substrate was added to 4  $\mu$ L of plasma to cause iron salting-out and incubated at 37 °C during 75 min. With iron, hydroperoxide was converted in alkoxy and peroxy radicals by Fenton reaction. Free radicals will then react with the chromogenic substrate that turns pink when oxidised. The absorbance of the samples is then measured at 510 nm. The value obtained is directly proportional to the ROM in the sample. Concentration was determined with a standard sample with known absorbance and converted to mg of  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{dL}$  (based on Carratelli Units) following the kit instructions. Samples were run in duplicates. Mean coefficient of intra-individual and inter-plate variation was  $4.99\% \pm 1.96$  and  $6.25\%$  respectively.

Associated with oxidative damage, we performed some antioxidant measures. We measured total (GShtot), free (GSH) and oxidised glutathione (GSSG) concentration and glutathione peroxidase activity (GPx) on erythrocytes. Glutathione concentration (GShtot, GSH and GSSG), in  $\mu\text{mol}/\text{L}$ , was determined using a 5  $\times$  96 well Glutathione Fluorescence kit (Arbor Assay, USA) on 1:100 diluted erythrocytes in

5% of 5-sulfosalicylic acids (SSA) (as recommended by the fabricant instructions. GPx, in U/mg erythrocytes, was measured with a Ransox kit (Ransel, UK) adapted in 96 wells plate, in 5  $\mu$ L of 1:40 diluted erythrocytes using the diluting buffer provided with the kit. Samples were run in duplicates. Of intra-individual variations were of  $1.75\% \pm 0.75\%$ ,  $3.78\% \pm 2.33\%$ ,  $2.25\% \pm 1.67\%$  for GShtot, GSH and GPx respectively. Mean coefficients of inter-plate variation was of 2.70% and 4.30% for GShtot and GPx respectively.

## 2.6. Statistical analyses

Statistical analyses were conducted with R software (3.4.3 version) with 'nlme', 'car', 'lme4' and 'multcomp' packages (R Development Core Team, 2016).

### 2.6.1. Effect of TME and Ca supplementation on TME concentrations in blood and feathers

Statistical approaches were different between blood and feather concentrations. For feathers, all TME concentrations were above the LOD except Co concentrations. We performed statistical tests taking into account the "cocktail" effect of metals on physiology and allowing the visualisation of accumulation patterns. On the contrary, in blood, there were many metal concentrations under the LOD, except for Cu and Zn. Thus, calculations have been done for each TME considered individually. Data under the LOD indicate that these concentrations are very low and cannot be determined. But this data is different from a missing value. This kind of dataset, with both exact values (above the LOD) and non-exact values (below the LOD), is a left-censored dataset and can be analysed with specific statistical tools such as those developed in the NADA package (Helsel, 2011). More precisely, for blood, we used a non-parametric score test that determines whether distribution function differs among groups of censored data. This is called a generalized Wilcoxon test or a Peto-Prentice test (cendiff function in the NADA package). The advantage of score tests is that they can handle data censored at multiple reporting limits (Helsel, 2011).

Differences between treatments were tested at each exposure time. When Wilcoxon scores were significant, multiple comparison tests were performed between each pair of groups with a Bonferroni correction of the p-value:  $p\text{-value}_{\text{pairwise}} = 0.05/\text{number of comparison}$ . Corrected p-value was equal to 0.0083 (6 pairs of comparisons) for multiple treatment comparisons. We considered as significant only the tests with a p-value less than or equal to this value.

For TME concentrations in feathers, principal component analyses (PCA) were performed to observe the relationships between metals and differences in accumulation patterns between groups. Co was excluded from the PCA because numerous values were under the LOD. Before analyses, feather TME concentrations were scaled and centred to normalize the distribution. The Bartlett's test for sphericity ( $\chi^2_{\text{dat}(28)} = 190.5$ ,  $p\text{-value} < 0.01$ ) and correlations were ran to ensure data appropriateness for PCA ( $p < 0.05$ ). For each individual, the composite variables PC1Feather and PC2Feather corresponding to the first and second principal components of the PCA, respectively, were extracted. To test the differences of PCA components (PCA1Feather and PCA2Feather) between treatments, mixed effect linear models were performed followed by ANOVA of type III for each component. Models included treatment, exposure time and their interaction as explanatory variables and individual as a random effect (Bird ID) to take into account the non-independence of repeated measures on the same individual. When ANOVA were significant, Tukey multiple comparison tests ('multcomp' package) were used to perform post-hoc tests. Normality and homoscedasticity of residuals were verified with Kolmogorov-Smirnov and Bartlett test, respectively. These variables (PCA1Feather and PCA2Feather) were also used as explanatory variables in models for physiological analyses.

### 2.6.2. Effect of TME and Ca supplementation on body mass and physiological parameters

Before treatment, the homogeneity in body mass and tarsus length (representative of body size) between groups were checked with ANOVA type III test. There were no differences between groups (body mass:  $F_{3,34} = 1.12$ ,  $p\text{-value} = 0.36$ ,  $\log(\text{tarsus})$ :  $F_{3,33} = 0.87$ ,  $p\text{-value} = 0.47$ ).

Influence of the treatment on physiological parameters and body mass were analysed using mixed effects linear models followed by type III ANOVA. We tested seven models: body mass, telomere length, GSH, GSSG, GShtot concentration, GPx activity and ROM concentration. The best model for each parameter was selected using a stepwise method based on the p-value. For each model tested, the variable or interaction with higher p-value was deleted until only significant variables were left ( $p < 0.05$ ). When none of the variables was significant, the last non-significant variable was kept. In all models, the random effect was the individual (bird ID) to take into account the non-independence of repeated measures on the same individual. Concerning fixed effects, full models included treatment, time of treatment and its interaction as explanatory variables with body mass and tarsus length as covariates. For body mass model, only tarsus length was a covariate. When variables were significant, Tukey multiple comparison tests ('multcomp' package) were used to perform post-hoc tests. Direct effect of TME exposure on physiological parameters was also tested. For each physiological parameter, linear mixed models were run with variables PC1Feather and PC2Feather as an explanatory variable (with bird ID as a random effect). For blood, we performed linear mixed models between each physiological parameter and single TME concentration above the LOD (with bird ID as random effect). For all linear models, normality and homoscedasticity of residuals were checked with Kolmogorov-Smirnov and Bartlett test respectively. To validate these conditions, telomere length, GSH (free, total and GSSG), ROM and GPx were log-transformed. For free GSH and body mass, we applied treatment-dependent variance (option varIdent) in our models (Zuur et al., 2009) because homoscedasticity was not respected.

## 3. Results and discussion

In blood, statistical analyses on Co could not be performed because Co concentrations above LOD represent only 13.9% of all values (Table 1). When values above LOD represent less than 20% of dataset, statistical tests are unreliable (Helsel, 2011). In blood, less than 50% of values were above the detection limits for Cr, Cd, Ni and As (22.8% for Cr, 26.1% for Cd, 35.3% for Ni and 37.7% for As). Pb concentrations above LOD represented 66.1% of total values, and Zn and Cu concentrations were all above the detection limits. In feathers, all values were above the LOD except for Co (75%). Nevertheless, we did not include the Co in the statistical analysis because we did a PCA analysis that cannot handle censored values (see material and methods).

### 3.1. Effect of the exposition to TME cocktail and Ca supplementation on blood and feather TME concentrations

Concerning the concentration of TME in blood, generalized Wilcoxon tests show no significant difference between treatments at day 0, except for As (Table 2). Nevertheless, pairwise comparisons revealed no significant differences for this TME (Table 1,  $p\text{-values} > 0.0083$ , See Table A3 of Supplementary material for values of pairwise tests and p-values). Several significant effects of groups (for example at day 14 for Cr or Cd) were not supported by significant differences in the pairwise comparisons. As and Pb concentrations in 'TME' group were higher for the period from day 14 to day 57 compared to day 0. The 'TME' group presented higher concentrations than the three other groups at day 14, 29, 43 and 57 (Table 2,  $p\text{-values} > 0.0083$ ) for Pb (except for day 14) and As. Rich-calcium diet seemed to limit the increase of these two TME concentration in the blood of 'TME + Ca'

**Table 1**  
Concentration of metal in blood (in ppm) at each exposure time.

Metal	Treatment	T0			T14			T29			T43			T57		
		> LOD/n	mean ± SD	> LOD/n	> LOD/n	mean ± SD	> LOD/n	mean ± SD	> LOD/n	mean ± SD	> LOD/n	mean ± SD	> LOD/n	mean ± SD		
Arsenic	Ctrl	0/9		a	1/9	0.003	a	1/9	0.007	a	1/9	0.002	a	0/9		
	TME	0/8		a	10/10	0.014 ± 0.008	b	9/9	0.016 ± 0.009	b	10/10	0.021 ± 0.011	b	10/10	0.018 ± 0.011	
	Ca	0/9		a	0/9	0.004 ± 0.003	a	3/9	0.004 ± 0.003	a	1/9	0.005	a	0/9		
Cadmium	TME + Ca	2/7	0.012 ± 0.002	a	7/9	0.004 ± 0.002	a	0/9	0.004 ± 0.002	a	4/9	0.008 ± 0.002	a	9/9	0.004 ± 0.003	
	Ctrl	0/9		a	0/9			0/9			2/9	0.01 ± 0.002	ab	0/9		
	TME	0/8			0/10	0.005 ± 0.006	ab	4/9	0.005 ± 0.006	ab	2/10	0.002 ± 0.00005	a	2/10	0.005 ± 0.0003	
Chromium	Ca	1/9	0.007		0/9			0/9			1/9	0.009	b	1/9	0.068	
	TME + Ca	1/7	0.23		3/9	0.005 ± 0.003		9/9	0.005 ± 0.003		1/9	0.004	a	0/9		
	Ctrl	5/9	0.006 ± 0.007		6/9	0.011 ± 0.006		4/9	0.011 ± 0.006		2/9	0.014 ± 0.012		2/9	0.014	
Cobalt	TME	1/8	0.002		1/10	0.029		1/9	0.029		2/10	0.02 ± 0.012		2/10	0.020	
	Ca	4/9	0.013 ± 0.032		6/9	0.013 ± 0.022		4/9	0.013 ± 0.022		2/9	0.032 ± 0.019		2/9	0.032	
	TME + Ca	1/7	0.011		1/9	0.012		0/9	0.012		1/9	0.027		1/9	0.027	
Copper	Ctrl	0/9			0/9	0.003 ± 0.004		3/9	0.003 ± 0.004		1/9	0.002		0/9	0.003 ± 0.001	
	TME	0/8			0/10	0.003 ± 0.003		0/9	0.003 ± 0.003		5/10	0.003 ± 0.003		6/10	0.003 ± 0.001	
	Ca	0/9			0/9	0.003 ± 0.003		2/9	0.003 ± 0.003		1/9	0.002		0/9	0.004 ± 0.002	
Lead	TME + Ca	0/7			0/9	0.398 ± 0.167		0/9	0.398 ± 0.167		4/9	0.034 ± 0.105		3/9	0.004 ± 0.002	
	Ctrl	9/9	0.52 ± 0.441		9/9	0.292 ± 0.337	a	9/9	0.292 ± 0.337	a	9/9	0.245 ± 0.037		9/9	0.32 ± 0.061	
	TME	8/8	0.296 ± 0.048		10/10	0.283 ± 0.088		9/9	0.283 ± 0.088		10/10	0.326 ± 0.091	ab	10/10	0.239 ± 0.062	
Nickel	Ca	9/9	0.364 ± 0.149		9/9	0.355 ± 0.074		9/9	0.355 ± 0.074		9/9	0.274 ± 0.077	ab	9/9	0.326 ± 0.053	
	TME + Ca	7/7	0.325 ± 0.147		9/9	0.403 ± 0.153		9/9	0.403 ± 0.153		9/9	0.326 ± 0.052	b	9/9	0.286 ± 0.03	
	Ctrl	4/9	0.031 ± 0.043		5/9	0.034 ± 0.043		5/9	0.034 ± 0.043		9/9	0.076 ± 0.131	a	2/9	0.04 ± 0.032	
Zinc	TME	0/8	0.055 ± 0.17		10/10	0.2 ± 0.063	b	9/9	0.2 ± 0.063	b	10/10	0.276 ± 0.105	b	10/10	0.226 ± 0.089	
	Ca	3/9	0.186 ± 0.453		8/9	0.024 ± 0.01	a	2/9	0.024 ± 0.01	a	9/9	0.032 ± 0.054	a	1/9	0.240	
	TME + Ca	2/7	0.024 ± 0.013		6/9	0.093 ± 0.043	ab	6/9	0.093 ± 0.043	ab	9/9	0.057 ± 0.024	a	9/9	0.064 ± 0.036	
	Ctrl	2/9	0.001 ± 0.005		1/10	0.184		6/9	0.01 ± 0.005		3/9	0.004		0/9		
	TME	2/8	0.007 ± 0.002		8/9	0.009 ± 0.003		1/9	0.184		0/10	0.013		0/10		
	Ca	3/9	0.015		2/9	0.059 ± 0.133		2/9	0.059 ± 0.133		1/9	0.012		0/9		
	TME + Ca	1/7	4.448 ± 1.338		9/9	5.7 ± 2.909		9/9	5.7 ± 2.909		0/9	0.012		0/9		
	Ctrl	8/8	4.415 ± 1.135		10/10	4.136 ± 0.916		9/9	4.136 ± 0.916		10/10	3.789 ± 0.45	a	9/9	3.649 ± 1.036	
	Ca	9/9	4.89 ± 2.018		9/9	5.124 ± 1.04		9/9	5.124 ± 1.04		9/9	4.508 ± 0.428	ab	10/10	3.722 ± 0.695	
	TME + Ca	7/7	4.645 ± 1.413		9/9	4.25 ± 1.049	bc	9/9	4.25 ± 1.049	bc	9/9	4.38 ± 0.495	b	9/9	4.164 ± 1.164	
	Ctrl															
	Ca															

Notes: 'n' = number of individuals for the treatment at each exposure time (days), '> LOD/n' = number of values above the limit of detection/number of values in the group, 'Ctrl' = control group with low-Ca diet and no TME, 'TME' = birds with low-Ca diet exposed to a TME cocktail, 'Ca' = rich-Ca diet and no TME and 'TME + Ca' = rich-Ca diet and TME cocktail. Post-hoc tests were performed when differences between treatments were significant (Table 2). Different letters represent significant differences using the Bonferroni correction (p < 0.0083) and are represented in bold. The absence of letter indicates that differences between treatments were not significant.

**Table 2**  
Results of statistical models comparing metal concentration in blood between treatments at different times (from 0 to 57 days) (Generalized Wilcoxon tests).

	T0		T14		T29		T43		T57	
	X <sup>2</sup>	p	X <sup>2</sup>	p	X <sup>2</sup>	p	X <sup>2</sup>	p	X <sup>2</sup>	p
Arsenic	8	<b>0.05</b>	43.8	< <b>0.001</b>	44.1	< <b>0.001</b>	47.9	< <b>0.001</b>	40.6	< <b>0.001</b>
Cadmium	2.3	0.5	2.4	0.1	27.8	< <b>0.001</b>	8.9	<b>0.03</b>	4.6	0.2
Chromium	4.8	0.2	1.1	0.8	4.2	0.2	0.6	0.9	not detected	
Copper	2.2	0.5	4.7	0.2	18	< <b>0.001</b>	9.5	<b>0.02</b>	9.8	< <b>0.001</b>
Lead	3.8	0.3	39.7	< <b>0.001</b>	50.3	< <b>0.001</b>	39.2	< <b>0.001</b>	40.3	< <b>0.001</b>
Nickel	1.1	0.8	1.5	0.7	12	<b>0.007</b>	2.2	0.5	not detected	
Zinc	0.4	0.9	4.5	0.2	16.9	< <b>0.001</b>	8.1	<b>0.04</b>	5.1	0.2

Notes: Significant differences between treatments are represented in bold.

birds. At the end of the experiment (day 57), As concentration was higher in the ‘TME’ group compared to the other groups and the Pb concentration was higher in the ‘TME’ group and ‘Ca’ group (only one value) than in other groups. Otherwise, Zn concentration was higher in both TME-supplemented groups (‘TME’ and ‘TME + Ca’) at day 29 and only in ‘Ca’ group compared to ‘ctrl’ group at day 43.

The PCA for TME in feathers explained 54.81% of the total variation of TME concentration in feathers (Fig. 1). The first principal component PC1Feather (36.94% of the variation) was mostly explained and positively correlated with Cu and also with Zn, Cr and Pb concentrations, but all TME were significantly associated with this component (p < 0.05) (see Table A4 of supplementary material for contributions and p-values). The second principal component PC2Feather (18.17% of the variation) was positively correlated with Cd, Pb and As and negatively with Ni, Zn and Cr. At day 0, the four groups were superposed and presented low concentrations of TME along both axes. PC1Feather separates feather TME concentrations of ‘TME’ and ‘TME + Ca’ groups at day 29 from the initial time and the other groups (see Table A5 of Supplementary material for TME concentrations in feathers). This pattern indicates that birds in TME-exposed groups (‘TME’ and ‘TME + Ca’) presented higher concentrations of TME in their regrown feathers (day 29) than in the initial feather and in all feathers of non-TME exposed birds, especially for Cu, Zn, Cr and Pb. These differences are significant (Table 3; Tukey test, p-values < 0.05, see Table A4 of supplementary material for all Tukey p-values), except between groups

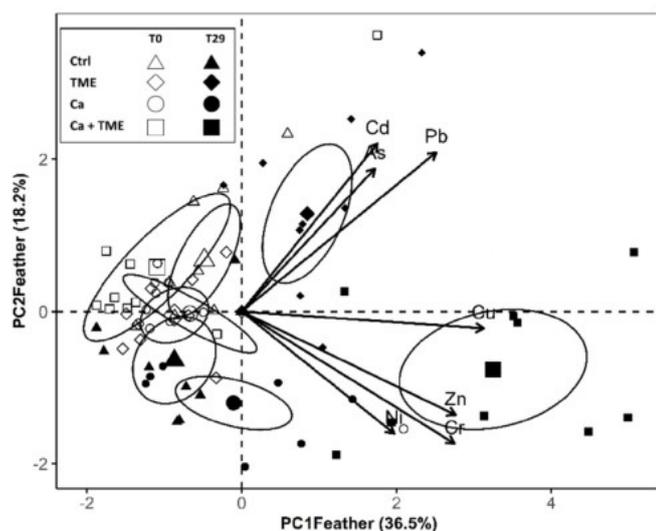
**Table 3**  
Effects of treatment and exposure time on PCA component (mixed linear models and type III ANOVAs).

	Variable	F-value	DF	p-value
PC1Feather	Treatment*Exposure time	27.53	3,33	< <b>0.001</b>
	Treatment	9.85	3,33	< <b>0.001</b>
	Exposure time	66.07	1,33	< <b>0.001</b>
PC2Feather	Treatment*Exposure time	17.06	3,33	< <b>0.001</b>
	Treatment	4.95	3,33	<b>0.0060</b>
	Exposure time	12.40	1,33	<b>0.0013</b>

Full models included treatment (‘Ctrl’: control group with low-Ca diet and no TME, ‘TME’: birds with low-Ca diet exposed to a TME cocktail, ‘Ca’: rich-Ca diet and no TME and ‘TME + Ca’: rich-Ca diet and TME cocktail), exposure time (T0 and T29) and the interaction term. In each model, bird ID was the random factor. Significant variables are represented in bold. Post-hoc tests are in Table A4.

‘TME’ at day 29 and ‘Ctrl’ at day 0 (Tukey, p-value<sub>CtrlT0-TMET29</sub> = 0.07) and between groups ‘TME’ at day 29 and ‘Ca’ at day 29 (Tukey test, p-value<sub>CaT0-TMET29</sub> = 0.37). Interestingly, PC2Feathers separates Ca supplemented groups (‘Ca’ and ‘TME + Ca’) and ‘TME’ group in regrown feathers (day 29), and their TME concentrations were significantly different (Table 3, Tukey test, p-value<sub>TMET29-CaT29</sub> and p-value<sub>TMET29-TME+CaT29</sub> < 0.001, p-value<sub>CaT29-TME+CaT29</sub> = 0.95). Ca supplemented groups (‘Ca’ and ‘TME + Ca’) accumulated a higher concentration of Zn, Ni and Cr than ‘TME’ group, which accumulated a higher concentration of Cd, Pb and As.

These results confirm that chronic exposure to a low concentration TME cocktail leads to the increase of TME in blood and feathers notably in the non-essential TME Cd (feathers), Pb (blood and feathers) and As (blood and feathers). Interestingly, these results also suggest that Ca supplementation leads to an increase of Zn, Cr, and Ni concentrations in the feathers of TME exposed birds but also for Zn in TME-unexposed birds. On the contrary, the fact that we found less As and Pb in blood and less As, Pb and Cd in the feathers of Ca-rich diet birds confirmed our initial hypothesis about the antagonistic effects of Ca supplementation on non-essentials TME. Indeed, the interaction between Pb and Ca is already well documented. For example in mammals, Six and Goyer (1970) found similar results in Pb-exposed rat: blood levels of Pb is lower for animals with normal Ca diet (0.7%) compared to those with low-Ca diet (0.1%). The antagonistic effect was demonstrated in organs like the kidney, bones and liver (Dauwe et al., 2006; Snoeijns et al., 2005). In zebra finches exposed to 20 ppm of Pb, Pb accumulation in organs (bones, livers, kidney, muscle and brain) is 2.2–3.1 times lower in oyster shell grit supplemented birds (Dauwe et al., 2006). The same mechanism was observed for Cd, in which low Ca availability leads to higher accumulation of this metal in tissues, especially in bones (Jaishankar et al., 2014; Scheuhammer, 1996; Stohs and Bagchi, 1995). However, the relation between a calcium-rich diet and As accumulation is less documented and seems to be dependent on the tissue. For example, in pollution-exposed birds, As was found in eggshell, mainly



**Fig. 1.** Representation of the PCA analysis of metal concentrations in feathers. Empty shapes represent mean coordinates of metal concentration in initial feather (day 0) for each treatment (‘Ctrl’: control group with low-Ca diet and no TME, ‘TME’: birds with low-Ca diet exposed to a TME cocktail, ‘Ca’: rich-Ca diet and no TME and ‘TME + Ca’: rich-Ca diet and TME cocktail) and the full shapes represent mean coordinates of metal concentration in regrown feathers (day 29). Ellipses represent confidence intervals.

composed of Ca, but not in the content of the eggs (Dauwe et al., 2005, 1999; Mora, 2003). Similarly, As supplementation leads to an accumulation of this element in the bones (composed largely of Ca) of great tits (Sánchez-Virosta et al., 2018), but supplementation of Ca did not reduce the concentration of As in the blood and kidneys of As-exposed rats (Srivastava et al., 2010). The mechanism of interaction between As and Ca could be potentially explained by complexation mechanisms of Ca on As (Arsenic V form) leading to neutral and non-bioavailable species  $\text{CaHAsO}_4$  and  $\text{Ca}_3(\text{AsO}_4)_2$  (Wang et al., 2008). However, the increase of essential-TME in the feathers of Ca supplemented groups was unexpected but several hypotheses can be suggested. The accumulation of Zn, Ni and Cr is favoured by Ca pathway. Some studies have shown that the divalent cation form of Ni and Zn metals can compete with Ca for binding sites on Ca channels or calcium-binding proteins, for example (Komjarova and Blust, 2009). Zn also contributes to the keratinization process explaining its high concentrations in feathers (Ek et al., 2004). In the same way, the accumulation of Cr in Ca-exposed bird is potentially linked to Zn homeostasis as revealed in zinc-deficient rats supplemented with Cr (Hahn and Evans, 2017).

### 3.2. Effect of the exposition to TME cocktail and Ca supplementation on body mass and physiological parameters

There was no significant effect of TME exposure or Ca supplementation on the body mass or telomere length of birds (p-value > 0.05, statistics in Table 4, see Table A6 of supplementary material for estimates values). Concerning the oxidative status, exposure time had a significant effect on ROM, GSSG and GShtot concentrations (Tables 4 and 5). ROM concentration of birds was lower at 57 days of treatment compared to the two previous periods T0 and T29 (Tukey:  $p_{T57-T0-T29} = 0.002$ ,  $p_{T57-T29} = 0.0003$ , and  $p_{T0-T29} = 0.84$ ).

**Table 4**

Physiological parameters and body mass depending on A) treatment, exposure time and interaction term and B) composite variables of metal concentration from the PCA: PCAfeather1 and PCAfeather2.

	Variable	F-value	DF	p-value
<b>A) Models with treatment groups and exposure time</b>				
RTL (log)	Exposure time	3.07	2,72	0.052
Body mass	Treatment	1.38	3,32	0.26
ROMs	<b>Exposure time</b>	8.83	2,69	<b>&lt; 0.001</b>
GShtot (log)	<b>Exposure time</b>	7.81	2,72	<b>0.001</b>
GSH (log)	<b>Treatment*Exposure time</b>	2.27	6,66	<b>0.047</b>
	Treatment	2.21	3,33	0.106
	Exposure time	1.37	2,66	0.262
GSSG (log)	<b>Exposure time</b>	9.43	2,72	<b>&lt; 0.001</b>
GPx (log)	<b>Treatment*Exposure time</b>	3.71	6,66	<b>0.003</b>
	Treatment	1.75	3,33	0.175
	Exposure time	2.17	2,66	0.122
<b>B) Models with PCA composite variables of metal concentration</b>				
RTL (log)	PC1 Feather	1.082	1,35	0.305
	<b>PC2Feather</b>	4.226	1,35	<b>0.047</b>
Body mass	PC1 Feather	0.34	1,35	0.561
	PC2Feather	0.002	1,35	0.961
ROMs (log)	PC1 Feather	0.0002	1,33	0.99
	PC2Feather	0.933	1,33	0.34
GSH (log)	PC1 Feather	0.298	1,35	0.588
	PC2Feather	0.370	1,35	0.547
GSSG (log)	PC1 Feather	0.077	1,35	0.783
	PC2Feather	0.463	1,35	0.500
GShtot (log)	PC1 Feather	0.393	1,35	0.534
	PC2Feather	0.774	1,35	0.384
GPx (log)	PC1 Feather	0.01	1,35	0.929
	PC2Feather	1.19	1,35	0.284

Note: RTL = Relative telomere length (ratio copy telomere/copy control gene); ROMs = Reactive oxygene metabolites; GSSG = oxidised glutathione; GSH = free glutathione GShtot = total glutathione; GPx = glutathione peroxidase. Best models were selected with a stepwise procedure from the full model that included treatment. In each model (A and B), bird ID was the random factor. The significant results are in bold.

On the contrary, GSSG and GShtot values were higher after 57 days of treatment compared to values measured after 0 and 29 days of treatment (Tukey test, GSSG:  $p_{T57-T0} = 0.001$ ,  $p_{T57-T29} < 0.001$  et  $p_{T0-T29} = 0.92$  and GShtot:  $p_{T57-T0} < 0.001$ ,  $p_{T57-T29} = 0.01$  and  $p_{T0-T29} = 0.58$ ). For GSH and GPx activity, the interaction between treatment and exposure time was significant. However, pairwise comparison only revealed that GSH concentration of 'TME' group at 57 days was higher than the concentration in the 'Ca' group at day 0 (Tukey test,  $p_{T57-T0-CaT0} = 0.04$ ). Similarly, GPx activity in 'Ca' group at 29 days of treatment was higher than day 0 (Tukey test,  $p_{CaT29-CaT0} = 0.015$ ).

There was also no significant correlation between physiological parameters and concentration of single TME in blood (Table 6). However, linear models with composite variables PC1Feather and PC2Feathers revealed a significant negative effect of PC2Feather on telomere length ( $F_{1, 35} = 4.23$ , p-value = 0.047) but no significant effects of PC1Feathers ( $F_{1, 35} = 1.08$ , p-value = 0.31). Telomere length was shorter in individuals with high concentrations of Pb, Cd and As and lower concentrations of Zn, Cr and Ni in feathers (Fig. A1 of supplementary material). There was no significant effect of composite variables of PCA on the other physiological parameters (Table 4).

The fact that birds with higher accumulated concentrations of Pb, As and Cd in feather had shorter telomeres, is concordant with the work of Stauffer et al. (2017). They found shorter telomeres in great tits nestling living in a metal-polluted area compared to a non-polluted area. Nevertheless, contrary to their study, our results suggest a direct correlation between TME concentration in tissue and telomere length. Several studies have shown the genotoxicity of Pb, As and Cd exposure (Koivula and Eeva, 2010). Genotoxicity of these TME is for a major part linked to an increase of ROS production, which can interact with oxidised DNA bases and leads to strand breaks, but, it is also linked to the inhibition of DNA repair mechanisms (Stoys and Bagchi, 1995). For example, Japanese quails (*Coturnix japonica*) exposed to 100 ppm of Pb exhibit higher plasmatic concentrations of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine (oxidised by-product of guanine) indicating more DNA strand breaks compared to unexposed birds (Frag et al., 2018). In the same way, after 40 days of exposure to 1 and 10 ppm Cd, Lucia et al. (2009) observed expression of the DNA damage repairing gene, *ggsh*, of 6.5 and 19.5 times greater respectively in Muscovy duck (*Cairina moschata*). In Spain, the blood of white stork (*Ciconia ciconia*) nestlings present a similar concentration of As (i.e. 0.02 ppm) and lower concentrations of Cd (i.e. 0.00031) than our birds and they find a significant correlation between DNA damages and As and Cd concentration (Baos et al., 2006). Our results suggest that even low concentration exposure could lead to accelerated telomere attrition on birds living in metal-polluted areas, which could affect their longevity (Epel et al., 2004). However, telomere length of birds in 'TME' group was not different from length for birds exposed to other treatments or at the initial time. This absence of significant effect can be explained by the fact that birds which exhibited high concentrations of As, Pb, or Cd were not necessarily in the 'TME' group. For example, there was no significant difference between 'TME' at day 29 and 'Ctrl' at day 0 and 'TME' at day 29 and 'Ca' at day 29 along the axis PC1Feather. In the first case, it is probably because birds of 'Ctrl' group at day 0 exhibited similar levels of Pb and Cd in feathers as the 'TME' group at day 29. The concentrations of these TME in 'Ctrl' group decreased during the experiment and thus concentrations at day 29 in 'Ctrl' group were lower than concentration in initial feathers. In the second case, it could be linked to the fact that 'Ca' group exhibited higher Zn concentration at day 0 compared to day 29.

There was no significant relationship between feather and blood TME concentration and antioxidants measured (GSH, GSSG and GShtot and GPx) nor between treatment and measured antioxidants. Results only showed a time-dependent increase of GShtot and GSSG whatever the treatments. Several field-studies exhibit a significant correlation between TME concentration in tissues and antioxidant production (De

**Table 5**  
Means and standard deviation of body mass and physiological parameters in the different treatments at different exposure times (day 0, day 29, and day 57).

	Treatment	RTL	Body mass	ROM	GSH	GSSG	GShtot	GPx
		Mean $\pm$ sd	Mean $\pm$ sd	Mean $\pm$ sd	Mean $\pm$ sd	Mean $\pm$ sd	Mean $\pm$ sd	Mean $\pm$ sd
T0	Ctrl	0.65 $\pm$ 0.24	17.77 $\pm$ 2.25	4.18 $\pm$ 2.14	674.97 $\pm$ 954.56	543.14 $\pm$ 846.82	1761.26 $\pm$ 2323.36	792.22 $\pm$ 160.96
	TME	0.75 $\pm$ 0.26	16.38 $\pm$ 1.84	3.96 $\pm$ 1.62	188.24 $\pm$ 164.33	143.77 $\pm$ 135.06	475.8 $\pm$ 400.32	723.96 $\pm$ 162.07
	Ca	0.7 $\pm$ 0.17	16.18 $\pm$ 2.39	4.86 $\pm$ 2.77	271.48 $\pm$ 446.11	254.34 $\pm$ 332.75	780.19 $\pm$ 1095.95	839.71 $\pm$ 211.61
	TME + Ca	0.76 $\pm$ 0.18	17.23 $\pm$ 2	4.54 $\pm$ 3.7	401.01 $\pm$ 426.13	96.72 $\pm$ 111.61	594.46 $\pm$ 573.27	683.71 $\pm$ 134.05
T29	Ctrl	0.85 $\pm$ 0.38	18.91 $\pm$ 2.41	3.74 $\pm$ 2.17	377.18 $\pm$ 260.39	226.44 $\pm$ 203.9	830.05 $\pm$ 591.91	741.76 $\pm$ 90.32
	TME	0.75 $\pm$ 0.22	16.85 $\pm$ 1.74	5.74 $\pm$ 4.61	349.96 $\pm$ 276.77	218.16 $\pm$ 303.68	786.27 $\pm$ 828.51	656.53 $\pm$ 82.16
	Ca	0.9 $\pm$ 0.31	16.56 $\pm$ 2.35	5.31 $\pm$ 1.85	647.6 $\pm$ 765.06	296.06 $\pm$ 469.21	1239.73 $\pm$ 1623.15	636.84 $\pm$ 122.88
	TME + Ca	1 $\pm$ 0.47	17.09 $\pm$ 1.93	3.82 $\pm$ 1.05	197.44 $\pm$ 163.56	98.16 $\pm$ 82.93	393.73 $\pm$ 237.16	782.08 $\pm$ 133.01
T57	Ctrl	0.63 $\pm$ 0.24	17.96 $\pm$ 2.01	2.18 $\pm$ 1.41	372.11 $\pm$ 665.34	572.6 $\pm$ 584.78	1517.33 $\pm$ 1679.75	684.44 $\pm$ 149.96
	TME	0.7 $\pm$ 0.19	17.01 $\pm$ 1.73	3.86 $\pm$ 2.38	569.06 $\pm$ 691.44	383.31 $\pm$ 299.51	1335.67 $\pm$ 663.81	759.95 $\pm$ 192.36
	Ca	0.85 $\pm$ 0.2	16.09 $\pm$ 1.88	3.1 $\pm$ 1.67	729.12 $\pm$ 897.1	883.29 $\pm$ 893.29	2495.69 $\pm$ 2507.2	775.7 $\pm$ 237.53
	TME + Ca	0.71 $\pm$ 0.26	17.14 $\pm$ 2.23	3.68 $\pm$ 2.25	369.31 $\pm$ 427.55	436.67 $\pm$ 473.45	1242.63 $\pm$ 1284.69	691.85 $\pm$ 102.07

Notes: 'Ctrl' = control group with low-Ca diet and no TME; 'TME' = birds with low-Ca diet exposed to a TME cocktail; 'Ca' = rich-Ca diet and no TME; 'TME + Ca' = rich-Ca diet and TME cocktail; RTL = Relative telomere length (copy telomere/copy control gene); body mass (g); ROM = Reactive oxygene metabolites (mg H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/dl); GSH = free glutathione ( $\mu$ M); GSSG = oxidised glutathione ( $\mu$ M); GShtot = total glutathione ( $\mu$ M); GPx = glutathione peroxidase (U/L hemolysat).

**Table 6**  
Physiological parameters and body mass depending on each single metal concentration in blood (mixed linear models, type III ANOVAs).

		RTL (log)	Body mass	ROM (log)	GSH (log)	GSSG (log)	GShtot (log)	GPx(log)
Arsenic n = 34	Fvalue(df)	1.53(1, 10)	0.83(1, 10)	1.35(1, 9)	1.67(1, 10)	3.95(1, 10)	0.13(1, 22)	0.22(1, 10)
	p-value	0.24	0.38	0.27	0.23	0.08	0.73	0.65
Chromium n = 20	Fvalue(df)	0.36(1, 5)	0.93(1, 5)	3.49(1, 5)	0.01(1, 5)	3.32(1, 5)	0.43(1, 5)	0.02(1, 5)
	p-value	0.58	0.38	0.12	0.94	0.13	0.54	0.88
Copper n = 106	Fvalue(df)	2.92(1, 68)	0.2(1, 68)	3.66(1, 65)	1.67(1, 68)	0.21(1, 68)	1.12(1, 68)	0.6(1, 68)
	p-value	0.09	0.65	0.06	0.20	0.65	0.29	0.44
Nickel n = 23	Fvalue(df)	4.37(1, 5)	0.05(1, 5)	0.32(1, 5)	0.01(1, 5)	1.71(1, 5)	1(1, 5)	0.01(1, 5)
	p-value	0.09	0.84	0.60	0.91	0.25	0.36	0.91
Lead n = 53	Fvalue(df)	1.68(1, 22)	0.21(1, 22)	0.2(1, 21)	1.77(1, 22)	0.38(1, 22)	1.27(1, 22)	0.16(1, 22)
	p-value	0.21	0.65	0.66	0.20	0.54	0.27	0.69
Zinc n = 106	Fvalue(df)	0.31(1, 68)	2.3(1, 68)	0.19(1, 65)	3.93(1, 68)	0.53(1, 68)	0.56(1, 68)	1.59(1, 68)
	p-value	0.58	0.13	0.67	0.05	0.47	0.46	0.21
Cadmium n = 18	Fvalue(df)	0.05(1, 1)	0.93(1, 1)	0.02(1, 1)	No normal	34.73(1, 1)	97.33(1, 1)	0.23(1, 1)
	p-value	0.86	0.51	0.91		0.11	0.06	0.72

Note: ROMs = Reactive oxygene metabolites; GSSG = oxidised glutathione; GSH = free glutathione GShtot = glutathione total; GPx = glutathione peroxidase; RTL = Relative telomere length (copy telomere/copy control gene ratio).

la Casa-Resino et al., 2015; Espín et al., 2014a; Stauffer et al., 2017). For example, in wild griffon vulture (*Gyps fulvus*), a blood concentration higher than 0.15 ppm of Pb leads to an inhibition of GPx activity (Espín et al., 2014a). In the same way, the blood GSH concentration of white stork nestlings living in a TME-polluted area (in blood, 21  $\mu$ g/L of As and 0.103  $\mu$ g/L of Pb respectively) is 3.9 times higher than birds living in non-polluted areas (De la Casa-Resino et al., 2015). In great tits females, high concentration of As and Pb in feces is correlated with GPx inhibition, but not with GSH and GShtot (Stauffer et al., 2017) whereas in pied flycatcher females (*Ficedula hypoleuca*) As and Pb in feces is positively correlated with GSH and GShtot concentration. (Berglund et al., 2007). However, other studies show no significant effect of TME-exposition on GPx or GShtot (Berglund et al., 2007, 2014; Koivula et al., 2011). For example, pied flycatcher nestlings living in TME-polluted areas present higher catalase, glutathione reductase and glutathione-S-transferase activity than birds in non-polluted areas but no significant differences in GPx and GShtot was observed between the two areas (Berglund et al., 2007). GSH and GPx activity are a strong marker of oxidative stress linked to TME exposure (Koivula and Eeva, 2010), but the antioxidant mechanism against TME exposure seems to be different between species (Berglund et al., 2011; Espín et al., 2016b; Rainio et al., 2013; Stauffer et al., 2017). It is possible that other biomarkers, such as superoxide dismutase activity or catalase activity, would have been more impacted by exposure to TME. The time-dependent increase of GShtot and GPx in our study was associated with a time-dependent

decrease of ROM. This result could be an answer to physiological stress due to frequent manipulation of birds during the experiment. The stress linked to the manipulation could lead to the increase of ROM, which in turn, have led to the production of GShtot to neutralize them.

There was no significant correlation between ROM and TME concentration in tissue. If telomere length attrition is linked to ROS production, ROS has no visible impacts on lipid and protein damages nor glutathione metabolism. Several studies have shown that TME exposure leads to an increase in oxidative damage including lipid peroxidation (Espín et al., 2014a; Kurhalyuk et al., 2009; Prasanthi et al., 2010; Stauffer et al., 2017) but it also seems to depend on the species. For example, lipid peroxidation is measured in blood (at concentrations higher than 0.15 ppm of Pb) in the griffon vulture (Espín et al., 2014a) but not in white storks (De la Casa-Resino et al., 2015). Moreover, some studies show that the correlative negative effects of TME-polluted environments on wild birds could be linked to other factors such as food availability or food quality (Eeva et al., 2005, 2003; Koivula et al., 2011). A decrease of carotenoid content in prey is detected in polluted sites (Koivula et al., 2011). Oxidative stress in great tit chicks is related to the prey quality but not to TME-concentration exposure. In the present study, the absence of a significant effect on glutathione metabolism may be the result of the use of dietary antioxidant such as carotenoids by birds. Animals were in a protected laboratory environment with *ad libitum* food of high quality (except for Ca in two groups of birds). They have no physiological and ecological constraint and can

allocate more resources to overcome TME and their consequences.

Limited As and Pb concentrations in blood in Ca-supplemented birds could also explain the absence of effects caused by the TME cocktail on physiological parameters, especially on telomere length. Ca bioavailability indirectly protects against the toxicity of TME by preventing their accumulation. Moreover, a Ca supplementation can enhance the antioxidant capacity of birds, as has been shown experimentally in wild great tits (Sánchez-Virosta et al., 2019). The increase of these essential TME in feathers in the case of Ca supplementation could also explain the higher telomere length. The essential TME could thus protect the organism against the harmful effects of non-essential TME. Previous studies have shown the beneficial effects of Zn supplementation on oxidative stress and accumulation of non-essential TME in the brain (Goyer, 1997; Kucuk, 2008; Prasanthi et al., 2010). In addition, mice exposed to 2000 ppm of Pb showed less lipid peroxidation and radical formation with supplementation of 200 ppm of Zn (Prasanthi et al., 2010).

#### 4. Conclusion

The aim of this study was to experimentally evaluate the effects of a TME cocktail, representative of urban exposure, on the concentration of these TME in the blood and feathers, and on the physiology of a passerine bird. The second aim was to test the role of the availability of Ca on the effects of this cocktail. There are numerous factors in urban areas, which can influence the physiology of birds. In the wild, it is difficult to tease apart the effect of each pollutant. Laboratory experiments are crucial to understand the impact of each category of pollutant, but it should be representative of natural phenomenon. Our results suggest that chronic exposure to a TME cocktail at low concentrations, representative of minimal exposure in a medium-size city, could have a deleterious effect on physiological parameters of birds. Exposure to TME seems to lead to an increase of telomere attrition and therefore could reduce the longevity of birds. Low effect of TME cocktail on the measured oxidative status biomarker suggests that TME concentrations are potentially too low to activate the glutathione metabolism pathway, or that birds can compensate with other antioxidants, such as dietary antioxidants. Ca bioavailability seems to be important to fight against the harmful effects of TME exposure, in limiting the accumulation of non-essential metals and metalloids promoting the accumulation of essential metals. Future studies should be conducted to decrypt the effects of TME on telomere length and longevity in urban birds, notably the effect of early-life exposure. In laboratory, TME cocktail exposure during reproduction or combined with food limitation could provide a more realistic simulation of natural conditions at certain moments in the life cycle. In addition, it seems to be essential to take into account Ca bioavailability when studying the consequences of exposure to TME.

#### CRedit authorship contribution statement

**Agnès Saulnier:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Writing - original draft. **Josefa Bleu:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Resources, Writing - review & editing, Supervision. **Anne Boos:** Methodology, Investigation, Resources, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Islah El Masoudi:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Pascale Ronot:** Methodology, Investigation, Writing - review & editing. **Sandrine Zahn:** Methodology, Resources, Writing - review & editing. **Mirella Del Nero:** Resources, Writing - review & editing, Funding acquisition. **Sylvie Massemin:** Conceptualization, Methodology, Investigation, Formal analysis, Resources, Writing - review & editing, Supervision, Funding acquisition.

#### Acknowledgements

We thank A. Hranitzky, M-L Rizzi and H. Gachot for their help with animal care and F. Criscuolo for his help during physiological parameters analyses. A. Saulnier was supported by a Ph. D grant from the French Ministry of Research.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110357>.

#### Funding

This work was supported by funding of the national interdisciplinary program EC2CO/ECODYN (2017-2018) of Institut National des Sciences de l'Univers, Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) and the project 'Ecodynamic of heavy metals in environment' of the master project 'RN in the environment' of Institut National de Physique Nucléaire et de Physique des Particules (IN2P3, CNRS).

In each model, bird ID was the random factor. 'n' corresponds to the number of observations for each metal. The exposure time was T0, 29 and 57 for physiological parameters and T0, 29, 14, 43 and 57 for body mass.

#### References

- Baos, R., Jovani, R., Pastor, N., Tella, J.L., Jiménez, B., Gómez, G., González, M.J., Hiraldo, F., 2006. Evaluation of genotoxic effects of heavy metals and arsenic in wild nestling white storks (*Ciconia ciconia*) and black kites (*Mibvus migrans*) from Southwestern Spain after a mining accident. *Environ. Toxicol. Chem.* 25, 2794–2803. <https://doi.org/10.1897/05-570R.1>.
- Bel'skii, E.A., Bezel, V.S., Lyakhov, A.G., 1995. Characteristics of the reproductive indices of birds nesting in tree hollows under conditions of technogenic pollution. *Russ. J. Ecol.* 26, 126–131.
- Berglund, Å.M.M., Koivula, M.J., Eeva, T., 2011. Species- and age-related variation in metal exposure and accumulation of two passerine bird species. *Environ. Pollut.* 159, 2368–2374. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2011.07.001>.
- Berglund, Å.M.M., Sturve, J., Förlin, L., Nyholm, N.E.I., 2007. Oxidative stress in pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings from metal contaminated environments in northern Sweden. *Environ. Res.* 105, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.06.002>.
- Berglund, Å.M.M.M., Rainio, M.J., Kanerva, M., Nikinmaa, M., Eeva, T., 2014. Antioxidant status in relation to age, condition, reproductive performance and pollution in three passerine species. *J. Avian Biol.* 45, 235–246. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2013.00126.x>.
- Boonekamp, J.J., Bauch, C., Mulder, E., Verhulst, S., 2017. Does oxidative stress shorten telomeres? *Biol. Lett.* 13, 20170164. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2017.0164>.
- Chatelain, M., Gasparini, J., Frantz, A., 2016a. Do trace metals select for darker birds in urban areas? An experimental exposure to lead and zinc. *Global Change Biol.* 22, 2380–2391. <https://doi.org/10.1111/gcb.13170>.
- Chatelain, M., Gasparini, J., Haussy, C., Frantz, A., 2016b. Trace metals affect early maternal transfer of immune components in the feral pigeon. *Physiol. Biochem. Zool.* 89, 206–212. <https://doi.org/10.1086/685511>.
- Criscuolo, F., Bize, P., Nasir, L., Metcalfe, N.B., Foote, C.G., Griffiths, K., Gault, E.A., Monaghan, P., 2009. Real-time quantitative PCR assay for measurement of avian telomeres. *J. Avian Biol.* 40, 342–347. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2008.04623.x>.
- Damron, B.L., Flunker, L.K., 1995. Calcium supplementation of hen drinking water. *Poultry Sci.* 74, 784–787. <https://doi.org/10.3382/ps.0740784>.
- Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., Pinxten, R., Eens, M., 1999. Are eggshells and egg contents of great and blue tits suitable as indicators of heavy metal pollution? *Belg. J. Zool.* 129, 439–447.
- Dauwe, T., Janssens, E., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2005. Heavy-metal concentrations in female laying great tits (*Parus major*) and their clutches. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 49, 249–256. <https://doi.org/10.1007/s00244-003-0209-z>.
- Dauwe, T., Janssens, E., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2004. Relationships between metal concentrations in great tit nestlings and their environment and food. *Environ. Pollut.* 131, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.03.009>.
- Dauwe, T., Snoeijls, T., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2006. Calcium availability influences lead accumulation in a passerine bird. *Anim. Biol. Leiden* 56, 289–298. <https://doi.org/10.1163/157075606778441822>.
- De la Casa-Resino, I., Hernández-Moreno, D., Castellano, A., Soler Rodríguez, F., Pérez-López, M., 2015. Biomarkers of oxidative status associated with metal pollution in the blood of the white stork (*Ciconia ciconia*) in Spain. *Toxicol. Environ. Chem.* 97, 588–598. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1051484>.
- Duffus, J.H., 2002. "Heavy metals" - a meaningless term? (IUPAC technical report). *Pure Appl. Chem.* 74, 793–807. <https://doi.org/10.1351/pac200274050793>.
- Eeva, T., Hasselquist, D., Langefors, Å., Tummeleht, L., Nikinmaa, M., Ilmonen, P., 2005. Pollution related effects on immune function and stress in a free-living population of

- ped flycatcher *Ficedula hypoleuca*. *J. Avian Biol.* 36, 405–412. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.03449.x>.
- Eeva, T., Lehtikoinen, E., 2004. Rich calcium availability diminishes heavy metal toxicity in Pied Flycatcher. *Funct. Ecol.* 18, 548–553. <https://doi.org/10.1111/j.0269-8463.2004.00875.x>.
- Eeva, T., Lehtikoinen, E., Nikinmaa, M., 2003. Pollution-induced nutritional stress in birds: an experimental study of direct and indirect effects. *Ecol. Appl.* 13, 1242–1249. <https://doi.org/10.1890/01-5375>.
- Ek, K.H., Morrison, G.M., Lindberg, P., Rauch, S., 2004. Comparative tissue distribution of metals in birds in Sweden using ICP-MS and laser ablation ICP-MS. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 47, 259–269. <https://doi.org/10.1007/s00244-004-3138-6>.
- Epel, E.S., Blackburn, E.H., Lin, J., Dhabhar, F.S., Adler, N.E., Morrow, J.D., Cawthon, R.M., 2004. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. Unit. States Am.* 101, 17312–17315. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407162101>.
- Espín, S., García-Fernández, A.J., Herzke, D., Shore, R.F., van Hattum, B., Martínez-López, E., Coeurdassier, M., Eulaers, I., Fritsch, C., Gómez-Ramírez, P., Jaspers, V.L.B., Krone, O., Duke, G., Helander, B., Mateo, R., Movalli, P., Sonne, C., van den Brink, N.W., 2016a. Tracking pan-continental trends in environmental contamination using sentinel raptors—what types of samples should we use? *Ecotoxicology* 25, 777–801. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1636-8>.
- Espín, S., Martínez-López, E., Jiménez, P., María-Mojica, P., García-Fernández, A.J., 2016b. Interspecific differences in the antioxidant capacity of two Laridae species exposed to metals. *Environ. Res.* 147, 115–124. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.01.029>.
- Espín, S., Martínez-López, E., Jiménez, P., María-Mojica, P., García-Fernández, A.J., 2014a. Effects of heavy metals on biomarkers for oxidative stress in Griffon vulture (*Gyps fulvus*). *Environ. Res.* 129, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.11.008>.
- Espín, S., Martínez-López, E., León-Ortega, M., Martínez, J.E., García-Fernández, A.J., 2014b. Oxidative stress biomarkers in Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*) in three different scenarios of heavy metal exposure. *Environ. Res.* 131, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.015>.
- Espín, S., Ruiz, S., Sánchez-Virosta, P., Eeva, T., 2016c. Effects of calcium supplementation on growth and biochemistry in two passerine species breeding in a Ca-poor and metal-polluted area. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 9809–9821. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6219-y>.
- Espín, S., Ruiz, S., Sánchez-Virosta, P., Lilley, T., Eeva, T., 2017. Oxidative status in relation to metal pollution and calcium availability in pied flycatcher nestlings – a calcium manipulation experiment. *Environ. Pollut.* 229, 448–458. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.094>.
- Farag, M.R., Alagawany, M., Abd El-Hack, M.E., El-Sayed, S.A.A., Ahmed, S.Y.A., Samak, D.H., 2018. Yucca schidigera extract modulates the lead-induced oxidative damage, nephropathy and altered inflammatory response and glucose homeostasis in Japanese quails. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 156, 311–321. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.03.010>.
- Fraga, C.G., 2005. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol. Aspect. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.mam.2005.07.013>.
- Frantz, A., Pottier, M.A., Karimi, B., Corbel, H., Aubry, E., Haussy, C., Gasparini, J., Castrec-Rouelle, M., 2012. Contrasting levels of heavy metals in the feathers of urban pigeons from close habitats suggest limited movements at a restricted scale. *Environ. Pollut.* 168, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2012.04.003>.
- Goyer, R.A., 1997. Toxic and essential metal interactions. *Annu. Rev. Nutr.* 17, 37–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.37>.
- Hahn, C., Evans, G., 2017. Absorption of trace metals in the zinc-deficient rat. *Am. J. Physiol. Content* 228, 1020–1023. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1975.228.4.1020>.
- Helsel, D.R., 2011. *Statistics for Censored Environmental Data Using Minitab® and R*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9781118162729>.
- Isaksson, C., 2010. Pollution and its impact on wild animals: a meta-analysis on oxidative stress. *EcoHealth* 7, 342–350. <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0345-7>.
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdiscipl. Toxicol.* <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>.
- Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *Br. Med. Bull.* 68, 167–182. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>.
- Koivula, M.J., Eeva, T., 2010. Metal-related oxidative stress in birds. *Environ. Pollut.* <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.03.013>.
- Koivula, M.J., Kanerva, M., Salminen, J.-P., Nikinmaa, M., Eeva, T., 2011. Metal pollution indirectly increases oxidative stress in great tit (*Parus major*) nestlings. *Environ. Res.* 111, 362–370. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2011.01.005>.
- Komjarova, I., Blust, R., 2009. Effect of Na, Ca and pH on simultaneous uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the water flea *Daphnia magna* measured using stable isotopes. *Aquat. Toxicol.* 94, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.018>.
- Kucuk, O., 2008. Zinc in a combination with magnesium helps reducing negative effects of heat stress in quails. *Biol. Trace Elem. Res.* 123, 144–153. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-8083-6>.
- Kurhalyuk, N., Hetmański, T., Antonowicz, J., Tkachenko, H., 2009. Oxidative stress and protein oxidation affected by toxic metals in feral pigeons (*Columba livia*) from northern Poland. *Balt. Coast. Zo.* 187–197. <https://doi.org/10.1002/ana.410360714>.
- Leonard, S.S., Harris, G.K., Shi, X., 2004. Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic. Biol. Med.* <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2004.09.010>.
- Levander, O.A., 1978. Metabolic interactions between metals and metalloids. *Environ. Health Perspect.* 25, 77–80.
- Lodeni, M., Solonen, T., 2013. The use of feathers of birds of prey as indicators of metal pollution. *Ecotoxicology* 22, 1319–1334. <https://doi.org/10.1007/s10646-013-1128-z>.
- Lucia, M., Andre, J.M., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Gontier, K., Maury-Brachet, R., Davail, S., 2009. Impact of cadmium on aquatic bird *Cairina moschata*. *Biometals* 22, 843–853. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9232-5>.
- Mora, M.A., 2003. Heavy metals and metalloids in egg contents and eggshells of passerine birds from Arizona. *Environ. Pollut.* 125, 393–400. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(03\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(03)00108-8).
- Poulin, R.G., Brigham, R.M., 2001. Effects of supplemental calcium on the growth rate of an insectivorous bird, the purple martin (*Progne subis*). *Ecoscience* 8, 151–156. <https://doi.org/10.1080/11956860.2001.11682640>.
- Prasanthi, R.P.J., Devi, C.B., Basha, D.C., Reddy, N.S., Reddy, G.R., 2010. Calcium and zinc supplementation protects lead (Pb)-induced perturbations in antioxidant enzymes and lipid peroxidation in developing mouse brain. *Int. J. Dev. Neurosci.* 28, 161–167. <https://doi.org/10.1016/j.ijdevneu.2009.12.002>.
- R Development Core Team, 2016. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria.
- Rainio, M.J., Eeva, T., Lilley, T., Stauffer, J., Ruuskanen, S., 2015. Effects of early-life lead exposure on oxidative status and phagocytosis activity in great tits (*Parus major*). *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 167, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.08.004>.
- Rainio, M.J., Kanerva, M., Salminen, J.P., Nikinmaa, M., Eeva, T., 2013. Oxidative status in nestlings of three small passerine species exposed to metal pollution. *Sci. Total Environ.* 454 (455), 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.033>.
- Salmón, P., Nilsson, J.F., Watson, H., Bensch, S., Isaksson, C., 2017. Selective disappearance of great tits with short telomeres in urban areas. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 284. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1349>.
- Sánchez-Virosta, P., Espín, S., Ruiz, S., Salminen, J.P., García-Fernández, A.J., Eeva, T., 2018. Experimental manipulation of dietary arsenic levels in great tit nestlings: accumulation pattern and effects on growth, survival and plasma biochemistry. *Environ. Pollut.* 233, 764–773. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.113>.
- Sánchez-Virosta, P., Espín, S., Ruiz, S., Stauffer, J., Kanerva, M., García-Fernández, A.J., Eeva, T., 2019. Effects of calcium supplementation on oxidative status and oxidative damage in great tit nestlings inhabiting a metal-polluted area. *Environ. Res.* 484–492. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.01.047>.
- Scheuhammer, A.M., 1996. Influence of reduced dietary calcium on the accumulation and effects of lead, cadmium, and aluminum in birds. *Environ. Pollut.* 94, 337–343. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00084-X).
- Scheuhammer, A.M., 1991. Effects of acidification on the availability of toxic metals and calcium to wild birds and mammals. *Environ. Pollut.* 71, 329–375. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(91\)90036-V](https://doi.org/10.1016/0269-7491(91)90036-V).
- Six, K.M., Goyer, R.A., 1970. Experimental enhancement of lead toxicity by low dietary calcium. *J. Lab. Clin. Med.* 76, 933–942. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:002214370902301>.
- Snoeijs, T., Dauwe, T., Pinxten, R., Darras, V.M., Arckens, L., Eens, M., 2005. The combined effect of lead exposure and high or low dietary calcium on health and immunocompetence in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Environ. Pollut.* 134, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.07.009>.
- Srivastava, D., Subramanian, R.B., Madamwar, D., Flora, S.J.S., 2010. Protective effects of selenium, calcium, and magnesium against arsenic-induced oxidative stress in male rats. *Arh. Hig. Rada. Toksikol.* 61, 153–159. <https://doi.org/10.2478/10004-1254-61-2010-1993>.
- Stankevičiūtė, M., Sauliūtė, G., Makaras, T., Markuckas, A., Virbickas, T., Baršienė, J., 2018. Responses of biomarkers in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following exposure to environmentally relevant concentrations of complex metal mixture (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd). Part II. *Ecotoxicology* 27, 1069–1086. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1960-2>.
- Stauffer, J., Panda, B., Eeva, T., Rainio, M., Ilmonen, P., 2017. Telomere damage and redox status alterations in free-living passerines exposed to metals. *Sci. Total Environ.* 575, 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.131>.
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.* [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H).
- Tully, T.N., Lawton, J.M., Dorrestein, G.M., 2000. *Handbook of Avian Medicine*. In: *Handbook of Avian Medicine*, second ed. Elsevier/Saunders. <https://doi.org/10.1016/B978-0-7506-3598-1.50012-6>.
- Wah Chu, K., Chow, K.L., 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquat. Toxicol.* 61, 53–64. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00017-6).
- Wang, J., Wang, T., Burken, J.G., Chusuei, C.C., Ban, H., Ladwig, K., Huang, C.P., 2008. Adsorption of arsenic(V) onto fly ash: a speciation-based approach. *Chemosphere* 72, 381–388. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.02.045>.
- Yenice, E., Mizrak, C., Gültekin, M., Atik, Z., Tunca, M., 2015. Effects of dietary organic or inorganic manganese, zinc, copper and chrome supplementation on the performance, egg quality and hatching characteristics of laying breeder hens. *Ankara Univ. Vet. Fak. Derg.* 62, 63–68.
- Zann, R., 1996. *Zebra Finch: a Synthesis of Field and Laboratory Studies*. Zebra Finch: A Synthesis of Field and Laboratory Studies. Oxford University Press.
- Zhu, Y., Wang, J., Bai, Y., Zhang, R., 2004. Cadmium, Chromium, and Copper induce polychromatocyte micronuclei in carp (*Cyprinus carpio* L.). *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 72, 78–86. <https://doi.org/10.1007/s00128-003-0243-6>.
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Saveliev, A.A., Smith, G.M., 2009. *Mixed Effects Models and Extension in Ecology with R*, first ed. Springer <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.

## Chapitre 3.2

---

### Evaluation des conséquences de différents cocktails de métaux sur la physiologie des oiseaux

Agnès Saulnier, Sylvie Massemin, Astolfo Mata, Anne Boos, Islah El Masoudi, Pascale Ronot, Sandrine Zahn & Josefa Bleu

*En préparation*

#### Contexte et objectifs de l'expérience :

En milieu urbain, les activités anthropiques entraînent l'émission de cocktails de polluants, dont des métaux et des métalloïdes, en concentrations variables selon le degré d'urbanisation. Plusieurs études ont montré que les concentrations de métaux dans l'environnement et dans les tissus des oiseaux sont souvent corrélées à une altération de la santé, telles qu'un stress oxydatif plus élevé, une attrition des télomères ou des déficiences immunitaires (Koivula and Eeva, 2010). Lors d'une précédente expérience sur le diamant mandarin (Chapitre 3.1), nous avons également mis en évidence des télomères plus courts chez les individus présentant de plus fortes concentrations en ETM non essentiels dans les plumes, mais aucune différence n'a été mise en évidence pour le statut oxydatif des individus. Les effets physiologiques et morphologiques des polluants dépendent des niveaux de stress auquel l'individu est confronté (Espín et al., 2014a; Meillère et al., 2016). L'objectif de cette étude était donc d'évaluer la toxicité relative de cocktails d'ETM représentatifs de villes plus ou moins polluées sur la santé des oiseaux. Le but était de mieux comprendre les patrons de réponses physiologiques des individus exposés à des concentrations croissantes d'ETM, notamment d'ETM non essentiels. Pour mesurer l'impact de ces cocktails de polluants sur l'état de santé des oiseaux, nous avons utilisé une multitude de paramètres physiologiques, morphologiques et locomoteurs pour déterminer les biomarqueurs les plus pertinents pour ce type de pollution. Pour les marqueurs morphologiques, nous avons mesuré la condition corporelle des individus comme proxy de ses réserves nutritionnelles, mais également la couleur du bec qui peut être un proxy des réserves en caroténoïdes (McGraw et al., 2003). Pour les marqueurs physiologiques, nous avons mesuré la concentration en ROM, représentative des dégâts oxydatifs, l'expression de la métallothionéine, une protéine riche en cystéine qui a un rôle important dans le transport et l'élimination des métaux et des ROS (Koivula and Eeva, 2010), et le métabolisme de repos des oiseaux. Enfin, nous avons mesuré l'impact des cocktails sur les performances de vol des individus. Nous nous attendions à observer une accumulation croissante en ETM non essentiels dans les plumes, dépendante de la concentration d'ETM dans les cocktails auxquels les diamants sont exposés. De la même manière, nous nous attendions à voir un effet négatif de nos traitements, notamment à une concentration moyenne ou haute, sur la physiologie des oiseaux, avec une augmentation du métabolisme, plus de dégâts oxydatifs et une surexpression de la métallothionéine. Nous nous attendions également à observer une diminution de la performance de vol chez les oiseaux exposés aux cocktails en

concentration les plus élevée et un changement de couleur du bec lié à la modification du statut oxydatif.

## Matériel et méthode :

### 1. Procédure expérimentale

Quarante-huit diamants mandarins mâles ont été répartis de manière aléatoire dans des cages  $150 \times 70 \times 100 \text{ cm}^3$  à raison de 6 individus par cage. Certains oiseaux étant de lignées différentes et leur âge étant compris entre 2 et 3 ans, nous avons fait en sorte qu'ils soient répartis de manière équilibrée dans l'ensemble des cages. L'homogénéité de taille et de masse a été contrôlée entre chaque cage. Ces cages étaient maintenues dans une pièce avec une luminosité réglée sur un cycle de 14h de lumière pour 10h d'obscurité, une hygrométrie de 60% ainsi qu'une température oscillant entre  $23^\circ\text{C}$  en journée et  $18^\circ\text{C}$  la nuit. Durant toute l'expérience les oiseaux ont été nourris ad libitum avec un mélange de graines adaptées à l'espèce (Tropical finches Prestige Versele laga©). Ils ont également été supplémentés avec du sable minéral afin d'assurer un apport en calcium suffisant pour les oiseaux et les quantités consommées ont été estimées par pesées tous les deux jours pour comparer la consommation entre les cages (ANOVA,  $p > 0,05$ ). Les oiseaux ont été placés dans ces conditions 1 mois avant le début de l'expérience pour adapter les oiseaux à leur nouvel environnement. Durant cette période, les oiseaux ont été abreuvés avec de l'eau Montcalm, une eau minérale faiblement minéralisée qui a également servi pendant l'expérience pour la préparation des traitements.

Les 48 diamants mandarins testés ont été assignés à quatre groupes expérimentaux (soit 2 cages par traitement) dont les traitements en métaux ont été administrés via l'eau de boisson pendant 60 jours : 1) un groupe contrôle (Contrôle), 2) un groupe exposé à un cocktail d'ETM de faible concentration (LowETM) : [Pb (1 ppm), Cd (0.1 ppm), As (0,5 ppm), Ni (0.5 ppm), Zn (100 ppm), Cu (24 ppm)] , 3) un groupe à concentration moyenne (MidETM) : [Pb (5 ppm), Cd (0.5 ppm), As (2,5 ppm), Ni (0.5 ppm), Zn (100 ppm), Cu (24 ppm)] et 4) un groupe à forte concentration (HighETM) : [Pb (10 ppm), Cd (1 ppm), As (5 ppm), Ni (0.5 ppm), Zn (100 ppm), Cu (24 ppm)]. Ces résultats sont basés sur les concentrations utilisées dans l'expérience précédente (manuscrit 3). Les biberons contenant les traitements étaient renouvelés tous les 2-3 jours pour s'assurer du maintien des bonnes concentrations des ETM dans le cocktail et les volumes consommés par cage ont été contrôlés pour s'assurer de l'homogénéité entre les traitements. Excepté pour le groupe Contrôle, pour lequel la consommation d'eau était plus importante, aucune différence n'a été observée entre les traitements LowETM, MidETM et HighETM.

Pour chacun des oiseaux, la taille globale a été estimée grâce à 3 mesures : la longueur de l'aile mesurée avec un réglet ( $\pm 0,5 \text{ mm}$ ), la distance tête bec ( $\pm 0,1 \text{ mm}$ ) et la longueur du tibiotarse ( $\pm 0,1 \text{ mm}$ ) mesurées avec un pied à coulisse. Au début (T0) et à la fin de l'expérience (T60), chaque oiseau a été pesé avec une balance de précision ( $\pm 0,1 \text{ g}$ ). Un échantillon de sang ( $100\mu\text{L}$ ) ainsi que la 4<sup>ème</sup> plume primaire droite ont également été collectés au même moment. Lors de la première expérience, malgré une période préventive de 15 jours à l'eau minérale avant le début du traitement, les plumes à temps 0 contenaient des traces de métaux provenant d'une exposition antérieure durant la mue. Pour éviter ce problème, lors de la seconde expérience, les

plumes sélectionnées ont été prélevées au début de la période d'acclimatation d'un mois. Les plumes prélevées ont immédiatement été congelées à  $-20^{\circ}\text{C}$  jusqu'à analyse. L'échantillon de sang prélevé a immédiatement été séparé dans 2 tubes distincts : un tube contenant  $10\mu\text{L}$  de sang qui a immédiatement été plongé dans l'azote puis stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour les analyses d'expression génique et un tube contenant  $90\mu\text{L}$  de sang qui a été centrifugé pour séparer les érythrocytes du plasma congelés séparément à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour les analyses de stress oxydant.

## 2. Paramètres mesurés

- Concentration en ETM dans les plumes :

La concentration des ETM dans les plumes a été mesurée grâce à des techniques d'ICP-MS (As, Cd, Cu, Pb et Ni) et d'ICP-AES (Zn), selon la procédure présentée dans le manuscrit 3. Sur les six métaux du cocktail, seul 4 ont pu être exploités (As, Cu, Pb et Zn). En effet, les concentrations en Cd détectées dans les plumes étaient très faibles et sous les seuils de quantification des échantillons. De la même manière, suite à une contamination lors de la minéralisation des échantillons, les concentrations en Ni obtenues étaient aberrantes.

- Test de vol :

Les performances de vol vertical des individus ont été utilisées pour évaluer l'impact des ETM sur la locomotion des individus. Le test de vol a été réalisé à T0 et à T60 pour chaque individu. Deux semaines avant le début du traitement, un essai a été réalisé dans les mêmes conditions que les mesures expérimentales afin d'habituer les oiseaux à l'appareil. Les tests de vol ont été réalisés dans un grand tube en plexiglas d'1m20 de hauteur et de 50 cm de diamètre présentant un perchoir à sa base et à son sommet. Les oiseaux testés étaient placés sur le perchoir en bas de ce tube et encouragés à s'envoler par un mouvement vif de la main jusqu'au perchoir du haut où ils étaient recapturés. Chaque oiseau a été testé 5 fois avec une pause de 30 secondes entre chaque essai. L'ensemble des tests a été filmé par une caméra haute résolution (Sony Handycam HD, 120 fps). Les vidéos ont ensuite été analysées sur ordinateur pour déterminer la vitesse de vol sur une distance de 40 cm entre deux marques située à une hauteur de 40 et 80 cm. Pour un essai donné, les différentes coordonnées de l'oiseau sur l'axe vertical entre ces deux marques ont été identifiées grâce au logiciel Regressi puis la vitesse a été calculée comme la pente de la droite représentant les coordonnées verticales des oiseaux au cours du temps grâce au logiciel Régavi. La valeur de vitesse retenue pour chaque oiseau correspond à la vitesse la plus rapide atteinte au cours des 5 essais pour tenir compte des oiseaux les plus stressés qui faisaient beaucoup d'aller-retour dans le système.

- Mesures physiologiques :
  - Mesure des ROMs

A partir des échantillons de plasma, des mesures de dégâts oxydatifs ont été effectuées en utilisant le kit d-ROM (Diacron, Italy) selon le protocole détaillé dans le manuscrit 3. Pour rappel, ce kit permet de doser les ROM qui sont le produit de l'attaque des ERO sur différentes macromolécules (protéines, lipides, acides nucléiques, acides aminés). Le coefficient moyen de

variation intra-individuel était de  $2,82 \pm 2,18$  % et le coefficient moyen de variation inter-essai était de  $4,94 \pm 2,49$  %.

- Mesure de l'expression génique de MT2

À partir de l'échantillon de sang total, nous avons extrait les ARN en utilisant du TRI Reagent RT-Blood, un réactif conçu spécialement pour isoler de manière spécifique les ARN (MRC, Ohio) suivant le protocole du fournisseur. D'après les spécifications du fournisseur, l'ARN ainsi obtenu est exempt de toute contamination par de l'ADN. Afin de vérifier ce point et de déterminer les concentrations résiduelles en ADN dans les échantillons, nous avons réalisé une étude préliminaire de comparaison (N=10) avec ou sans traitement à la DNase (enzyme classiquement utilisée pour éliminer l'ADN) à l'aide d'un kit TURBO DNA free™ (Invitrogen©). Les concentrations en ADN mesurées étant largement inférieures aux concentrations des ARN mesurées (entre 10 et 30 fois plus faible), ce traitement à la DNase n'est donc pas nécessaire et a donc été abandonné par la suite pour maximiser les concentrations d'ARN obtenues dans les échantillons. Après extraction, la qualité et la concentration des ARN extraits ont été mesurées en utilisant un Nanodrop 1000 (Thermo scientific©), un spectromètre à microvolume. Les ADNc simples brins ont ensuite été synthétisés par reverse transcription en utilisant le kit PrimeScript RT (Takara©) à partir de 500ng d'ARN purifié. L'expression génique de l'isoforme MT2 a ensuite été mesurée par une analyse en qPCR sur plaque 384 puits grâce à des amorces interexonique spécifiques au diamant mandarin. L'expression génique de la GAPDH, invariant entre les individus, a été utilisée comme contrôle interne. Les séquences des amorces utilisées pour le gène MT2 étaient MT2-F et MT2-R (Zahn S. pers. Com). Les séquences des amorces utilisées pour le gène de la GAPDH étaient GAPDH-F et GAPDH-R (Zahn S. pers. Com). La dilution finale des amorces dans le mix de réaction était de 5  $\mu$ M pour MT2 et 5  $\mu$ M pour la GAPDH. La réaction d'amplification était réalisée pour un volume final de 10  $\mu$ L avec 5 ng d'ADNc (2 $\mu$ L) par puit et 8 $\mu$ L d'un mix de réaction contenant une polymérase GoTaq® qPCR (Promega, Madison, USA). L'efficacité moyenne d'amplification pour MT2 et pour la GAPDH était respectivement de 100,6 % et 99,5 %. La variation intra-individuelle moyenne du Cq (nombre de cycles nécessaires pour détecter l'ADN amplifié au-dessus du signal basal) était de 1,42 % et 0,62 % pour MT2 et pour la GAPDH respectivement. L'évolution de l'expression de la MT2 entre T0 et T60 a ensuite été calculée comme le ratio entre l'expression relative de MT2 par rapport à la GAPDH à T60 et T0 selon la formule suivante :  $\text{ratio} = \frac{[(E_{\text{MT2}})^{\Delta Cq_{\text{MT2}}(T0-T60)}]}{[(E_{\text{GAPDH}})^{\Delta Cq_{\text{GAPDH}}(T0-T60)}]}$ , où E représente l'efficacité de réaction.

- Mesure du métabolisme de repos (RMR) et du quotient respiratoire (QR)

La consommation d'oxygène ( $\text{VO}_2$  exprimée en  $\text{mL O}_2 \text{ h}^{-1}$ ) et la production de  $\text{CO}_2$  ( $\text{VCO}_2 \text{ mL CO}_2 \text{ h}^{-1}$ ) de nos individus ont été mesurées avant et après traitement en utilisant un système de calorimétrie indirecte en circuit ouvert (Sable System, USA). Pour réaliser ces mesures, chaque individu a été placé individuellement dans une chambre calorimétrique, dans une petite cage (15x12x12cm) pour restreindre le plus possible leurs mouvements. L'ensemble des mesures ont été réalisées à l'obscurité à une température ambiante de 27°C sur des oiseaux mis à jeun au moins 1h avant le début de la mesure pour limiter le plus possible les dépenses énergétiques associées à la digestion et à la thermorégulation. L'humidité de la pièce a également été contrôlée

pour corriger nos calculs d'échanges gazeux par la pression de H<sub>2</sub>O. Pour chaque oiseau, les échanges gazeux ont été mesurés en continue pendant 3 périodes de 4 min séparées de 12 minutes chacune. Le métabolisme de repos a été défini comme la plus faible VO<sub>2</sub> mesurée au cours de ces 3 périodes. Cette VO<sub>2</sub> a été corrigée par la masse des individus pour contrôler les effets de la masse sur le métabolisme. Le métabolisme de repos est donc exprimé en mL O<sub>2</sub> h<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>. Le quotient respiratoire (QR) a été calculé comme le ratio entre VCO<sub>2</sub> et VO<sub>2</sub> pour la période où VO<sub>2</sub> observée a été la plus faible.

- Mesure de la couleur du bec :

La couleur du bec des oiseaux a été mesurée en utilisant un spectromètre miniature (FLAME, Ocean Insight) permettant de mesurer la réflectance de la lumière par le bec. La mesure a été réalisée en éclairant la surface du bec par une source de lumière au xénon à 90°C au contact direct du bec et en mesurant la quantité de lumière réfléchiée par la surface (réflectance). Trois mesures ont été réalisées pour chaque individu. La répétabilité de ces mesures était en moyenne de 85%. La couleur du bec a été estimée à travers trois paramètres distincts : la teinte, la saturation et la brillance de la couleur pour un domaine de longueur d'onde compris entre 450 et 700 nm, qui correspond aux longueurs d'onde d'absorbances des caroténoïdes et des phéomélanines qui sont les pigments responsables de la couleur orange-rouge du bec. La teinte du bec a été calculée comme étant la longueur d'onde au point d'inflexion de la courbe de réflectance de la lumière entre 450 et 700 nm. La saturation du bec a été calculée comme le rapport de la différence entre la réflectance maximale et la réflectance minimale divisé par la réflectance moyenne entre 450 et 700 nm. Enfin, la brillance a été calculée comme étant la moyenne de la réflectance observée entre 450 et 700 nm.

### 3. Analyses statistiques

Concernant les concentrations d'ETM dans les plumes, pour le Cu et le Zn dont les concentrations mesurées étaient toutes au-dessus de la LOD, des modèles linéaires mixte ont été réalisés avec l'identifiant des oiseaux en variable aléatoire pour tenir compte des mesures répétées, suivi d'ANOVA de type III. En revanche pour le Pb et l'As, le jeu de données contenant des données censurées (i.e des valeurs sous la LOD, pour Pb 8% des données totales et pour As 100% à T0 et 48% à T60), nous avons utilisé des modèles statistiques (fonction Cendiff pour As et Cenanova pour le Pb, package NADA2) capable d'inclure les données censurées dans nos analyses selon une méthode décrite dans (Helsel, 2011) (Voir aussi Manuscrit 4 pour plus de détails). Pour l'As, l'ensemble des données à T0 étant sous les LOD, ce test n'a été réalisé que pour les données à T60. Pour déterminer les différences entre les traitements et au cours du temps, des tests de Tukey ont été réalisés en test post-Hoc. Pour déterminer les effets des traitements sur la physiologie, la morphologie et les performances de vol des oiseaux, des modèles linéaires mixtes et des ANOVA de type III ont été réalisés avec l'identifiant des oiseaux, leur lignée d'origine et leur année de naissance en variables aléatoires. Chaque modèle incluait l'interaction entre le temps et le traitement en variable explicative. Pour les performances de vol, les modèles incluait également la condition corporelle et l'indice taille des individus en covariables pour

distinguer les effets des traitements des effets propres à la morphologie des oiseaux. Le modèle pour les ROM incluait aussi la condition corporelle comme proxy des réserves lipidiques des oiseaux.

## Résultats

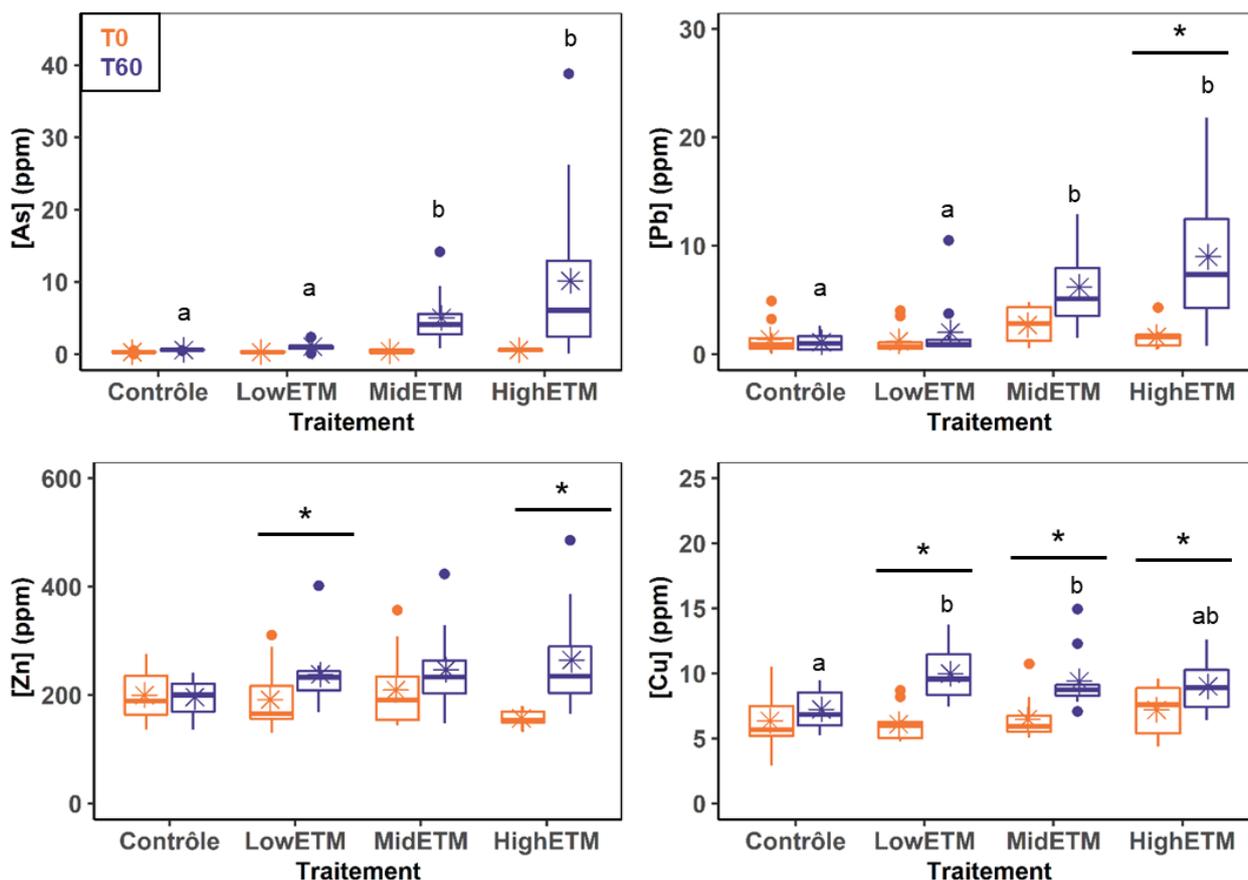
### 1. Accumulations des ETM dans les plumes des oiseaux

**Table 1-** Effets des traitements au cours du temps sur les concentrations d'ETM des diamants mandarins

Variable	As		Pb		Cu		Zn	
	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p	$\chi^2$	p
Traitement	31,57	<0,001			2686,79	<0,001	19678,9	<0,001
Temps					4,29	0,04	0,0002	0,98
Traitement:Temps			59,48	<0,001	11,31	0,012	12,25	0,007

Note : L'effet des cocktails sur la concentration d'As a été testé seulement à T60, les valeurs à T0 étant <LOD, les concentrations d'As et de Pb ont été testés avec des Wilcoxon généralisés incluant les valeurs sous LOD dans les analyses. Les concentrations en Cu et en Zn ont été testés avec des modèles linéaires mixtes avec l'identifiant en aléatoire. Voir méthodes pour plus de détails.

Une interaction significative entre le Traitement et le temps a été observée pour chacun des ETM étudiés (Table 1, Figure 1). Au T0, aucune différence de concentration en Pb, en Cu et en Zn n'a été détectée dans les plumes des individus entre les traitements (Tukey,  $p > 0,05$ ) (ceci n'a pas été calculé pour l'As puisque les concentrations étaient toutes sous la LOD). Tout d'abord, en ce qui concerne les métaux essentiels, aucune différence de concentration en Zn à T60 n'est également observée entre les groupes (Tukey,  $p > 0,07$ ). Les concentrations sont significativement plus élevées à T60 qu'à T0 pour les traitements « Low ETM » et « High ETM », (Tukey,  $p_{\text{lowETM}} = 0,02$  et  $p_{\text{highETM}} < 0,001$ ). La concentration en Cu a augmenté dans les plumes de chacun des groupes ayant reçu un cocktail d'ETM (Low, Mid et High) entre T0 et T60 (Tukey,  $p_{\text{T0-T60}} < 0,03$ ). Les concentrations à T60 en Cu pour les groupes traités avec les traitements « Low ETM » et « Mid ETM » étaient significativement supérieures à celles mesurées pour le groupe « Contrôle » (Tukey,  $p < 0,02$ ), contrairement au groupe traité avec le cocktail « High ETM » dont les concentrations mesurées n'étaient significativement différentes d'aucun autre groupe (Tukey,  $p > 0,09$ ).



**Figure 1-** Concentration en ETM dans les plumes en fonction des traitements et du temps. Les astérisques représentent la moyenne pour chaque groupe. Des lettres différentes représentent des différences entre les groupes pour un temps donné tandis que les barres représentent les différences au cours du temps pour un même groupe.

En ce qui concerne les ETM non essentiels, les concentrations moyennes à T60 en As et en Pb pour les traitements « Mid ETM » et « High ETM » étaient significativement plus élevées que celles des groupes ayant reçu les traitements « Contrôle » (Tukey,  $p < 0,001$  pour l'As et le Pb) et « Low ETM » à T60 (Tukey,  $p < 0,04$  et  $p < 0,008$  pour l'As et le Pb respectivement). Il y a une différence entre T0 et T60 pour le Pb pour le groupé traité avec le cocktail « HighETM » ( $p < 0,009$ ).

## 2. Conséquences des ETM sur la physiologie, la morphologie et les performances de vol des oiseaux

**Table 2** – Effets des traitements au cours du temps sur les paramètres physiologiques et morphologiques des oiseaux

Variables	Condition corporelle		ROM (log)		MT expression	
	F (ddl)	p	F (ddl)	p	F (ddl)	p
Traitement	15,65 (3, 47)	<b>0,004</b>	25,92 (3, 47)	<b>&lt;0,001</b>	2,42 (3, 47)	0,239
Temps	0,65 (1, 47)	0,423	6,48 (1, 47)	<b>0,001</b>		
Traitement:Temps	0,55 (3, 47)	0,652	0,09 (3, 47)	0,768		
Condition corporelle			4,03 (1, 47)	<b>0,013</b>		
Indice taille						

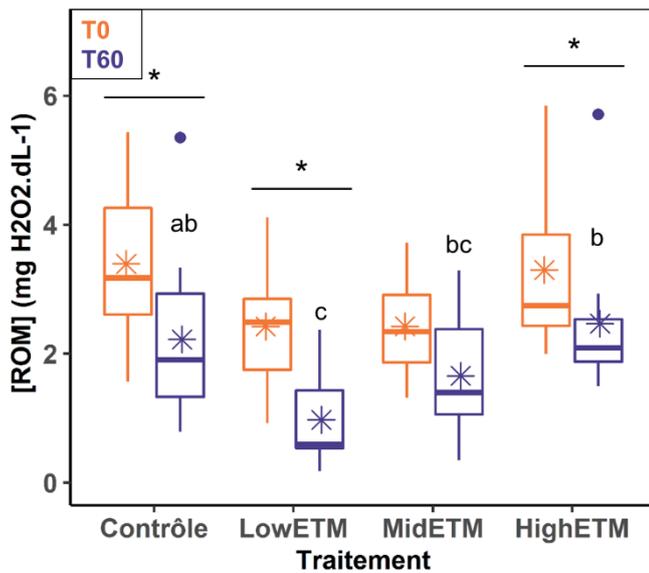
Variables	Teinte bec		Saturation bec		Brillance bec	
	F (ddl)	p	F (ddl)	p	F (ddl)	p
Traitement	2388,33 (3, 47)	<b>&lt;0,001</b>	50,53 (3, 47)	<b>&lt;0,001</b>	39,05 (3, 47)	<b>0,004</b>
Temps	0,01 (1, 47)	0,908	1,49 (1, 47)	0,229	0,1 (1, 47)	0,75
Traitement:Temps	0,46 (3, 47)	0,711	0,6 (3, 47)	0,619	0,83 (3, 47)	0,485
Condition corporelle						
Indice taille						

Variables	RMR (log)		QR		Perf. Vol	
	F (ddl)	p	F (ddl)	p	F (ddl)	p
Traitement	50,35 (3, 47)	<b>&lt;0,001</b>	22,36 (3, 47)	0,476	33,46 (3, 47)	<b>0,005</b>
Temps	2,76 (1, 47)	0,104	0,06 (1, 47)	0,803	1,56 (1, 47)	0,218
Traitement:Temps	0,57 (3, 47)	0,638	0,77 (3, 47)	0,518	2,39 (3, 47)	0,083
condition corporelle					5,84 (1, 47)	<b>0,019</b>
Indice taille					1,18 (1, 47)	0,373

Note : L'effet des cocktails sur les paramètres physiologiques ont été testés avec des modèles linéaires mixtes avec l'identifiant, la lignée et l'année de naissance des oiseaux en variables aléatoire. Voir méthodes pour plus de détails.

Parmi l'ensemble des paramètres mesurés, seul les dégâts oxydatifs (ROM) présentaient une interaction significative entre le temps et le traitement (Table 2, Figure 2). En effet, on constate une diminution des dommages oxydatifs entre T0 et T60 pour les groupes « High ETM » et « Low ETM ». A T0, aucune différence n'a été observée entre les traitements (Tukey,  $p > 0.52$ ). A T60, les seules différences détectées concernaient la concentration en ROM pour le groupe traité avec le cocktail « LowETM » qui était significativement inférieure à celle observée pour le groupe traité avec le cocktail « High ETM » et le groupe « Contrôle ».



**Figure 2-** Concentration plasmatiques en métabolites réactifs de l'oxygène (ROM) en fonction des traitements et du temps. Des lettres différentes représentent des différences entre les groupes pour un temps donné tandis que les barres représentent les différences au cours du temps pour un même groupe.

Un effet significatif du traitement a également été mis en évidence pour les paramètres de couleur du bec (Brillance, Teinte et Saturation), le RMR, la condition corporelle et les performances de vol, mais les tests post-hoc n'ont révélé aucune différence significative entre les groupes (Table 3, Tukey,  $p > 0,35$ ,  $p > 0,13$ ,  $p > 0,30$  pour la brillance, la teinte et la saturation respectivement, ainsi que  $p > 0,35$ ,  $p > 0,23$  et  $p > 0,15$  pour les performances de vol, la condition corporelle et le RMR). Enfin, une corrélation négative a été mise en évidence entre les performances de vol et la condition corporelle des individus (Table 2).

**Table 3-** Valeurs des paramètres physiologiques étudiés pour chacun des groupes au cours du temps

	Temps 0				Temps 60			
	Contrôle	Low ETM	Mid ETM	High ETM	Contrôle	Low ETM	Mid ETM	High ETM
	Moy. (SD)	Moy. (SD)	Moy. (SD)	Moy. (SD)	Moy. (SD)	Moy. (SD)	Moy. (SD)	Moy. (SD)
Condition corp.	0,76 (0,88)	-0,13 (0,84)	0,02 (0,93)	-0,31 (0,94)	0,5 (0,88)	0,14 (0,84)	0,11 (0,93)	-0,07 (0,94)
ROM	3,33 (0,68)	2,45 (0,66)	2,43 (0,76)	3,35 (0,77)	3,25 (0,69)	0,97 (0,65)	1,66 (0,76)	3,23 (0,76)
RMR	5,11 (0,36)	4,57 (0,35)	4,89 (0,39)	4,73 (0,39)	5,61 (0,36)	5,33 (0,35)	5,81 (0,39)	5,75 (0,39)
QR	0,64 (0,02)	0,65 (0,02)	0,63 (0,02)	0,64 (0,02)	0,65 (0,02)	0,65 (0,02)	0,64 (0,02)	0,61 (0,02)
Perf. de vol	2,15 (0,11)	2,19 (0,12)	1,91 (0,13)	1,89 (0,13)	2,04 (0,11)	2,07 (0,11)	2,05 (0,13)	1,95 (0,13)
Saturation bec	1,88 (0,13)	1,76 (0,13)	1,72 (0,14)	1,65 (0,14)	1,83 (0,13)	1,84 (0,13)	1,82 (0,14)	1,78 (0,14)
Brillance bec	13,75 (4,21)	15,55 (3,39)	14,18 (4,94)	15,82 (4,54)	14,18 (2,2)	13,16 (2,26)	13,27 (2,59)	14,09 (3,01)
Teinte bec	588 (2,1)	584 (2,12)	583 (2,22)	584 (2,25)	588 (2,12)	586 (2,14)	584 (2,22)	586 (2,36)
MT expression	...	...	...	...	0,77 (0,44)	1,03 (0,63)	1,71 (1,46)	1,58 (1,68)

Note : condition corporelle (sans unité), ROM : métabolite réactif de l'oxygène ( $\text{mgH}_2\text{O}_2 \cdot \text{dL}^{-1}$ ), RMR : métabolisme de repos ( $\text{mL O}_2 \text{ h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ ), QR : quotient respiratoire (sans unité), MT expression : expression relative de la metallothionéine par rapport à T0 (sans unité). Brillance (%moyen de lumière réfléchi), Saturation (sans unité), Teinte ( $\lambda\text{nm}$ )

## Discussion

Le but de cette étude était de tester les effets de cocktails d'ETM dont les concentrations étaient représentatives de villes plus ou moins polluées, sur l'accumulation de ces ETM dans les plumes et sur la physiologie et la performance des oiseaux.

L'exposition chronique à nos cocktails d'ETM (concentrations croissantes des ETM non essentiels et concentration stable des ETM essentiels) a entraîné une accumulation d'ETM dans les plumes des individus exposés. Pour l'As et le Pb, on observe une augmentation significative pour les groupes ayant reçu les cocktails les plus concentrés (MidETM et HighETM) à T60, leur concentration augmentant avec les concentrations dans les cocktails. Les concentrations d'ETM essentiels étant invariantes d'un traitement à l'autre, on observe très peu de différences d'accumulation dans les plumes entre les groupes traités à T60. On observe également très peu de différence avec le groupe contrôle n'ayant reçu aucun ETM, notamment pour le Zn. Les ETM essentiels étant indispensables aux processus biologiques, leur concentration dans l'organisme est strictement régulée et il est possible que ce résultat reflète simplement les mécanismes d'homéostasie pour cet élément.

De manière générale, aucune différence marquée n'a été observée pour les paramètres physiologiques et morphologiques testés. Seules les concentrations en ROM semblaient varier de manière différente entre les traitements au cours du temps. Le fait d'observer plus de dégâts oxydatifs pour le groupe « HighETM » à T60 que pour le groupe « LowETM » peut laisser supposer d'un effet toxique d'une exposition aux ETM à forte concentration. Néanmoins, il est difficile de conclure avec certitude, car d'une part, la concentration de ROM du groupe « HighETM » à T60 est significativement inférieure à la valeur mesurée à T0 et d'autre part elle n'est pas différente de celle observée pour le groupe contrôle à T60 qui présente également une concentration élevée en ROM. Bien que les oiseaux aient été acclimatés à leur nouvel environnement pendant plus d'un mois avant le début de l'expérience, de fortes concentrations en ROM à T0 peuvent être liées au dérangement causé par le stress associé à la capture des oiseaux pour les tests de vol et de la mesure du métabolisme même si le protocole s'est déroulé de manière identique à T0 et T60. Une concentration en ROM plus faible en fin d'expérience peut alors témoigner d'une certaine habitude des oiseaux à notre présence. N'ayant vu aucun autre effet significatif des traitements sur l'état de santé des oiseaux, il est également possible que les cocktails administrés constituent en réalité une contrainte mineure pour les individus, notamment à cause de la présence de Zn et de Cu qui peuvent limiter l'accumulation et la toxicité des ETM non essentiels. Le Zn et le Cu ont un rôle important dans les mécanismes de réparation et de détoxification de la cellule. Ils contribuent par exemple à stimuler l'expression de certains gènes et des mécanismes de réparations de l'ADN et sont essentiels à l'activité de nombreuses métalloprotéines dont une enzyme antioxydante essentielle, la SOD, qui nécessite la présence de Zn et Cu au niveau du site catalytique pour la dismutation du  $^{\circ}O_2^-$  (Wani et al., 2021). L'augmentation des capacités antioxydantes par la supplémentation en Zn et en Cu peut effectivement expliquer les plus faibles concentrations en ROM à T60. Cette hypothèse peut également expliquer l'absence de variations de la couleur du bec des diamants avec l'exposition aux traitements. En effet, même pour une exposition à 1 ppm de Pb (donc une concentration

similaire à LowETM) durant la croissance, le bec de diamants mâles présentait une plus grande brillance et une saturation plus faible de la couleur dans une autre étude (Goodchild et al., 2021) ce qui peut signifier une teneur plus faible en caroténoïdes (Alonso-Alvarez et al., 2004; McGraw et al., 2003). Même hors période de croissance, ces changements de couleur peuvent survenir en moins d'un mois chez des individus adultes de la même espèce soumis à un challenge immunitaire (Alonso-Alvarez et al. 2004). L'absence de différence peut signifier que les capacités antioxydantes des individus étaient suffisantes pour lutter contre les effets du traitement et qu'ils n'aient pas besoin de puiser dans leurs ressources en caroténoïdes. Nous aurions peut-être observé un effet plus significatif chez des juvéniles, ceux-ci devant faire face à un compromis entre l'énergie allouée à la croissance et le maintien somatique (Reichert, 2013). De la même manière, alors que le Pb, le Cd et le Ni sont connus pour causer des troubles neurologiques et locomoteurs chez les vertébrés (Das et al., 2008; Järup, 2003; Neal and Guilarte, 2013), nous attendions également à observer une diminution des performances de vol chez les oiseaux. Or, aucune différence n'a été constatée. Comme la couleur du bec, il est possible que pour ce paramètre, les effets soient plus marqués lors d'une exposition pendant la croissance, le Pb et l'As étant connu pour impacter négativement la croissance des individus (Eeva and Lehikoinen, 1996b; Sánchez-Virosta et al., 2018) et potentiellement le développement et la maturité des muscles de vol (Reichert et al., 2015).

Les cocktails d'ETM n'ont eu aucun effet visible sur le métabolisme (RMR et QR) des oiseaux. Une exposition aux ETM est susceptible d'engendrer de nombreux dysfonctionnements cellulaires pouvant avoir des répercussions sur le métabolisme des individus comme des dysfonctionnements endocriniens (Rana 2014) ou un découplage de la chaîne de transport mitochondrial en charge de la production d'ATP (Belyaeva et al., 2012) susceptible d'entraîner une augmentation des coûts énergétiques associés à la détoxification de ces métaux (Koivula and Eeva, 2010; Waisberg et al., 2003). Mais le lien entre la régulation du métabolisme et l'exposition aux ETM est encore mal connu (Baos et al., 2006). De plus, une étude menée en milieu naturel sur des mouettes à tête noire (*Larus ridibundus*) avait au contraire mis en évidence un RMR plus faible chez des poussins (à 3 jours et à 15 jours) élevés sur un site pollué en Cd, Pb, Cu et Zn que pour des poussins du site contrôle (Migula et al., 2000). Pour mieux comprendre le rôle de ces cocktails d'ETM sur le métabolisme, il serait intéressant de coupler ces mesures de RMR avec des mesures d'hormones comme des glucocorticoïdes (Jimeno et al., 2017; Spencer and Verhulst, 2008) ou les hormones thyroïdiennes (Welcker et al., 2013) qui sont susceptibles d'impacter ce paramètre.

Les effets protecteurs du Zn et du Cu contre les effets toxiques des ETM dans nos cocktails semblent être une hypothèse plausible pour beaucoup des paramètres testés. Mais ils n'expliquent pas l'absence de différence d'expression pour la métallothionéine 2. En effet, les MT sont des protéines riches en cystéines qui sont essentielles dans le transport des ions métalliques et leur élimination. Elles ont également un rôle clé dans la distribution et le stockage du Zn (Davis and Cousins, 2000; Vašák, 2005) et dans l'élimination du Cd (Barjaktarovic et al., 2002; Koivula and Eeva, 2010). Une exposition aux ETM essentiels ou non essentiels est très souvent associée à une augmentation de la concentration des MT dans les tissus (Koivula and Eeva, 2010; Lucia et al., 2009; Vanparys et al., 2008). Mais il convient néanmoins de prendre du recul sur ce résultat,

car l'expression des MT reste très variable entre les tissus (Blalock et al., 1988). Les études portant sur l'impact de l'exposition aux ETM sur ce marqueur sont souvent des études invasives mesurant son expression dans les organes internes des individus (Koivula and Eeva, 2010). Seule une étude a mis en évidence un lien corrélatif avec la MT dans le sang et l'exposition à un cocktail d'ETM en milieu naturel (Kim et al., 2013). Il est possible qu'il y ait eu une augmentation de l'expression de MT dans d'autres tissus comme le foie ou les reins des individus sans qu'elle n'ait été visible dans le sang. L'utilisation de la MT dans le sang comme biomarqueur reste encore très préliminaire et des études prochaines de comparaison de l'expression entre les tissus pourront nous renseigner quant à sa pertinence en tant que biomarqueur de l'exposition à un cocktail d'ETM.

## Discussion partie 2

---

En milieu urbain, la concentration des activités humaines comme la combustion d'énergie fossile, le trafic routier ou l'industrie, engendrent le relargage massif de nombreux polluants et notamment d'éléments traces métalliques. Comme leur nom l'indique ces éléments sont normalement présents à l'état de trace dans l'environnement. Or, ces métaux peuvent avoir des effets toxiques chez les organismes qui y sont exposés (Jan et al., 2015; Koivula and Eeva, 2010). Les approches en captivité sont donc primordiales pour mieux comprendre la relation causale existante entre l'exposition à ces ETMs et la santé des individus. Mais ces études sur l'effet des ETM ne sont pas réellement représentatives de l'exposition en milieu urbain : une exposition chronique à un cocktail de métaux constitué d'éléments essentiels et non essentiels à des doses subtoxiques. Le premier but de ce travail de thèse était donc de tester l'impact de cocktail d'ETM dont les concentrations étaient représentatives d'une exposition à Strasbourg (Chapitre 3.1), mais également dans des villes faiblement, moyennement et fortement polluées (Chapitre 3.2) sur différentes composantes de la santé des individus (physiologie, morphologie et performances de vol) chez le diamant mandarin. Alors qu'en milieu urbain, la nourriture peut être considérée de moins bonne qualité, nous souhaitons également tester l'importance des apports alimentaires en minéraux essentiels tels que le calcium pour lutter contre les effets de ces polluants (Chapitre 3.1). En effet, le calcium peut réduire l'accumulation et la toxicité de plusieurs métaux, mais l'acidification des sols dans les villes entraîne une diminution de la biodisponibilité de ce minéral (Scheuhammer, 1991). Ce travail de thèse a mis en évidence peu d'effets significatifs des cocktails de métaux sur les paramètres physiologiques étudiés. Dans ma première expérience (Chapitre 3.1), j'ai néanmoins mis en évidence une corrélation négative entre les concentrations en métaux non essentiels dans les plumes et la longueur des télomères de nos individus et dans la deuxième expérience (Chapitre 3.2), seuls les individus ayant reçus les cocktails à plus forte dose présentaient plus de dégâts oxydatifs à T60, mais des valeurs élevées dans le groupe contrôle rendent ce résultat difficile à interpréter. En revanche, mes résultats montrent une accumulation importante des métaux essentiels avec une supplémentation en calcium qui pourrait limiter les conséquences négatives des éléments non essentiels.

### 1. *Conséquences de l'exposition à des cocktails d'ETM représentatifs du milieu urbain*

L'étude des ETM en cocktail et non pas un métal seul permet de mettre en évidence de potentiels effets synergiques et antagonistes entre ces éléments, ce qui reflète mieux la réalité lors d'une exposition naturelle. Les résultats de ces études tendent à prouver les bénéfices d'une supplémentation en calcium qui semble faciliter l'accumulation dans les plumes de métaux essentiels tels que le Zn, le Cr et le Ni tout en inhibant celle des métaux et métalloïdes non essentiels comme le Pb ou l'As, limitant ainsi leur toxicité pour l'organisme. Mais, outre une différence de patterns d'accumulation, nous nous attendions à observer une corrélation entre l'exposition aux cocktails de métaux et les paramètres physiologiques étudiés. Or, parmi l'ensemble des marqueurs étudiés, seul un effet des ETM sur la longueur des télomères a été

observé. Ces résultats font écho à des résultats similaires obtenus en milieu naturel, à la fois en ville (Chatelain et al., 2021) et dans des sites industriels (Stauffer et al., 2017), même si en milieu urbain cette corrélation est loin d'être toujours significative (Grunst et al., 2020). D'ailleurs pour des concentrations environnementales similaires à celles auxquelles nos oiseaux ont été exposés, Chatelain et al (2021) n'ont montré aucune corrélation significative entre la longueur des télomères et les concentrations dans les plumes de poussins de mésange charbonnière. De plus, ce résultat ne peut être comparé avec d'autres études en laboratoire, car, à ma connaissance, nous sommes les seuls avoir testé le lien corrélatif entre ce paramètre et une exposition aux éléments traces métalliques en captivité (voir notamment la synthèse de Louzon et al., 2019).

En prenant en compte la littérature portant sur le sujet à la fois en milieu naturel et en captivité, nous nous attendions également à observer des résultats plus marqués des cocktails de métaux sur le statut oxydatif de nos individus, notamment pour l'expérience 2 (Chapitre 3.2) où la concentration en ETM non essentiels était augmentée. On observe effectivement des dégâts oxydatifs plus importants dans le groupe exposé à une concentration représentative d'une ville plus polluée (HighETM) par rapport à celle observée dans le groupe ayant reçu le cocktail en concentration la plus faible (LowETM), mais ce résultat est partiellement masqué par une concentration similaire en dégâts oxydatifs pour le groupe contrôle. Il est possible que ce résultat soit seulement lié à une grande variabilité interindividuelle au sein de chaque groupe. Le métabolisme du glutathion semble être un des biomarqueurs les plus pertinents dans le cadre d'une exposition à des cocktails de polluants en ville (Isaksson, 2010). Une modification de l'activité de la GPx et une augmentation du GSH ont été observées chez des oiseaux exposés à certains métaux de notre cocktail comme le Pb ou le Cd (de la Casa-Resino et al., 2015; Espín et al., 2017, 2014; Stauffer et al., 2017). Mais de manière intéressante, notre étude n'a montré aucun effet de nos cocktails sur ces paramètres (Chapitre 3.1). La régulation de la balance oxydative et les capacités antioxydantes étant variables entre les espèces (Costantini, 2008; Salmón et al., 2018), il est possible que le métabolisme du glutathion ne soit pas le marqueur le plus pertinent pour notre espèce d'étude. En prenant en compte les patterns d'accumulation observés pour le Zn, il est probable que des résultats plus marqués auraient été observés en mesurant l'activité de métalloenzymes telle que la SOD. En effet ces éléments interviennent au niveau du site catalytique de cette enzyme antioxydante et contribuent à la dismutation de l' $O_2^-$ . Or il a été montré qu'une supplémentation en Zn pouvait stimuler l'activité de cette enzyme chez l'Homme (Mariani et al., 2008) et d'autres vertébrés non humains (Jemai et al., 2007). Une augmentation de l'activité de cette enzyme peut éventuellement expliquer l'absence d'effets physiologiques marqués lors de nos expériences.

De plus, la caractérisation des concentrations de polluants dans nos sites d'étude à Strasbourg, n'a mis en évidence aucune différence significative entre le site urbain et forestier. Les concentrations mesurées dans les plumes des mésanges charbonnières sont bien inférieures à celles qui ont pu être mesurées dans d'autres villes en France chez d'autres espèces (Bichet et al., 2013). Strasbourg pourrait donc être considérée comme une ville faiblement polluée par les ETM. Ce qui pourrait expliquer que le cocktail administré lors de l'expérience 1 (Chapitre 3.1), représentatif de l'exposition à Strasbourg, sauf pour le Pb dont la concentration avait été

augmentée, n'ait eu que peu d'effets sur le statut oxydatif. Les autres études en laboratoire portant sur les métaux seuls et montrant des effets délétères sur la physiologie des individus, présentaient des concentrations plus élevées (Nain and Smits, 2011; Snoeijs et al., 2005; Suljević et al., 2020). Mais une étude chez des cailles japonaises (*Coturnix japonica*) exposées à des concentrations inférieures en Pb et en Cd (0.50ppm et 0.25ppm) pendant une durée de 20 jours, a mis en évidence une cytotoxicité de ces traitements dans les érythrocytes et les lymphocytes des individus (Suljević et al., 2020).

L'absence de résultats marquants est peut-être en partie liée aux interactions antagonistes entre les éléments essentiels et les éléments non essentiels dans le cocktail. Il est possible que les concentrations en Zn et en Cu choisies soient suffisantes pour pallier les effets délétères des éléments non essentiels, tout en étant en concentrations très faibles pour elles même générer des effets toxiques. La littérature portant sur la toxicité de ces éléments chez des volailles en captivité fait état d'effets délétères de ces ETM pour une exposition supérieure à 2000 ppm pour le Zn (Gasaway and Buss, 1972; Palafox and Ho-A, 1980) et 250 ppm pour le Cu (Hashem et al., 2021). Il serait pertinent de réitérer l'expérience 2 (Chapitre 3.2) soit en diminuant la concentration en éléments essentiels dans les cocktails, soit en dédoublant les groupes pour avoir un groupe avec et un groupe sans ETM essentiels pour chaque cocktail.

### 2. Des cocktails réellement représentatifs du milieu urbain ?

Comme discuté dans les méthodes, nous avons choisi d'utiliser la concentration dans les fèces pour établir nos cocktails, car les quantités d'ETM dans les fèces sont souvent corrélées à la concentration dans l'environnement (Bel'skii et al., 1995; Dauwe et al., 2004a, 2000; Eeva et al., 2020) et représentative de la voie orale, une voie d'exposition importante pour les métaux. Mais surtout les fèces représentent à la fois la partie non assimilée du métal dans l'alimentation et la partie qui a été assimilée et excrétée (turnover). Cependant, les coefficients d'absorption et d'excrétion sont très variables d'un élément à un autre (Amiard, 2011). Les métaux essentiels font notamment l'objet d'une régulation homéostatique au sein de l'organisme et sont facilement mobilisables et excrétables en fonction des besoins de l'organisme (Nordberg et al., 2009). La corrélation entre la concentration de ces métaux dans les fèces et celle dans les tissus des individus est d'ailleurs même souvent plus faibles que celle pour des éléments non essentiels tels que le Pb et l'As (Berglund, 2018; Eeva et al., 2020). De plus l'utilisation des concentrations dans les fèces ne reflète qu'une partie de l'exposition réelle environnementale. Cette méthode peut minimiser l'apport relatif des ETM via le transport respiratoire, surtout si ceux-ci sont faiblement excrétés et accumulés dans les tissus. Même si chez les oiseaux, l'exposition aux ETM est majoritairement associée à la nourriture, les ETM sous forme de microparticules susceptibles d'être inhalées restent un aspect non négligeable de la pollution (Klumpp et al., 2009; Pelucchi et al., 2009). Le Cd est d'ailleurs plus facilement assimilé au niveau de l'épithélium respiratoire qu'au niveau du tractus digestif (INERIS 2014). Une étude récente de Eeva et coll. (2020) sur l'utilisation des fèces de mésanges comme biomarqueur des concentrations environnementales en ETM avait pointé le fait que pour le Cd la répétabilité des concentrations mesurées au sein d'une même nichée était très basse contrairement à d'autres éléments comme l'As. En milieu

aquatique, de nombreux modèles mathématiques permettent d'estimer l'exposition et les phénomènes de bioaccumulation de chaque polluant pour les espèces aquatiques, mais la complexité des transferts de ces éléments dans les systèmes terrestres et le manque de littérature à ce sujet rendent difficile l'établissement de modèles similaires en ville (Gall et al., 2015). Enfin, le temps d'exposition à nos cocktails ne reflète pas complètement l'exposition chronique urbaine. En effets, les individus testés ont été exposés pendant deux mois, mais en milieu naturel, les concentrations mesurées dans les tissus des individus et les effets physiologiques associés peuvent être le résultat de plusieurs mois d'expositions, voire d'années en fonction de la capacité des individus à métaboliser et éliminer les polluants (Amiard, 2011).

### 3. *Les études en laboratoire, des conditions trop optimisées ?*

Les études en laboratoire offrent l'opportunité d'explorer les mécanismes d'impact des facteurs de stress en s'affranchissant d'autres paramètres pouvant être confondants. Néanmoins, les conditions de laboratoires sont très différentes de celles observées dans la nature. Le concept même des traits d'histoire de vie repose sur le fait qu'en milieu naturel les ressources sont limitées et l'environnement fluctuant. Or, les conditions de laboratoire, optimisées pour assurer le bien-être des individus masquent donc les compromis d'allocation des ressources auxquels les individus sont confrontés dans le milieu naturel. De plus, les oiseaux étant nourris *ad libitum*, le surcoût énergétique associé aux processus de détoxification a pu être compensé par une consommation supplémentaire en ressources ou une réduction de l'activité physique. Mais la qualité des ressources peut également masquer les effets potentiels des cocktails de métaux. Notre étude a mis en évidence qu'une supplémentation en calcium pouvait entraîner une accumulation plus importante dans les plumes de nos individus. Mais a contrario des carences en calcium vont stimuler la production de « calcium binding protéine » (CBP) pour augmenter son absorption via le tractus digestif. Or, ces CBP peuvent être une voie de transport empruntée par des ETM non essentiels tels que le Pb, ainsi les carences en calcium peuvent entraîner une plus grande accumulation des ETM (Goyer, 1997, 1995). Mais les mélanges de graines utilisés en laboratoire sont généralement des mélanges optimisés dans le but de couvrir l'ensemble des besoins nutritionnels d'un individu et limiter au maximum les carences. Spearkman et al (2015) pointe également le fait que ces mélanges peuvent contenir de fortes doses d'antioxydants dans le but d'assurer leur conservation, qui sont bien plus élevées que les concentrations observées dans le milieu naturel. Il est donc possible que les effets oxydatifs des TME aient été compensés par une supplémentation artificielle en antioxydants. Pour observer plus d'effets liés à ces cocktails de métaux, il conviendrait peut-être de réaliser des expériences de restriction alimentaire à la fois en termes de quantité, mais également de qualité nutritionnelle. De la même manière, le maintien constant des températures optimales a pu limiter les dépenses associées à la thermorégulation.

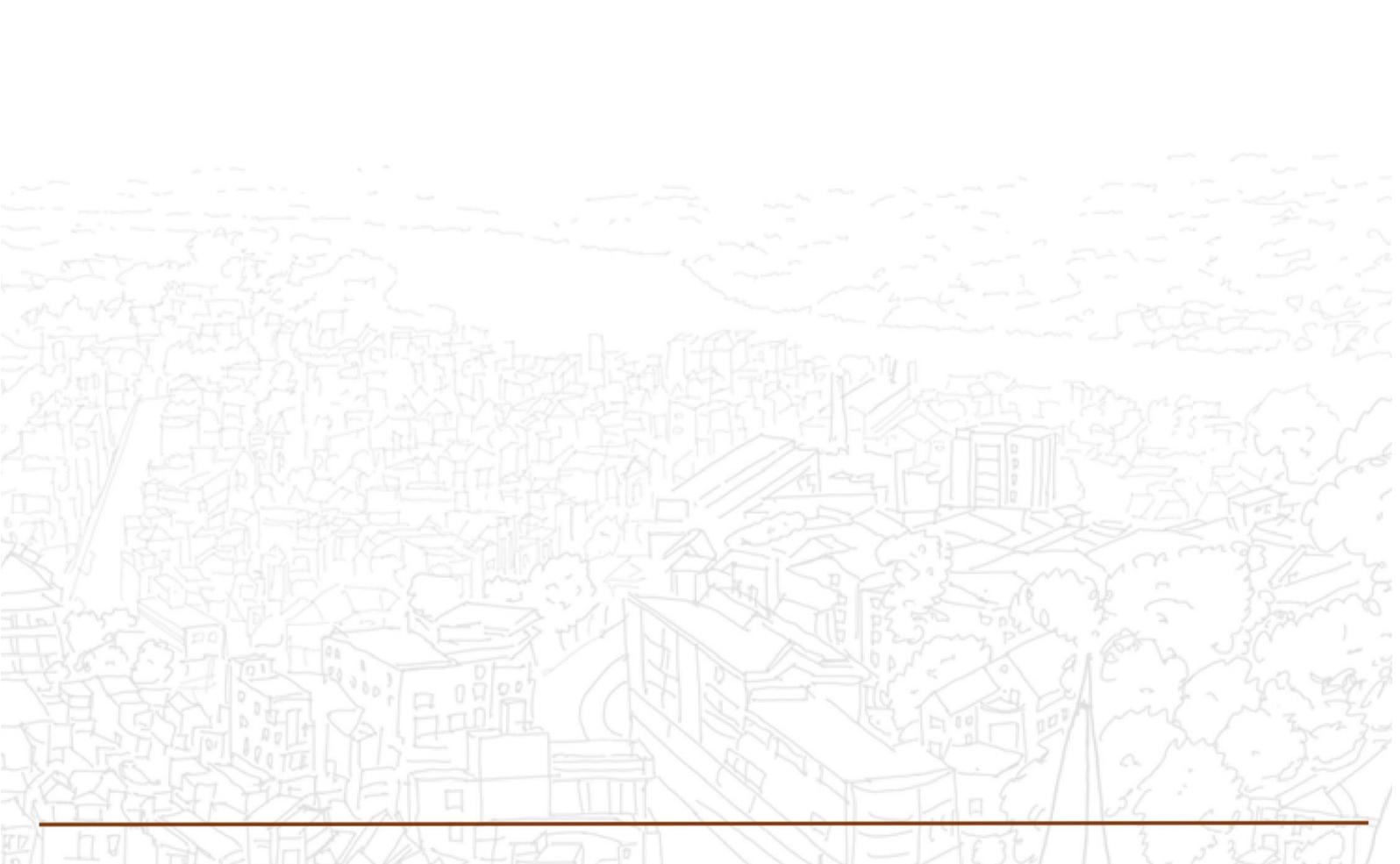
Par ailleurs, pour complètement comprendre le rôle des cocktails d'ETM sur les divergences phénotypiques observées en ville, il convient d'étudier leur influence durant la reproduction. En effet, durant les précédentes expériences, les mâles adultes hors période de reproduction pouvaient allouer l'ensemble des ressources à la maintenance somatique. Mais durant la

reproduction, cette énergie est en partie consacrée à l'investissement reproducteur et il est possible d'observer d'avantages d'effets physiologiques (Linden and Møller, 1989). D'ailleurs chez le diamant mandarin, il a été montré que la susceptibilité au stress oxydatif est plus importante pendant la reproduction (Alonso-Alvarez et al., 2004). De plus, il ne faut pas oublier que le phénotype d'un individu est dépendant de son génotype et de l'environnement dans lequel il évolue, mais il résulte également de l'impact de l'environnement dans lequel ses parents ont évolué. Ces répercussions de l'environnement parental sont qualifiées d'effets transgénérationnels. Ces effets transgénérationnels désignent l'ensemble des modifications phénotypiques de la descendance résultant de l'environnement dans lequel les parents ont vécu. L'exposition à un cocktail d'ETM avant et pendant la reproduction pourra contraindre les individus à moduler leur investissement reproducteur ce qui pourra se répercuter sur le nombre, mais surtout la qualité des jeunes. Un des mécanismes les plus connus sont les effets maternels liés à la capacité des femelles à moduler les concentrations d'hormones, d'antioxydants ou encore d'anticorps contenus dans les œufs (Chatelain et al., 2016; Krist, 2011; Ruuskanen et al., 2019). Cette modification de la qualité des œufs peut entraîner des répercussions importantes sur la croissance, la survie et l'immunité de la descendance. Face à une exposition aux ETM, trois scénarii peuvent être envisagés : 1) un effet maternel adaptatif, où la femelle maximisera la qualité des œufs pour pré-adapter les jeunes aux effets d'une exposition aux ETM, par exemple en augmentant les concentrations en ovotransferrine, une protéine détoxifiante, dans les œufs (Chatelain et al., 2016) 2) un effet maternel égoïste, où les femelles vont au contraire privilégier leur propre survie, réduisant le dépôt d'éléments nutritifs dans les œufs, voire déposant certains métaux pour se détoxifier et enfin 3) un effet maternel subit, où l'exposition au cocktail d'ETM engendre des contraintes physiologiques comme un stress oxydatif accru réduisant la capacité de la femelle à investir dans la qualité des œufs. Ce dernier scénario a d'ailleurs déjà été observé chez des mésanges charbonnières exposées aux ETM en milieu naturel (Hargitai et al., 2016). Dans une moindre mesure, les effets paternels peuvent également être considérés. Une exposition aux ETM et une modification de la balance oxydative sont susceptibles d'altérer les fonctions reproductrices des individus (Yang et al., 2020) et la quantité et la qualité des spermatozoïdes produits (Dauwe et al., 2004b; Helfenstein et al., 2010; Mora et al., 2016). Bien que ce paramètre influence surtout la fertilité des mâles et leur capacité à féconder les œufs, il peut également impacter la qualité des descendants et leur développement notamment à cause de mécanismes de sénescences de la lignée germinale (Preston et al., 2015). Il serait intéressant de tester si l'attrition des télomères observée au niveau des érythrocytes chez les mâles exposés à notre cocktail de polluant (Chapitre 3.2) est également observée au niveau de la lignée germinale en mesurant ce paramètre dans les spermatozoïdes. Il est néanmoins possible que des effets moins marqués soient observés au niveau de la lignée germinale par rapport aux érythrocytes du fait de l'activité plus importante de la télomérase, l'enzyme en charge de la réparation des télomères (Achi et al., 2000).

L'étude de l'exposition à un cocktail d'ETM pendant la reproduction offrirait également la possibilité d'élucider l'impact d'une exposition post-natale aux cocktails d'ETM sur le phénotype des poussins pendant la croissance, mais également à plus long terme. Une étude sur les jeunes permettrait notamment de mieux comprendre les mécanismes d'apparition de phénotypes

différents entre les populations en lien avec les pressions environnementales. Elle permettrait notamment de quantifier l'apparition de mécanismes épigénétiques incluant des méthylations de l'ADN, des modifications chimiques des histones et une interaction de l'ADN avec des ARN interférents, capable de modifier ou réprimer l'expression du génome sans modifier la séquence génique et responsable de la plasticité phénotypique des individus. À plus long terme, il serait également intéressant d'étudier le phénotype des descendants de ces individus et des marqueurs épigénétiques transmis à la descendance ceux-ci étant partiellement héréditaires (Guerrero-Bosagna et al., 2018).

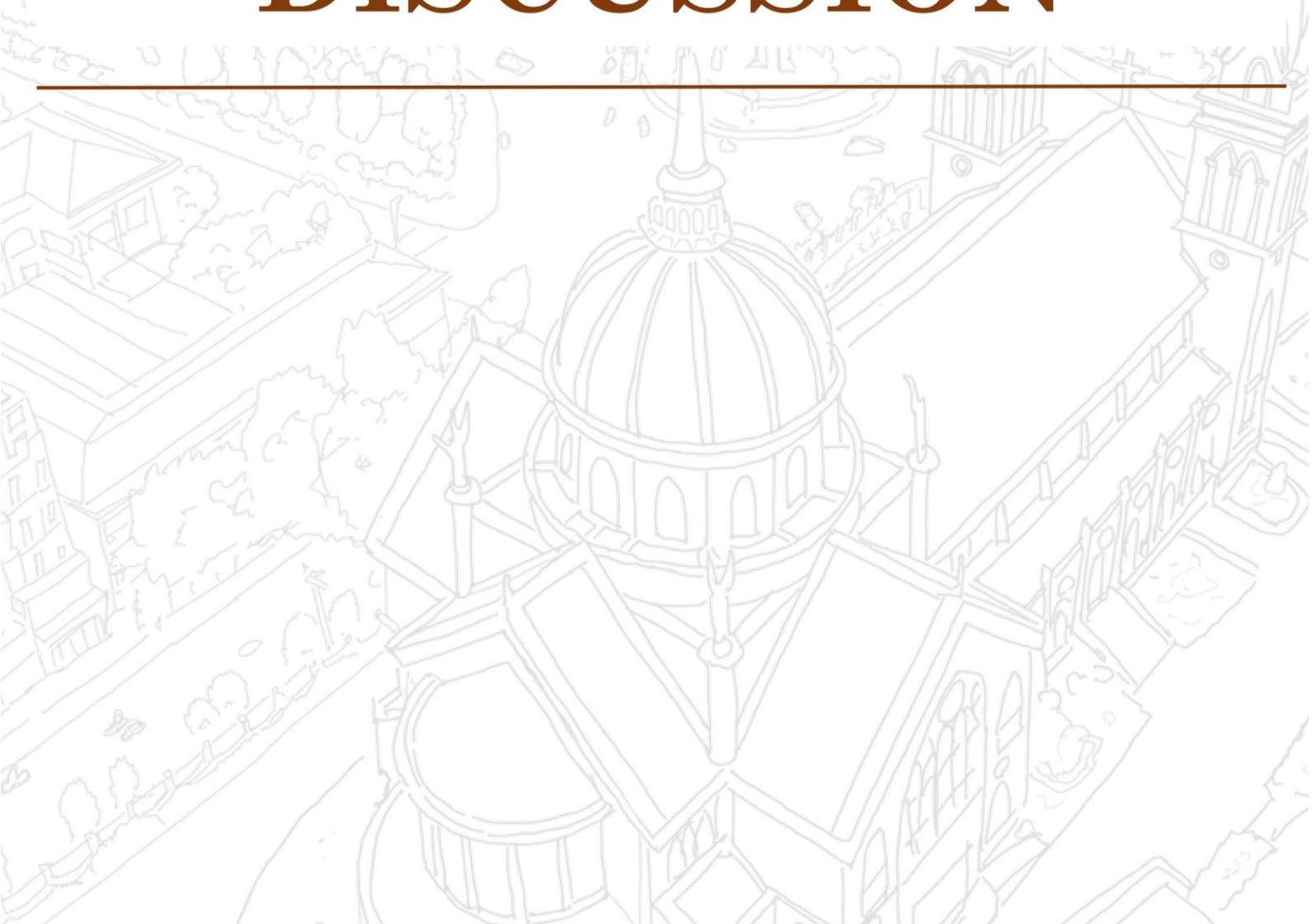
Grâce à un projet d'ARN, le projet TRAMET obtenue en 2021 par J. Bleu et al., qui découle des travaux que j'ai pu mener pendant cette thèse, les conséquences transgénérationnelles des cocktails de polluants ainsi que les mécanismes épigénétiques associés seront très prochainement testés sur les diamants mandarins en captivité. Cette ANR comprend notamment des expériences de translocation de nichée (ou « cross-fostering » en anglais) qui permettront de différencier les effets d'une exposition prénatale et post-natale aux cocktails, mais également un suivi des lignées des individus exposés sur trois générations pour évaluer les effets transgénérationnels à long terme engendrés par les cocktails.



---

# DISCUSSION

---





## Discussion générale

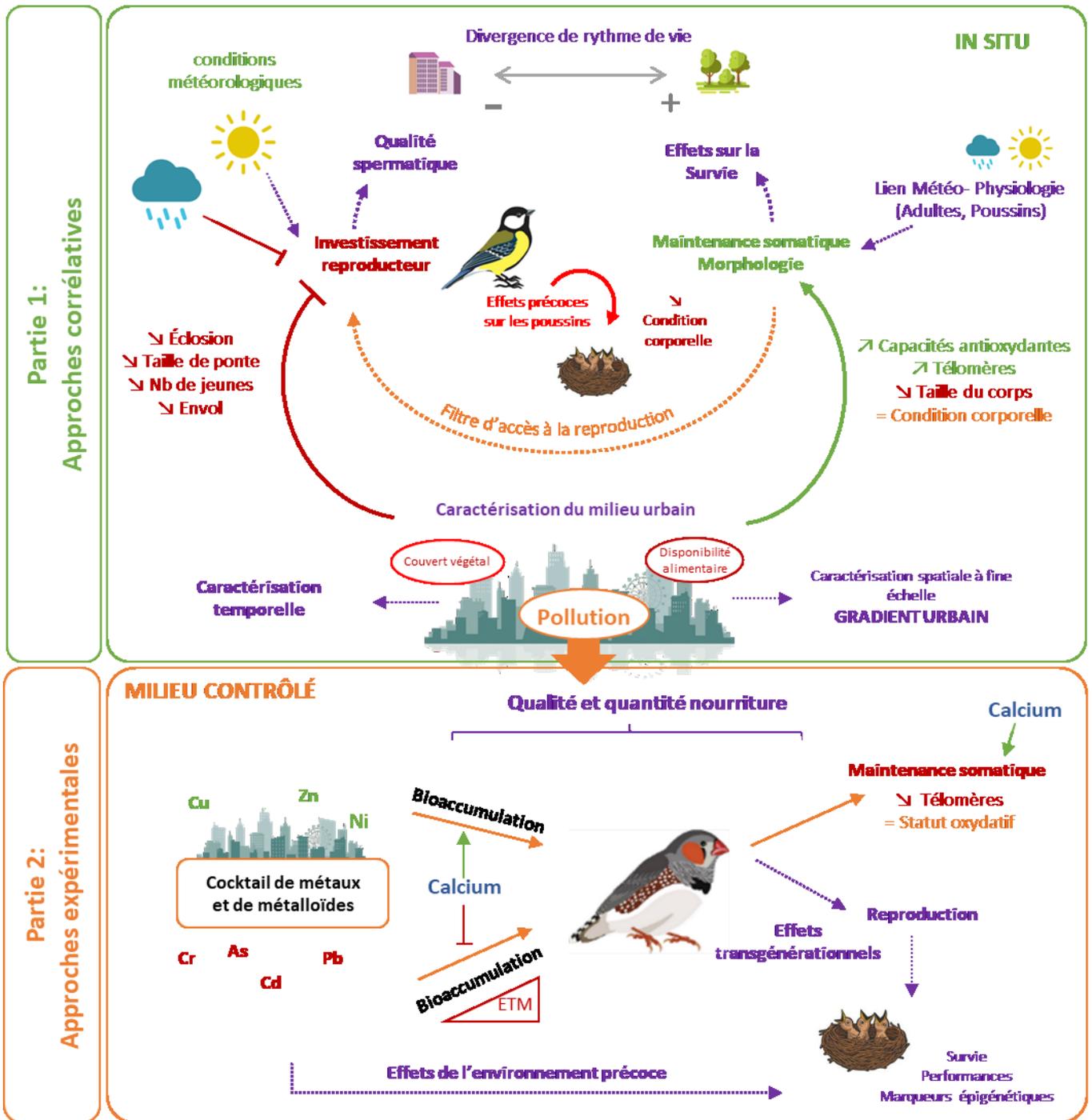
---

Le but de ce travail de thèse était de tester l'impact de l'urbanisation et des cocktails de polluants sur l'écologie et la physiologie des oiseaux. Chacune de ces approches a montré des résultats intéressants qui contribuent à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents aux différences phénotypiques observées entre les populations naturelles et urbaines (Figure récapitulative). Les approches corrélatives sur la mésange charbonnière ont notamment mis en évidence des divergences reproductives et physiologiques entre le milieu urbain et forestier qui laisse supposer de l'existence d'une divergence de rythme de vie, tandis que d'autres laissent supposer de l'existence d'un filtre urbain pour l'accès à la reproduction qui serait dépendant de la qualité des individus. Elles témoignent également de l'importance de prendre en considération le facteur temporel lors des études en écologie urbaine, les paramètres écologiques et physiologiques présentant une grande variabilité interannuelle au sein de chaque population. Plus précisément, elles témoignent de l'importance d'approfondir le rôle des fluctuations météorologiques sur la dynamique des populations urbaines. Les approches expérimentales quant à elles ont montré le rôle que pouvaient avoir des cocktails d'ETM représentatif de l'exposition urbaine sur un marqueur de longévité à travers les télomères bien que le rôle sur le statut oxydatif reste à élucider. Elles soulignent également l'importance de la disponibilité en calcium pour limiter l'accumulation en ETM non essentiels et leur toxicité.

L'utilisation conjointe des deux approches semble essentielle pour saisir l'ensemble des tenants et des aboutissants d'un sujet aussi complexe que l'impact de l'urbanisation sur les populations d'oiseaux. Chacune de ces approches offre l'opportunité d'étudier des aspects différents de cette problématique. Les approches corrélatives permettent de tenir compte de l'ensemble des variations environnementales qui sont susceptibles d'impacter l'histoire de vie des individus. Elles permettent également de tenir compte de l'hétérogénéité temporelle et spatiale de la matrice urbaine qui peut moduler l'exposition des oiseaux aux facteurs de stress. Cependant, par la même occasion, elles rendent difficile l'interprétation du lien entre des facteurs de stress environnementaux et les réactions physiologiques, notamment quand les biomarqueurs ne sont pas spécifiques d'un facteur donné et représentatifs d'une réponse intégrative globale, comme dans notre cas. Les corrélations à fine échelle et les répliques entre les villes peuvent apporter plus d'éléments de réponses qu'une étude à large échelle comme dans notre étude, mais ne permettent pas d'isoler totalement les facteurs d'intérêt (Caizergues et al., 2022). A contrario, les approches expérimentales en milieu contrôlé permettent de se focaliser sur un facteur d'intérêt comme les cocktails d'ETM, mais il est très difficile de reproduire les conditions d'exposition de l'animal à ce facteur de stress en milieu naturel (e.g. voies d'exposition) et les conditions de captivité représentent des conditions optimales qui peuvent masquer les compromis dans l'allocation des ressources et peuvent minimiser certaines réactions physiologiques. De plus, les réponses phénotypiques des populations urbaines à un facteur de stress résultent à la fois de l'héritabilité et d'une plasticité phénotypique qui peut être associée à des modifications épigénétiques liées à l'environnement. La réponse des oiseaux en laboratoire, provenant de lignées élevées en captivité, sera au contraire une réponse « naïve » n'ayant pas évolué dans le même environnement. Mais les approches expérimentales offrent

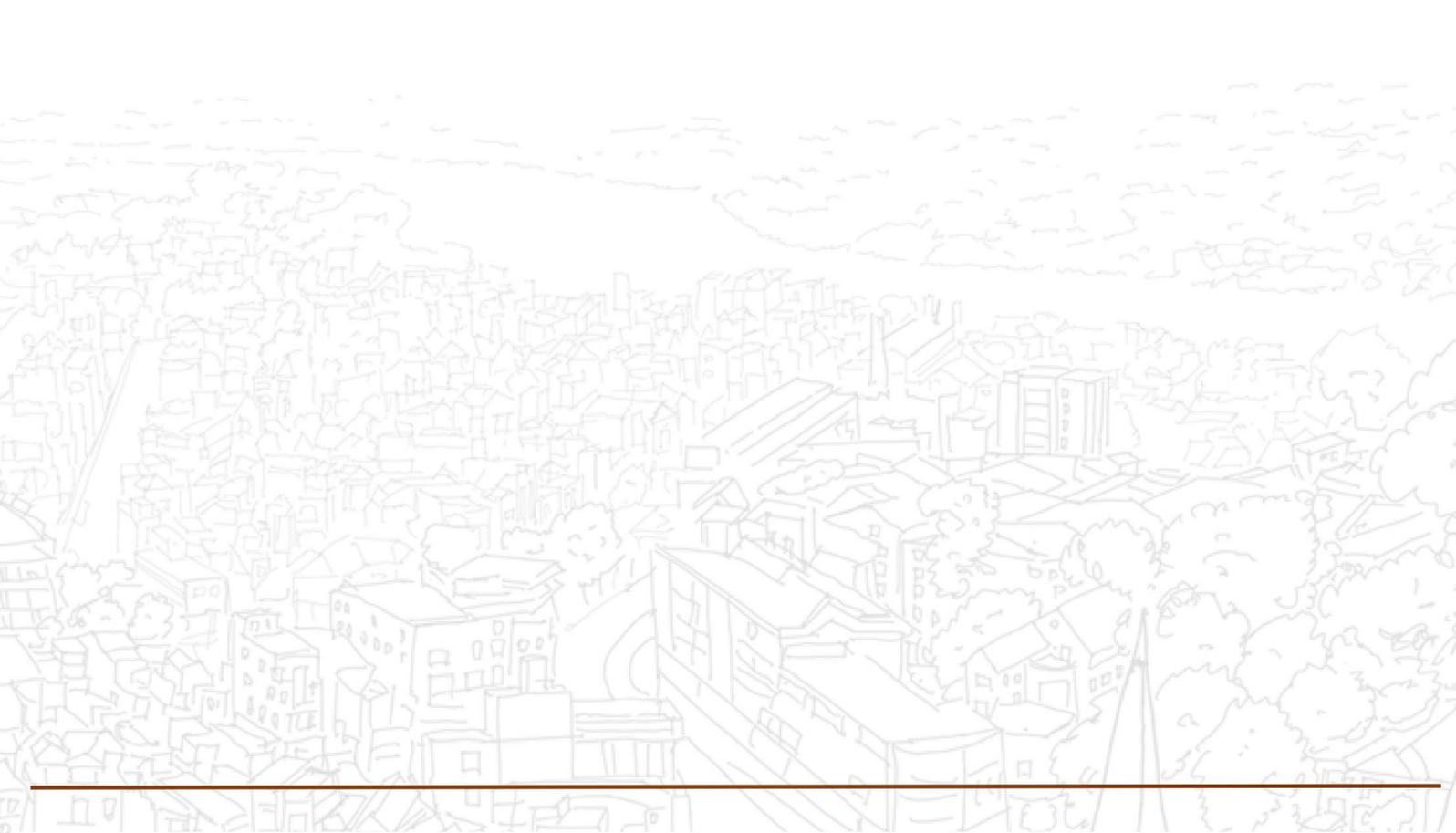
plus facilement l'opportunité de tester la part relative de chacune des composantes génétique et plastique des phénotypes, car on peut avoir un contrôle total sur les lignées étudiées et établir des expériences de croisement de nichées qui permettent de distinguer chacune des composantes. Les expériences en laboratoire permettent également de suivre un individu tout au long de sa vie là où en milieu naturel il est plus difficile de recapturer le même individu. De plus, ces études offrent l'opportunité de développer et de tester la spécificité des biomarqueurs, mais également d'établir une gamme de réactions « dose-réponse » pour ces marqueurs qui pourront être transposés en milieu urbain. Ce sont notamment des expériences similaires à celles que nous avons faites sur le diamant mandarin qui contribuent à mieux comprendre les patrons de variations phénotypiques observées entre les différentes études en milieu urbain. C'est également pour ça que dans nos études en laboratoire nous avons privilégié les marqueurs non invasifs aux prélèvements létaux (e.g. dosage de la métallothionéine dans le sang plutôt que dans le foie).

Par ailleurs, notre approche présente une contrainte majeure : l'utilisation de deux espèces différentes pour nos approches corrélatives et expérimentales. Le diamant mandarin est un animal modèle pour les études en laboratoire, mais il diffère de la mésange charbonnière en termes d'histoire de vie ce qui rend difficilement transposables les résultats observés en captivité au milieu naturel européen (Griffith et al., 2021). Les normes de réponses du statut oxydatif sont également très variables d'une espèce à l'autre (Costantini, 2008; Salmón et al., 2018a). Or, pour pallier les limites de chaque approche, une possibilité serait de réaliser des expériences de jardin commun avec des mésanges issues des populations urbaines et forestières de notre site d'étude. Les expériences de jardin commun consistent à réaliser des expériences en milieu contrôlé avec des oiseaux prélevés dans le milieu naturel, ici en milieu urbain et en milieu forestier, dont le phénotype est dépendant de leur génotype, mais également de leur environnement d'origine. Ce type d'approche est fréquemment utilisé pour tester le caractère plastique d'un phénotype. Ce type d'expérience a permis de mieux comprendre l'impact du milieu urbain sur la réponse oxydative (Costantini et al., 2014) et le comportement des individus (Miranda et al., 2013) chez le merle *Turdus merula*. Grâce à ce type d'approche, nous pourrions tester les réponses physiologiques des individus aux cocktails de polluants, mais également d'autres problématiques en suspens comme le caractère génétique ou plastique de la taille réduite de nichée observée en ville ou des différences morphologiques mises en évidence dans cette étude.



**Figure Bilan** – Résumé des résultats obtenus pendant cette thèse et futures recherches à explorer (en violet) pour améliorer notre compréhension de l'impact de l'urbanisation et des cocktails de polluants sur les traits d'histoire de vie des oiseaux

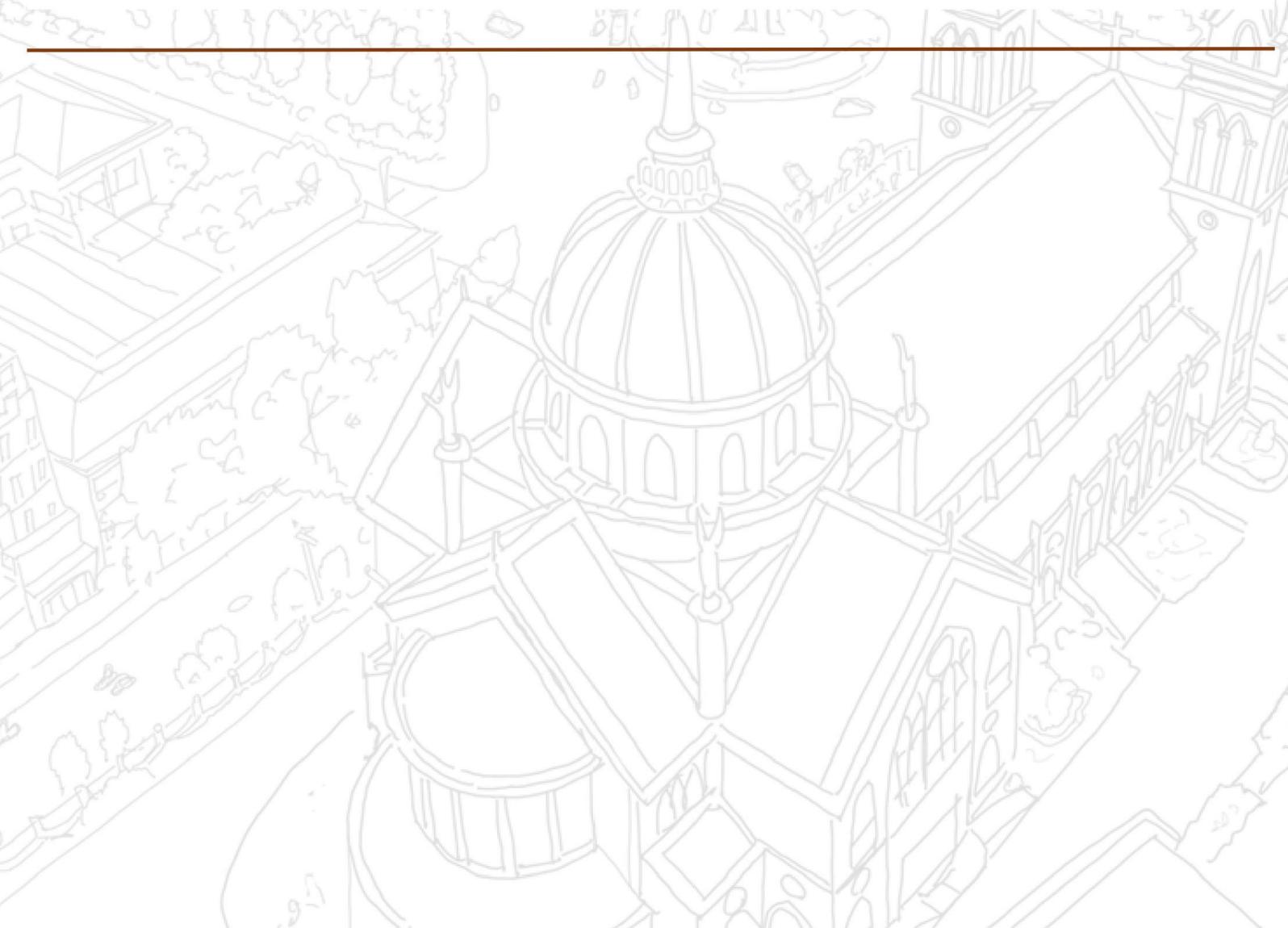




---

# **BIBLIOGRAPHIE**

---





- Abbasi, N.A., Jaspers, V.L.B., Chaudhry, M.J.I., Ali, S., Malik, R.N., 2015. Influence of taxa, trophic level, and location on bioaccumulation of toxic metals in bird's feathers: A preliminary biomonitoring study using multiple bird species from Pakistan. *Chemosphere* 120, 527–537. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2014.08.054>
- Achi, M. V., Ravindranath, N., Dym, M., 2000. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity. *Biology of Reproduction* 63, 591–598. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.2.591>
- Al Bakheet, S.A., Attafi, I.M., Maayah, Z.H., Abd-Allah, A.R., Asiri, Y.A., Korashy, H.M., 2013. Effect of long-term human exposure to environmental heavy metals on the expression of detoxification and DNA repair genes. *Environmental Pollution* 181, 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2013.06.014>
- Al Dine, E.J., Mokbel, H., Elmoll, A., Massemin, S., Vuilleumier, S., Toufaily, J., Hanieh, T., Millet, M., 2015. Concomitant evaluation of atmospheric levels of polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides, and polycyclic aromatic hydrocarbons in Strasbourg (France) using pine needle passive samplers. *Environmental Science and Pollution Research* 22, 17850–17859. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-5030-5>
- Albers, P.H., 2006. Birds and polycyclic aromatic hydrocarbons. *Avian and Poultry Biology Reviews* 17, 125–140.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Gaillard, M., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., 2004. An Experimental Test of the Dose-Dependent Effect of Carotenoids and Immune Activation on Sexual Signals and Antioxidant Activity. *The American Naturalist* 164, 651–659. <https://doi.org/10.1086/424971>
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Gaillard, M., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., 2004a. An Experimental Test of the Dose-Dependent Effect of Carotenoids and Immune Activation on Sexual Signals and Antioxidant Activity. *Am. Nat* 164, 651–659.
- Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., 2004b. Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction. *Ecology Letters* 7, 363–368. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00594.x>
- Alonso-Álvarez, C., Pérez-Rodríguez, L., García, J.T., Viñuela, J., Mateo, R., 2010. Age and Breeding Effort as Sources of Individual Variability in Oxidative Stress Markers in a Bird Species. *Physiological and Biochemical Zoology* 83, 110–118. <https://doi.org/10.1086/605395>
- Amiard, J.C., 2011. Les risques chimiques environnementaux : méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes. Éditions Tec & Doc.
- Andersson, M.N., Nilsson, J., Nilsson, J.Å., Isaksson, C., 2018. Diet and ambient temperature interact to shape plasma fatty acid composition, basal metabolic rate and oxidative stress in great tits. *Journal of Experimental Biology* 221. <https://doi.org/10.1242/jeb.186759/259500/am/diet-and-ambient-temperature-interact-to-shape>

- Andersson, M.N., Wang, H.L., Nord, A., Salmón, P., Isaksson, C., 2015. Composition of physiologically important fatty acids in great tits differs between urban and rural populations on a seasonal basis. *Frontiers in Ecology and Evolution* 3, 93. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2015.00093/BIBTEX>
- Ardia, D.R., Broughton, D.R., Gleicher, M.J., 2010. Short-term exposure to testosterone propionate leads to rapid bill color and dominance changes in zebra finches. *Hormones and Behavior* 58, 526–532. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2010.04.004>
- Ardia, D.R., Clotfelter, E.D., 2007. Individual quality and age affect responses to an energetic constraint in a cavity-nesting bird. *Behavioral Ecology* 18, 259–266. <https://doi.org/10.1093/beheco/arl078>
- Arnold, K.E., Ramsay, S.L., Henderson, L., Larcombe, S.D., 2010. Seasonal variation in diet quality: antioxidants, invertebrates and blue tits *Cyanistes caeruleus*. *Biological Journal of the Linnean Society* 99, 708–717. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01377.x>
- Atema, E., Mulder, E., van Noordwijk, A.J., Verhulst, S., 2019. Ultralong telomeres shorten with age in nestling great tits but are static in adults and mask attrition of short telomeres. *Molecular Ecology Resources* 19, 648–658. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12996>
- Atmo France - Réseau national des Associations agréées de surveillance de la qualité de l'air. (n.d.). Retrieved February 25, 2022, from <https://atmo-france.org/>
- Avery, M.I., Krebs, J.R., 2008. Temperature and foraging success of Great Tits *Parus major* hunting for spiders. *Ibis* 126, 33–38. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1984.tb03661.x>
- Bailly, J., Faivre, B., Bernard, N., Sage, M., Crini, N., Driget, V., Garnier, S., Rieffel, D., Scheifler, R., 2017. Multi-element analysis of blood samples in a passerine species: Excesses and deficiencies of trace elements in an urbanization study. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5, 6. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00006>
- Bailly, J., Scheifler, R., Berthe, S., Clément-Demange, V.A., Leblond, M., Pasteur, B., Faivre, B., 2016. From eggs to fledging: Negative impact of urban habitat on reproduction in two tit species. *Journal of Ornithology* 157, 377–392. <https://doi.org/10.1007/s10336-015-1293-3>
- Balaban, R.S., Nemoto, S., Finkel, T., 2005. Mitochondria, Oxidants, and Aging. *Cell* 120, 483–495. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2005.02.001>
- Baldan, D., Ouyang, J.Q., 2020. Urban resources limit pair coordination over offspring provisioning. *Scientific Reports* 10, 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72951-2>
- Baos, R., Blas, J., Bortolotti, G.R., Marchant, T.A., Hiraldo, F., 2006. Adrenocortical response to stress and thyroid hormone status in free-living nestling white storks (*Ciconia ciconia*) exposed to heavy metal and arsenic contamination. *Environmental Health Perspectives* 114, 1497–1501. <https://doi.org/10.1289/EHP.9099>

- Barjaktarovic, L., Elliott, J.E., Scheuhammer, A.M., 2002. Metal and Metallothionein Concentrations in Scoter (*Melanitta* spp.) from the Pacific Northwest of Canada, 1989-1994. <https://doi.org/10.1007/s00244-002-1273-5>
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B.M., Walker, S.C., 2015. Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* 67, 1–48. <https://doi.org/10.18637/jss.v067.i01>
- Beaugeard, E., Brischoux, F., Henry, P.Y., Parenteau, C., Trouvé, C., Angelier, F., 2019. Does urbanization cause stress in wild birds during development? Insights from feather corticosterone levels in juvenile house sparrows (*Passer domesticus*). *Ecology and Evolution* 9, 640–652. <https://doi.org/10.1002/ECE3.4788>
- Bel'skii, E.A., Bezel', V.S., Polents, E.A., 1995. Early Stages of the Nesting Period of Hollow-Nesting Birds under Conditions of Industrial Pollution. *Russian Journal of Ecology* 26, 38–43.
- Belyaeva, E.A., Sokolova, T. V., Emelyanova, L. V., Zakharova, I.O., 2012. Mitochondrial electron transport chain in heavy metal-induced neurotoxicity: Effects of cadmium, mercury, and copper. *The Scientific World Journal* 2012. <https://doi.org/10.1100/2012/136063>
- Berglund, Å.M.M., 2018. Evaluating blood and excrement as bioindicators for metal accumulation in birds. *Environmental Pollution* 233, 1198–1206. <https://doi.org/10.1016/j.ENVPOL.2017.10.031>
- Berglund, Å.M.M., Sturve, J., Förlin, L., Nyholm, N.E.I., 2007. Oxidative stress in pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) nestlings from metal contaminated environments in northern Sweden. *Environmental Research* 105, 330–339. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2007.06.002>
- Berglund, Å.M.M.M., Rainio, M.J., Kanerva, M., Nikinmaa, M., Eeva, T., 2014. Antioxidant status in relation to age, condition, reproductive performance and pollution in three passerine species. *Journal of Avian Biology* 45, 235–246. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2013.00126.x>
- Biard, C., Brischoux, F., Meillère, A., Michaud, B., Nivière, M., Ruault, S., Vaugoyeau, M., Angelier, F., 2017. Growing in cities: an urban penalty for wild birds? A study of phenotypic differences between urban and rural great tit chicks (*Parus major*). *Frontiers in Ecology and Evolution* 5, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00079>
- Bichet, C., Scheifler, R., Cœurdassier, M., Julliard, R., Sorci, G., Loiseau, C., 2013. Urbanization, trace metal pollution, and malaria prevalence in the house sparrow. *PLoS ONE* 8, e53866. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0053866>
- Bisht, S., Faiq, M., Tolahunase, M., Dada, R., 2017. Oxidative stress and male infertility. *Nature Reviews Urology* 14, 470–485. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2017.69>
- Bize, P., Devevey, G., Monaghan, P., Doligez, B., Christe, P., 2008. Fecundity and survival in relation to resistance to oxidative stress in a free-living bird. *Ecology* 89, 2584–2593. <https://doi.org/10.1890/07-1135.1>

- Blackburn, E.H., 2005. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Letters* 579, 859–862. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2004.11.036>
- Blackburn, E.H., 1991. Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569–573. <https://doi.org/10.1038/350569a0>
- Blackburn, E.H., Epel, E.S., 2012. Telomeres and adversity: Too toxic to ignore. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/490169a>
- Blalock, T.L., Dunn, M.A., Cousins, R.J., 1988. Metallothionein Gene Expression in Rats: Tissue-Specific Regulation by Dietary Copper and Zinc. *The Journal of Nutrition* 118, 222–228. <https://doi.org/10.1093/JN/118.2.222>
- Blount, J.D., Moøller, A.P., Houston, D.C., 2001. Antioxidants, showy males and sperm quality. *Ecology Letters* 4, 393–396. <https://doi.org/10.1046/J.1461-0248.2001.00255.X>
- Bókony, V., Seress, G., Nagy, S., Lendvai, ádám Z., Liker, A., 2012. Multiple indices of body condition reveal no negative effect of urbanization in adult house sparrows. *Landscape and Urban Planning* 104, 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2011.10.006>
- Bonier, F., Martin, P.R., Wingfield, J.C., 2007a. Urban birds have broader environmental tolerance. *Biology Letters* 3, 670–673. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0349>
- Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B., Sorci, G., 2015. Assessing the Cost of Mounting an Immune Response. <https://doi.org/10.1086/346134> 161, 367–379. <https://doi.org/10.1086/346134>
- Borrás, C., Esteve, J.M., Viña, J.B., Sastre, J., Viña, J., Pallardó, F. v., 2004. Glutathione Regulates Telomerase Activity in 3T3 Fibroblasts \*. *Journal of Biological Chemistry* 279, 34332–34335. <https://doi.org/10.1074/JBC.M402425200>
- Boyce, M.S., Perrins, C.M., 1987. Optimizing great tit clutch size in a fluctuating environment. *Ecology* 68, 142–153. <https://doi.org/10.2307/1938814>
- Burger, J., Gochfeld, M., 2000. Metal levels in feathers of 12 species of seabirds from Midway Atoll in the northern Pacific Ocean. *Science of The Total Environment* 257, 37–52. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(00\)00496-4](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(00)00496-4)
- Burness, G.P., McClelland, G.B., Wardrop, S.L., Hochachka, P.W., 2000. Effect of brood size manipulation on offspring physiology: an experiment with passerine birds. *Journal of Experimental Biology* 203, 3513–3520. <https://doi.org/10.1242/jeb.203.22.3513>
- Buse, A., Dury, S.J., Woodburn, R.J.W., Perrins, C.M., Good, J.E.G., 1999. Effects of elevated temperature on multi-species interactions: the case of Pedunculate Oak, Winter Moth and Tits. *Functional Ecology* 13, 74–82. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1999.00010.x>
- Caizergues, A.E., Charmantier, A., Lambrechts, M.M., Perret, S., Demeyrier, V., Lucas, A., Grégoire, A., 2021. An avian urban morphotype: how the city environment shapes great tit morphology at

- different life stages. *Urban Ecosystems* 24, 929–941. <https://doi.org/10.1007/s11252-020-01077-0>
- Caizergues, A.E., Grégoire, A., Charmantier, A., 2018. Urban versus forest ecotypes are not explained by divergent reproductive selection. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 285. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.0261>
- Caizergues, A.E., le Luyer, J., Grégoire, A., Szulkin, M., Senar, J.C., Charmantier, A., Perrier, C., 2022. Epigenetics and the city: Non-parallel DNA methylation modifications across pairs of urban-forest Great tit populations. *Evolutionary Applications* 15, 149–165. <https://doi.org/10.1111/eva.13334>
- Casasole, G., Raap, T., Costantini, D., AbdElgawad, H., Asard, H., Pinxten, R., Eens, M., 2017. Neither artificial light at night, anthropogenic noise nor distance from roads are associated with oxidative status of nestlings in an urban population of songbirds. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology* 210, 14–21. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2017.05.003>
- Castro-Díez, P., Pauchard, A., Traveset, A., Vilà, M., 2016. Linking the impacts of plant invasion on community functional structure and ecosystem properties. *Journal of Vegetation Science* 27, 1233–1242. <https://doi.org/10.1111/jvs.12429>
- Caudill, M.T., Spear, E.L., Varian-Ramos, C.W., Cristol, D.A., 2015. PHA-Stimulated immune-responsiveness in mercury-dosed zebra finches does not match results from environmentally exposed songbirds. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 94, 407–411. <https://doi.org/10.1007/s00128-015-1472-1>
- Chamberlain, D.E., Cannon, A.R., Toms, M.P., Leech, D.I., Hatchwell, B.J., Gaston, K.J., 2009. Avian productivity in urban landscapes: A review and meta-analysis. *Ibis* 151, 1–18. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2008.00899.x>
- Chan, S.R.W.L., Blackburn, E.H., 2004. Telomeres and telomerase. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 359, 109–121. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2003.1370>
- Charmantier, A., Demeyrier, V., Lambrechts, M., Perret, S., Grégoire, A., 2017. Urbanization is associated with divergence in pace-of-life in great tits. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5, 40–47. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00053>
- Charmantier, A., McCleery, R.H., Cole, L.R., Perrins, C., Kruuk, L.E.B., Sheldon, B.C., 2008. Adaptive Phenotypic Plasticity in Response to Climate Change in a Wild Bird Population. *Science* 320, 800–803. <https://doi.org/10.1126/science.1157174>
- Chastel, O., Weimerskirch, H., Jouventin, P., 1995. Influence of body condition on reproductive decision and reproductive success in the Blue Petrel. *Auk* 112, 964–972. <https://doi.org/10.2307/4089027>

- Chatelain, M., Drobniak, S.M., Szulkin, M., 2020. The association between stressors and telomeres in non-human vertebrates: a meta-analysis. *Ecology Letters* 23, 381–398. <https://doi.org/10.1111/ele.13426>
- Chatelain, M., Gasparini, J., Frantz, A., 2016a. Do trace metals select for darker birds in urban areas? An experimental exposure to lead and zinc. *Global Change Biology* 22, 2380–2391. <https://doi.org/10.1111/gcb.13170>
- Chatelain, M., Gasparini, J., Frantz, A., 2016b. Trace metals, melanin-based pigmentation and their interaction influence immune parameters in feral pigeons (*Columba livia*). *Ecotoxicology* 25, 521–529. <https://doi.org/10.1007/s10646-016-1610-5>
- Chatelain, M., Gasparini, J., Haussy, C., Frantz, A., 2016c. Trace metals affect early maternal transfer of immune components in the feral pigeon. *Physiological and Biochemical Zoology* 89, 206–212. <https://doi.org/10.1086/685511>
- Chatelain, M., Masseurin, S., Zahn, S., Kurek, E., Bulska, E., Szulkin, M., 2021. Urban metal pollution explains variation in reproductive outputs in great tits and blue tits. *Science of the Total Environment* 776, 145966. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.145966>
- Chmielewski, F.-M., Blümel, K., Scherbaum-Heberer, C., Koppmann-Rumpf, B., Schmidt, K.-H., 2013. A model approach to project the start of egg laying of Great Tit (*Parus major L.*) in response to climate change. *International Journal of Biometeorology* 57, 287–297. <https://doi.org/10.1007/s00484-012-0553-7>
- Chown, S.L., Gaston, K.J., 2008. Macrophysiology for a changing world. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 275, 1469–1478. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2008.0137>
- Cīrule, D., Krama, T., Krams, R., Elferts, D., Kaasik, A., Rantala, M.J., Mierauskas, P., Luoto, S., Krams, I.A., 2017. Habitat quality affects stress responses and survival in a bird wintering under extremely low ambient temperatures. *The Science of Nature* 104, 99. <https://doi.org/10.1007/s00114-017-1519-8>
- CITEPA, 2021. Inventaire des émissions de polluants atmosphériques et de gaz à effet de serre en France.
- Coffin, A.W., 2007. From roadkill to road ecology: A review of the ecological effects of roads. *Journal of Transport Geography* 15, 396–406. <https://doi.org/10.1016/J.JTRANGE.2006.11.006>
- Cohen, A.A., Hau, M., Wikelski, M., 2008. Stress, metabolism, and antioxidants in two wild passerine bird species. *Physiological and Biochemical Zoology* 81, 463–472. <https://doi.org/10.1086/589548>
- Colas G., 1948. Guide de l'Entomologiste, Editions N. ed, Publications de la Société Linnéenne de Lyon. Persée - Portail des revues scientifiques en SHS.
- Cormont, A., Vos, C.C., van Turnhout, C.A.M., Foppen, R.P.B., ter Braak, C.J.F., 2011. Using life-history traits to explain bird population responses to changing weather variability. *Climate Research*. <https://doi.org/10.3354/cr01007>

- Corsini, M., Schöll, E.M., Di Lecce, I., Chatelain, M., Dubiec, A., Szulkin, M., 2020. Growing in the city: Urban evolutionary ecology of avian growth rates. *Evolutionary Applications* eea.13081. <https://doi.org/10.1111/eva.13081>
- Costantini, D., 2014. Nutritional Ecology, Foraging Strategies and Food Selection. *Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology* 111–142. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-54663-1\\_4](https://doi.org/10.1007/978-3-642-54663-1_4)
- Costantini, D., 2011. On the measurement of circulating antioxidant capacity and the nightmare of uric acid. *Methods in Ecology and Evolution* 2, 321–325. <https://doi.org/10.1111/J.2041-210X.2010.00080.X>
- Costantini, D., 2008. Oxidative stress in ecology and evolution: Lessons from avian studies. *Ecology Letters* 11, 1238–1251. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01246.X>
- Costantini, D., Greives, T.J., Hau, M., Partecke, J., 2014. Does urban life change blood oxidative status in birds? *Journal of Experimental Biology* 217, 2994–2997. <https://doi.org/10.1242/jeb.106450>
- Costantini, D., Verhulst, S., 2009. Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Functional Ecology* 23, 506–509. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2009.01546.x>
- Coudon, T., Praud, D., Amadou, A., Couvidat, F., Caudeville, J., Severi, G., Mancini, F., B, F., 2019. Assessment of long-term exposure to airborne pollution in France (1990–2010). *Environmental Epidemiology* 3, 81–82. <https://doi.org/10.1097/01.ee9.0000606572.75115.7a>
- Cox, A.R., Robertson, R.J., Lendvai, A.Z., Everitt, K., Bonier, F., 2019. Rainy springs linked to poor nestling growth in a declining avian aerial insectivore (*Tachycineta bicolor*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 286, 20190018. <https://doi.org/10.1098/rspb.2019.0018>
- Criscuolo, F., Bize, P., Nasir, L., Metcalfe, N.B., Foote, C.G., Griffiths, K., Gault, E.A., Monaghan, P., 2009. Real-time quantitative PCR assay for measurement of avian telomeres. *Journal of Avian Biology* 40, 342–347. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2008.04623.x>
- Criscuolo, F., Fowler, M.F., Fuhrer, V.A., Zahn, S., Williams, T.D., 2018. Telomere length, individual quality and fitness in female European starlings (*Sturnus vulgaris*) during breeding. *bioRxiv* 416438. <https://doi.org/10.1101/416438>
- Croci, S., Butet, A., Clergeau, P., 2008. Does urbanization filter birds on the basis of their biological traits? *Condor* 110, 223–240. <https://doi.org/10.1525/cond.2008.8409>
- Das, K.K., Das, S.N., Dhundasi, S.A., 2008. Nickel, its adverse health effects & oxidative stress. *Indian Journal of Medical Research* 128, 412–425.
- Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2002. Tissue Levels of Lead in Experimentally Exposed Zebra Finches ( *Taeniopygia guttata* ) with Particular Attention on the Use of Feathers as Biomonitors. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 42, 88–92. <https://doi.org/10.1007/s002440010295>

- Dauwe, T., Bervoets, L., Blust, R., Pinxten, R., Eens, M., 2000. Can excrement and feathers of nestling songbirds be used as biomonitors for heavy metal pollution? *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 541–546. <https://doi.org/10.1007/s002440010138>
- Dauwe, T., Janssens, E., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2004a. Relationships between metal concentrations in great tit nestlings and their environment and food. *Environmental Pollution* 131, 373–380. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.03.009>
- Dauwe, T., Janssens, E., Kempenaers, B., Eens, M., 2004b. The effect of heavy metal exposure on egg size, eggshell thickness and the number of spermatozoa in blue tit *Parus caeruleus* eggs. *Environmental Pollution* 129, 125–129. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.09.028>
- Dauwe, T., Snoeijs, T., Bervoets, L., Blust, R., Eens, M., 2006. Calcium availability influences lead accumulation in a passerine bird. *Animal Biology* 56, 289–298. <https://doi.org/10.1163/157075606778441822>
- Davis, A.M., Glick, T.F., 1978. Urban Ecosystems and Island Biogeography. *Environmental Conservation* 5, 299–304. <https://doi.org/10.1017/S037689290000638X>
- Davis, S.R., Cousins, R.J., 2000. Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function. *The Journal of Nutrition* 130, 1085–1088. <https://doi.org/10.1093/JN/130.5.1085>
- Dawson, R.D., Bortolotti, G.R., 2000. Reproductive success of American Kestrels: the role of prey abundance and weather. *The Condor* 102, 814–822. <https://doi.org/10.1093/condor/102.4.814>
- Dawson, R.D., Lawrie, C.C., O'Brien, E.L., 2005. The importance of microclimate variation in determining size, growth and survival of avian offspring: Experimental evidence from a cavity nesting passerine. *Oecologia* 144, 499–507. <https://doi.org/10.1007/s00442-005-0075-7>
- de la Casa-Resino, I., Hernández-Moreno, D., Castellano, A., Soler Rodríguez, F., Pérez-López, M., 2015. Biomarkers of oxidative status associated with metal pollution in the blood of the white stork (*Ciconia ciconia*) in Spain. *Toxicological and Environmental Chemistry* 97, 588–598. <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1051484>
- Demeyrier, V., Lambrechts, M.M., Perret, P., Grégoire, A., 2016. Experimental demonstration of an ecological trap for a wild bird in a human-transformed environment. *Animal Behaviour* 118, 181–190. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2016.06.007>
- Demongin, L., 2016. Identification guide to birds in the hand, Beauregard-Vendon.
- Dijkstra, C., Bult, A., Bijlsma, S., Daan, S., Meijer, T., Zijlstra, M., 1990. Brood Size Manipulations in the Kestrel (*Falco tinnunculus*): Effects on Offspring and Parent Survival. *The Journal of Animal Ecology* 59, 269. <https://doi.org/10.2307/5172>
- Dmowski, K., 1999. Birds as bioindicators of heavy metal pollution: Review and examples concerning European species. *Acta Ornithologica (Warsaw)* 34, 1–25. <https://doi.org/10.1080/07294360.2013.806437>

- Dominoni, D., Smit, J.A.H., Visser, M.E., Halfwerk, W., 2020. Multisensory pollution: Artificial light at night and anthropogenic noise have interactive effects on activity patterns of great tits (*Parus major*). *Environmental Pollution* 256, 113314. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113314>
- Dominoni, D.M., Quetting, M., Partecke, J., 2013. Long-Term Effects of Chronic Light Pollution on Seasonal Functions of European Blackbirds (*Turdus merula*). *PLoS ONE* 8, e85069. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0085069>
- Dow, K., 2000. Social dimensions of gradients in urban ecosystems. *Urban Ecosystems* 2000 4:4 4, 255–275. <https://doi.org/10.1023/A:1015767231137>
- Drödge, W. 2002. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. <https://doi.org/10.1152/physrev.00018.2001>
- Eeva, T., Lehikoinen, E., 1996. Growth and mortality of nestling great tits (*Parus major*) and pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*) in a heavy metal pollution gradient. *Oecologia* 1996 108:4 108, 631–639. <https://doi.org/10.1007/BF00329036>
- Eeva, T., Lehikoinen, E., 1995. Egg shell quality, clutch size and hatching success of the great tit (*Parus major*) and the pied flycatcher (*Ficedula hypoleuca*) in an air pollution gradient. *Oecologia* 102, 312–323. <https://doi.org/10.1007/BF00329798>
- Eeva, T., Lehikoinen, E., Rönkä, M., Lummaa, V., Currie, D., 2002. Different responses to cold weather in two pied flycatcher populations. *Ecography* 25, 705–713. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0587.2002.250606.x>
- Eeva, T., Raivikko, N., Espín, S., Sánchez-Virosta, P., Ruuskanen, S., Sorvari, J., Rainio, M., 2020. Bird Feces as Indicators of Metal Pollution: Pitfalls and Solutions. *Toxics* 2020, Vol. 8, Page 124 8, 124. <https://doi.org/10.3390/TOXICS8040124>
- Eötvös, C.B., Magura, T., Lövei, G.L., 2018. A meta-analysis indicates reduced predation pressure with increasing urbanization. *Landscape and Urban Planning* 180, 54–59. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2018.08.010>
- Epel, E.S., Blackburn, E.H., Lin, J., Dhabhar, F.S., Adler, N.E., Morrow, J.D., Cawthon, R.M., 2004. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 17312–17315. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407162101>
- Espín, S., Martínez-López, E., Jiménez, P., María-Mojica, P., García-Fernández, A.J., 2014a. Effects of heavy metals on biomarkers for oxidative stress in Griffon vulture (*Gyps fulvus*). *Environmental Research* 129, 59–68. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2013.11.008>
- Espín, S., Martínez-López, E., León-Ortega, M., Martínez, J.E., García-Fernández, A.J., 2014b. Oxidative stress biomarkers in Eurasian eagle owls (*Bubo bubo*) in three different scenarios of heavy metal exposure. *Environmental Research* 131, 134–144. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.03.015>
- Espín, S., Ruiz, S., Sánchez-Virosta, P., Lilley, T., Eeva, T., 2017. Oxidative status in relation to metal pollution and calcium availability in pied flycatcher nestlings – A calcium manipulation

- experiment. *Environmental Pollution* 229, 448–458.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.094>
- Evans, B.A., Gawlik, D.E., 2020. Urban food subsidies reduce natural food limitations and reproductive costs for a wetland bird. *Scientific Reports* 2020 10:1 10, 1–12.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-020-70934-x>
- Evans, K.L., Gaston, K.J., Sharp, S.P., McGowan, A., Hatchwell, B.J., 2009. The effect of urbanisation on avian morphology and latitudinal gradients in body size. *Oikos* 118, 251–259.  
<https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2008.17092.x>
- Fay, R., Barbraud, C., Delord, K., Weimerskirch, H., 2016. Variation in the age of first reproduction: different strategies or individual quality? *Ecology* 97, 1842–1851. <https://doi.org/10.1890/15-1485.1>
- Fenoglio, M.S., Rossetti, M.R., Videla, M., 2020. Negative effects of urbanization on terrestrial arthropod communities: A meta-analysis. *Global Ecology and Biogeography* 29, 1412–1429.  
<https://doi.org/10.1111/geb.13107>
- Ferenc, M., Sedláček, O., Fuchs, R., Dinetti, M., Fraissinet, M., Storch, D., 2013. Are cities different? Patterns of species richness and beta diversity of urban bird communities and regional species assemblages in Europe. <https://doi.org/10.1111/geb.12130>
- Forman, H.J., Zhang, H., 2021. Targeting oxidative stress in disease: promise and limitations of antioxidant therapy. *Nature Reviews Drug Discovery* 2021 20:9 20, 689–709.  
<https://doi.org/10.1038/s41573-021-00233-1>
- Francis, R.A., Chadwick, M.A., 2012. What makes a species synurbic? *Applied Geography* 32, 514–521.  
<https://doi.org/10.1016/j.apgeog.2011.06.013>
- Franke, C., Studinger, G., Berger, G., Bt, S., Hling, ;, Bruckmann, U., Cohors-Fresenborg, D., Jiihncke, U., 1994. The assessment of bioaccumulation 29, 1501–1514.
- Frenck, R.W., Blackburn, E.H., Shannon, K.M., 1998. The rate of telomere sequence loss in human leukocytes varies with age. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 5607–5610. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.10.5607>
- Gall, J.E., Boyd, R.S., Rajakaruna, N., 2015. Transfer of heavy metals through terrestrial food webs: a review. *Environmental Monitoring and Assessment* 187. <https://doi.org/10.1007/s10661-015-4436-3>
- Gardner, J.L., Peters, A., Kearney, M.R., Joseph, L., Heinsohn, R., 2011. Declining body size: a third universal response to warming? *Trends in Ecology & Evolution* 26, 285–291.  
<https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.03.005>
- Gasaway, W.C., Buss, I.O., 1972. Zinc Toxicity in the Mallard Duck. *The Journal of Wildlife Management* 36, 1107. <https://doi.org/10.2307/3799239>

- Geiger, S., Le Vaillant, M., Lebard, T., Reichert, S., Stier, A., Le Maho, Y., Criscuolo, F., 2012. Catching-up but telomere loss: half-opening the black box of growth and ageing trade-off in wild king penguin chicks. *Molecular Ecology* 21, 1500–1510. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2011.05331.x>
- Gil, D., Brumm, H., 2013. *Avian Urban Ecology*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:osobl/9780199661572.001.0001>
- Giordano, M., 2014. Maternal effects in birds: effects of nutritional conditions on maternal reproductive effort and offspring performance. *Zurich Open Repository and Archive* 135.
- Giraudeau, M., Angelier, F., Sepp, T., 2019. Do telomeres influence pace-of-life-strategies in response to environmental conditions over a lifetime and between generations? *BioEssays* 41, 1800162. <https://doi.org/10.1002/bies.201800162>
- Giraudeau, Mathieu, Chavez, A., Toomey, M.B., McGraw, K.J., 2015. Effects of carotenoid supplementation and oxidative challenges on physiological parameters and carotenoid-based coloration in an urbanization context. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 69, 957–970. <https://doi.org/10.1007/s00265-015-1908-y>
- Giraudeau, M., Mateos-Gonzalez, F., Cotín, J., Pagani-Nuñez, E., Torné-Noguera, A., Senar, J.C., 2015. Metal exposure influences the melanin and carotenoid-based colorations in great tits. *Science of the Total Environment* 532, 512–516. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.06.021>
- Giraudeau, M., McGraw, K.J., 2014. Physiological correlates of urbanization in a desert songbird. *Integrative and Comparative Biology* 54, 622–632. <https://doi.org/10.1093/icb/icu024>
- Gonzalez-Hunt, C.P., Wadhwa, M., Sanders, L.H., 2018. DNA damage by oxidative stress: Measurement strategies for two genomes. *Current Opinion in Toxicology* 7, 87–94. <https://doi.org/10.1016/J.COTOX.2017.11.001>
- Goodchild, C.G., Beck, M.L., VanDiest, I., Czesak, F.N., Lane, S.J., Sewall, K.B., 2021. Male zebra finches exposed to lead (Pb) during development have reduced volume of song nuclei, altered sexual traits, and received less attention from females as adults. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 210, 111850. <https://doi.org/10.1016/J.ECOENV.2020.111850>
- Goyer, R.A., 1997. Toxic and essential metal interactions. *Annual Review of Nutrition* 17, 37–50. <https://doi.org/10.1146/annurev.nutr.17.1.37>
- Goyer, R.A., 1995. Nutrition and metal toxicity. *American Journal of Clinical Nutrition*. <https://doi.org/10.1093/ajcn/61.3.646S>
- Griffith, S.C., Ton, R., Hurley, L.L., McDiarmid, C.S., Pacheco-Fuentes, H., 2021. The ecology of the zebra finch makes it a great laboratory model but an outlier amongst passerine birds. *Birds* 2, 60–76. <https://doi.org/10.3390/BIRDS2010004>
- Grunst, A.S., Grunst, M.L., Bervoets, L., Pinxten, R., Eens, M., 2020. Proximity to roads, but not exposure to metal pollution, is associated with accelerated developmental telomere shortening in nestling great tits. *Environmental Pollution* 256, 113373. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.113373>

- Guerrero-Bosagna, C., Morisson, M., Liaubet, L., Rodenburg, T.B., de Haas, E.N., Košťál, C.D.S., Pitel, F., 2018. Transgenerational epigenetic inheritance in birds. *Environmental Epigenetics* 4. <https://doi.org/10.1093/eep/dvy008>
- Gutteridge, J.M.C., 1994. Biological origin of free radicals, and mechanisms of antioxidant protection. *Chemico-Biological Interactions* 91, 133–140. [https://doi.org/10.1016/0009-2797\(94\)90033-7](https://doi.org/10.1016/0009-2797(94)90033-7)
- Halfwerk, W., Holleman, L.J.M., Lessells, CKate.M., Slabbekoorn, H., 2011. Negative impact of traffic noise on avian reproductive success. *Journal of Applied Ecology* 48, 210–219. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01914.x>
- Hall, M.E., Nasir, L., Daunt, F., Gault, E.A., Croxall, J.P., Wanless, S., Monaghan, P., 2004. Telomere loss in relation to age and early environment in long-lived birds. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 271, 1571–1576. <https://doi.org/10.1098/rspb.2004.2768>
- Hallinger, K.K., Cristol, D.A., 2011. The role of weather in mediating the effect of mercury exposure on reproductive success in tree swallows. *Ecotoxicology* 20, 1368–1377. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0694-1>
- Hämäläinen, A.M., Guenther, A., Patrick, S.C., Schuett, W., 2021. Environmental effects on the covariation among pace-of-life traits. *Ethology* 127, 32–44. <https://doi.org/10.1111/ETH.13098>
- Han, Y., Bai, J., Zhang, Z., Wu, T., Chen, P., Sun, G., Miao, L., Xu, Z., Yu, L., Zhu, C., Zhao, D., Ge, G., Ruan, L., 2019. Nest site selection for five common birds and their coexistence in an urban habitat. *Science of the Total Environment* 690, 748–759. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.508>
- Handler, A.M., Lonsdorf, E. v., Ardia, D.R., 2020. Evidence for red fox (*Vulpes vulpes*) exploitation of anthropogenic food sources along an urbanization gradient using stable isotope analysis. *Canadian Journal of Zoology* 98, 79–87. <https://doi.org/10.1139/CJZ-2019-0004>
- Hargitai, R., Nagy, G., Nyiri, Z., Bervoets, L., Eke, Z., Eens, M., Török, J., 2016. Effects of breeding habitat (woodland versus urban) and metal pollution on the egg characteristics of great tits (*Parus major*). *Science of The Total Environment* 544, 31–38. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2015.11.116>
- Harrison, T.J.E., Smith, J.A., Martin, G.R., Chamberlain, D.E., Bearhop, S., Robb, G.N., Reynolds, S.J., 2010. Does food supplementation really enhance productivity of breeding birds? *Oecologia* 164, 311–320. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1645-x>
- Hashem, M.A., Abd El Hamied, S.S., Ahmed, E.M.A., Amer, S.A., El-Sharnouby, M.E., 2021. Mitigating the Growth, Biochemical Changes, Genotoxic and Pathological Effects of Copper Toxicity in Broiler Chickens by Supplementing Vitamins C and E. *Animals* 2021, Vol. 11, Page 1811 11, 1811. <https://doi.org/10.3390/ANI11061811>

- Haskell, D.G., Knupp, A.M., Schneider, M.C., 2001. Nest predator abundance and urbanization. *Avian Ecology and Conservation in an Urbanizing World* 243–258. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1531-9\\_11](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1531-9_11)
- Hauber, M.E., Louder, M.I., Griffith, S.C., 2021. The natural history of model organisms neurogenomic insights into the behavioral and vocal development of the zebra finch. *eLife* 10. <https://doi.org/10.7554/eLife.61849>
- Hausmann, M.F., Mauck, R.A., 2008. Telomeres and longevity: Testing an evolutionary hypothesis. *Molecular Biology and Evolution* 25, 220–228. <https://doi.org/10.1093/molbev/msm244>
- Hausmann, M.F., Vleck, C.M., 2002. Telomere length provides a new technique for aging animals. *Oecologia* 130, 325–328. <https://doi.org/10.1007/s00442-001-0827-y>
- Hausmann, M.F., Winkler, D.W., Vleck, C.M., 2005. Longer telomeres associated with higher survival in birds. *Biology Letters* 1, 212–214. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0301>
- Hayflick, L., 2003. Living forever and dying in the attempt. *Experimental Gerontology* 38, 1231–1241. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2003.09.003>
- Helfenstein, F., Losdat, S., Møller, A.P., Blount, J.D., Richner, H., 2010a. Sperm of colourful males are better protected against oxidative stress. *Ecology Letters* 13, 213–222. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2009.01419.x>
- Helfenstein, F., Podelvin, M., Richner, H., 2010b. Sperm morphology, swimming velocity, and longevity in the house sparrow *Passer domesticus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 64, 557–565. <https://doi.org/10.1007/s00265-009-0871-x>
- Helsel, D.R., 2011. *Statistics for censored environmental data using Minitab® and R*. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA. <https://doi.org/10.1002/9781118162729>
- Herrera-Dueñas, A., Pineda, J., Antonio, M.T., Aguirre, J.I., 2014. Oxidative stress of House Sparrow as bioindicator of urban pollution. *Ecological Indicators* 42, 6–9. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2013.08.014>
- Herrera-Dueñas, A., Pineda-Pampliega, J., Antonio-García, M.T., Aguirre, J.I., 2017. The influence of urban environments on oxidative stress balance: A case study on the house sparrow in the Iberian peninsula. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5, 106. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00106>
- Hinsley, S.A., Hill, R.A., Bellamy, P.E., Harrison, N.M., Speakman, J.R., Wilson, A.K., Ferns, P.N., 2008. Effects of structural and functional habitat gaps on breeding woodland birds: working harder for less. *Landscape Ecology* 23, 615–626. <https://doi.org/10.1007/s10980-008-9225-8>
- Hörak, P., Lebreton, J.-D., 2008. Survival of adult Great Tits *Parus major* in relation to sex and habitat; a comparison of urban and rural populations. *Ibis* 140, 205–209. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1998.tb04380.x>

- Hörak, P., Surai, P.F., Møller, A.P., 2002. Fat-soluble antioxidants in the eggs of great tits *Parus major* in relation to breeding habitat and laying sequence. *Avian Science* 2, 123–130.
- Hörak, P., Surai, P.F., Ots, I., Møller, A.P., 2004. Fat soluble antioxidants in brood-rearing great tits *Parus major*: relations to health and appearance. *Journal of Avian Biology* 35, 63–70. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2004.03167.x>
- Hörak, P., Tegelmann, L., Ots, I., Møller, A.P., 1999. Immune function and survival of great tit nestlings in relation to growth conditions. *Oecologia* 121, 316–322. <https://doi.org/10.1007/s004420050934>
- Hörak, P., Vellau, H., Ots, I., Møller, A.P., 2000. Growth conditions affect carotenoid-based plumage coloration of great tit nestlings. *Naturwissenschaften* 87, 460–464. <https://doi.org/10.1007/s001140050759>
- Huang, X., Zemlyanov, D.Y., Diaz-Amaya, S., Salehi, M., Stanciu, L., Whelton, A.J., 2020. Competitive heavy metal adsorption onto new and aged polyethylene under various drinking water conditions. *Journal of Hazardous Materials* 385, 121585. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2019.121585>
- Hug, N., Lingner, J., 2006. Telomere length homeostasis. *Chromosoma* 2006 115:6 115, 413–425. <https://doi.org/10.1007/S00412-006-0067-3>
- Humann-Guillemot, S., Tassin de Montaigu, C., Sire, J., Grünig, S., Gning, O., Glauser, G., Vallat, A., Helfenstein, F., 2019. A sublethal dose of the neonicotinoid insecticide acetamiprid reduces sperm density in a songbird. *Environmental Research* 177, 108589. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108589>
- Hunt, C., 2015. Neurological examination and diagnostic testing in birds and reptiles. *Journal of Exotic Pet Medicine* 24, 34–51. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2014.12.005>
- Ibáñez-Álamo, J.D., Pineda-Pampliega, J., Thomson, R.L., Aguirre, J.I., Díez-Fernández, A., Faivre, B., Figuerola, J., Verhulst, S., 2018. Urban blackbirds have shorter telomeres. *Biology Letters* 14, 20180083. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2018.0083>
- Ibáñez-Álamo, J.D., Soler, M., 2010. Does urbanization affect selective pressures and life-history strategies in the common blackbird (*Turdus merula* L.)? *Biological Journal of the Linnean Society* 101, 759–766. <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2010.01543.x>
- Injaian, A.S., Taff, C.C., Patricelli, G.L., 2018. Experimental anthropogenic noise impacts avian parental behaviour, nestling growth and nestling oxidative stress. *Animal Behaviour* 136, 31–39. <https://doi.org/10.1016/J.ANBEHAV.2017.12.003>
- INERIS. (2014). Le Cadmium et ses dérivés. 1–111.
- Isaksson, C., 2020. Urban ecophysiology: Beyond costs, stress and biomarkers. *Journal of Experimental Biology* 223. <https://doi.org/10.1242/jeb.203794>

- Isaksson, C., 2015. Urbanization, oxidative stress and inflammation: A question of evolving, acclimatizing or coping with urban environmental stress. *Functional Ecology* 29, 913–923. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12477>
- Isaksson, C., 2010. Pollution and its impact on wild animals: A meta-analysis on oxidative stress. *EcoHealth* 7, 342–350. <https://doi.org/10.1007/s10393-010-0345-7>
- Isaksson, C., Andersson, M.N., Nord, A., Von Post, M., Wang, H.L., 2017. Species-dependent effects of the urban environment on fatty acid composition and oxidative stress in birds. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5, 1–13. <https://doi.org/10.3389/fevo.2017.00044>
- Isaksson, C., Andersson, S., 2007. Carotenoid diet and nestling provisioning in urban and rural great tits *Parus major*. *Journal of Avian Biology* 38, 564–572. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0908-8857.04030.x>
- Isaksson, C., Johansson, A., Andersson, S., 2008. Egg yolk carotenoids in relation to habitat and reproductive investment in the great tit *Parus major*. *Physiological and Biochemical Zoology* 81, 112–118. <https://doi.org/10.1086/522650>
- Isaksson, C., McLAUGHLIN, P., MONAGHAN, P., ANDERSSON, S., 2007. Carotenoid pigmentation does not reflect total non-enzymatic antioxidant activity in plasma of adult and nestling great tits, *Parus major*. *Functional Ecology* 21, 1123–1129. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2435.2007.01317.x>
- Isaksson, C., Örnberg, J., Stephensen, E., Andersson, S., 2005. Plasma glutathione and carotenoid coloration as potential biomarkers of environmental stress in great tits. *EcoHealth* 2, 138–146. <https://doi.org/10.1007/s10393-005-3869-5>
- Jaishankar, M., Tseten, T., Anbalagan, N., Mathew, B.B., Beeregowda, K.N., 2014. Toxicity, mechanism and health effects of some heavy metals. *Interdisciplinary Toxicology*. <https://doi.org/10.2478/intox-2014-0009>
- Jan, A.T., Azam, M., Siddiqui, K., Ali, A., Choi, I., Haq, Q.M.R., 2015. Heavy metals and human health: Mechanistic insight into toxicity and counter defense system of antioxidants. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms161226183>
- Janssens, E., Dauwe, T., Pinxten, R., Eens, M., 2003. Breeding performance of great tits (*Parus major*) along a gradient of heavy metal pollution, *Environmental Toxicology and Chemistry*.
- Jarrett, C., Powell, L.L., McDevitt, H., Helm, B., Welch, A.J., 2020. Bitter fruits of hard labour: diet metabarcoding and telemetry reveal that urban songbirds travel further for lower-quality food. *Oecologia* 193, 377–388. <https://doi.org/10.1007/s00442-020-04678-w>
- Järup, L., 2003. Hazards of heavy metal contamination. *British medical bulletin* 68, 167–82. <https://doi.org/10.1093/bmb/ldg032>
- Jemai, H., Messaoudi, I., Chaouch, A., Kerkeni, A., 2007. Protective effect of zinc supplementation on blood antioxidant defense system in rats exposed to cadmium. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 21, 269–273. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2007.08.001>

- Jesse, W.A.M., Molleman, J., Franken, O., Lammers, M., Berg, M.P., Behm, J.E., Helmus, M.R., Ellers, J., 2020. Disentangling the effects of plant species invasion and urban development on arthropod community composition. *Global Change Biology* 26, 3294–3306. <https://doi.org/10.1111/gcb.15091>
- Jimeno, B., Hau, M., Verhulst, S., 2017. Strong association between corticosterone levels and temperature-dependent metabolic rate in individual zebra finches. *Journal of Experimental Biology* 220, 4426–4431. <https://doi.org/10.1242/JEB.166124/262795/AM/STRONG-ASSOCIATION-BETWEEN-CORTICOSTERONE-AND>
- Johnson, C.D., Evans, D., Jones, D., 2017. Birds and roads: Reduced transit for smaller species over roads within an urban environment. *Frontiers in Ecology and Evolution* 5, 36. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2017.00036/BIBTEX>
- Johnson, M.T.J., Munshi-South, J., 2017. Evolution of life in urban environments. *Science*. <https://doi.org/10.1126/science.aam8327>
- Jones, E.L., Leather, S.R., 2012. Invertebrates in urban areas: A review. *European Journal of Entomology* 109, 463–478. <https://doi.org/10.14411/eje.2012.060>
- Josse, J., Husson, F., 2016. missMDA: A package for handling missing values in multivariate data analysis. *Journal of Statistical Software* 70, 1–31. <https://doi.org/10.18637/jss.v070.i01>
- Kaiser, A., Merckx, T., van Dyck, H., 2016. The Urban Heat Island and its spatial scale dependent impact on survival and development in butterflies of different thermal sensitivity. *Ecology and Evolution* 6, 4129–4140. <https://doi.org/10.1002/ece3.2166>
- Kamiński, P., Kurhalyuk, N., Szady-Grad, M., 2007. Heavy metal-induced oxidative stress and changes in physiological process of free radicals in the blood of white stork (*Ciconia ciconia*) chicks in polluted areas. *Polish Journal of Environmental Studies* 16, 555–562.
- Kappes, H., Katschner, L., Nowak, C., 2012. Urban summer heat load: Meteorological data as a proxy for metropolitan biodiversity. *Meteorologische Zeitschrift* 21, 525–528. <https://doi.org/10.1127/0941-2948/2012/0361>
- Kark, S., Iwaniuk, A., Schalimtzek, A., Banker, E., 2007. Living in the city: Can anyone become an “urban exploiter”? *Journal of Biogeography* 34, 638–651. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2699.2006.01638.x>
- Karri, V., Schuhmacher, M., Kumar, V., 2016. Heavy metals (Pb, Cd, As and MeHg) as risk factors for cognitive dysfunction: A general review of metal mixture mechanism in brain. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 48, 203–213. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2016.09.016>
- Kempenaers, B., Borgström, P., Loës, P., Schlicht, E., Valcu, M., 2010. Artificial night lighting affects dawn song, extra-pair siring success, and lay date in songbirds. *Current Biology* 20, 1735–1739. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.08.028>

- Kim, M., Park, K., Park, J.Y., Kwak, I.S., 2013. Heavy metal contamination and metallothionein mRNA in blood and feathers of Black-tailed gulls (*Larus crassirostris*) from South Korea. *Environmental Monitoring and Assessment* 185, 2221–2230. <https://doi.org/10.1007/s10661-012-2703-0>
- Kimberly J. Fernie, G.R.B., 2000. Changes in Egg Composition of American Kestrels Exposed to Dietary Polychlorinated Biphenyls. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A* 60, 291–303. <https://doi.org/10.1080/00984100050027833>
- Kleerekoper, L., Van Esch, M., Salcedo, T.B., 2012. How to make a city climate-proof, addressing the urban heat island effect. *Resources, Conservation and Recycling* 64, 30–38. <https://doi.org/10.1016/J.RESCONREC.2011.06.004>
- Klumpp, A., Ansel, W., Klumpp, G., Breuer, J., Vergne, P., Sanz, M.J., Rasmussen, S., Ro-Poulsen, H., Ribas Artola, À., Peñuelas, J., He, S., Garrec, J.P., Calatayud, V., 2009. Airborne trace element pollution in 11 European cities assessed by exposure of standardised ryegrass cultures. *Atmospheric Environment* 43, 329–339. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2008.09.040>
- Koivula, M.J., Eeva, T., 2010. Metal-related oxidative stress in birds. *Environmental Pollution* 158, 2359–2370. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.03.013>
- Kosicki, J.Z., 2012. Effect of weather conditions on nestling survival in the White Stork *Ciconia ciconia* population. *Ethology Ecology and Evolution* 24, 140–148. <https://doi.org/10.1080/03949370.2011.616228>
- Krijgsveld, K.L., Visser, G.H., Daan, S., 2003. Foraging behavior and physiological changes in precocial quail chicks in response to low temperatures. *Physiology and Behavior* 79, 311–319. [https://doi.org/10.1016/S0031-9384\(03\)00117-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9384(03)00117-3)
- Krist, M., 2011. Egg size and offspring quality: A meta-analysis in birds. *Biological Reviews* 86, 692–716. <https://doi.org/10.1111/j.1469-185X.2010.00166.x>
- Kurhalyuk, N., Hetmański, T., Antonowicz, J., Tkachenko, H., 2009. Oxidative stress and protein oxidation affected by toxic metals in feral pigeon (*Columba livia*) from Northern Poland. *Baltic Coastal Zone. Journal of Ecology and Protection of the Coastline* 13 part I.
- Lê, S., Josse, J., Husson, F., 2008. FactoMineR: An R package for multivariate analysis. *Journal of Statistical Software* 25, 1–18. <https://doi.org/10.18637/jss.v025.i01>
- Lebedeva, N. v., 1994. Nidicolous and post-nidicolous mortality of youngs from asynchronous broods of some passerine birds (Passeriformes). *Zoologičeskij žurnal*, 7.
- Leonard, M.L., Horn, A.G., 2012. Ambient noise increases missed detections in nestling birds. *Biology Letters* 8, 530–532. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2012.0032>
- Lévy, M., Al-Alam, J., Delhomme, O., Millet, M., 2020. An integrated extraction method coupling pressurized solvent extraction, solid phase extraction and solid-phase micro extraction for the quantification of selected organic pollutants in air by gas and liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *Microchemical Journal* 157, 104889. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2020.104889>

- Lévy, M., Al-Alam, J., Ridacker, C., Massemin, S., Millet, M., 2018. Use of XAD®-2 passive air samplers for monitoring environmental trends of PAHs, PCBs and pesticides in three different sites in Strasbourg and its vicinity (east of France). *Atmospheric Environment* 195, 12–23. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2018.09.052>
- Likens, G.E., 1992. Some Applications of the Ecosystem Approach to Environmental Problems and Resource Management. *Responses of Forest Ecosystems to Environmental Changes* 16–30. [https://doi.org/10.1007/978-94-011-2866-7\\_2](https://doi.org/10.1007/978-94-011-2866-7_2)
- Liker, A., Papp, Z., Bókony, V., Lendvai, Á.Z., 2008. Lean birds in the city: body size and condition of house sparrows along the urbanization gradient. *Journal of Animal Ecology* 77, 789–795. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2656.2008.01402.x>
- Limón-Pacheco, J., Gonsebatt, M.E., 2009. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 674, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.09.015>
- Linden, M., Møller, A.P., 1989. Cost of reproduction and covariation of life history traits in birds. *Trends in Ecology and Evolution* 4, 367–371. [https://doi.org/10.1016/0169-5347\(89\)90101-8](https://doi.org/10.1016/0169-5347(89)90101-8)
- Lindhe Norberg, U.M., 2002. Structure, form, and function of flight in engineering and the living world. *Journal of Morphology* 252, 52–81. <https://doi.org/10.1002/JMOR.10013>
- Lindström, J., 1999. Early development and fitness in birds and mammals. *Trends in Ecology & Evolution* 14, 343–348. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(99\)01639-0](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(99)01639-0)
- Liu, H., Ma, W., Qian, J., Cai, J., Ye, X., Li, J., Wang, X., 2015. Effect of urbanization on the urban meteorology and air pollution in Hangzhou. *Journal of Meteorological Research* 29, 950–965. <https://doi.org/10.1007/s13351-015-5013-y>
- Lizée, M.-H., Manel, S., Mauffrey, J.-F., Tatoni, T., Deschamps-Cottin, M., 2012. Matrix configuration and patch isolation influences override the species–area relationship for urban butterfly communities. *Landscape Ecology* 27, 159–169. <https://doi.org/10.1007/s10980-011-9651-x>
- Lodovici, M., Bigagli, E., 2011. Oxidative stress and air pollution exposure. *Journal of toxicology* 2011, 487074. <https://doi.org/10.1155/2011/487074>
- Longcore, T., Rich, C., 2004. Ecological light pollution. *Frontiers in Ecology and the Environment*. [https://doi.org/10.1890/1540-9295\(2004\)002\[0191:ELP\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/1540-9295(2004)002[0191:ELP]2.0.CO;2)
- Losdat, S., Helfenstein, F., 2018. Relationships between sperm morphological traits and sperm swimming performance in wild Great Tits (*Parus major*). *Journal of Ornithology* 159, 805–814. <https://doi.org/10.1007/s10336-018-1539-y>
- Louzon, M., Coeurdassier, M., Gimbert, F., Pauget, B., de Vaufléury, A., 2019. Telomere dynamic in humans and animals: Review and perspectives in environmental toxicology. *Environment International* 131. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2019.105025>

- Love, O.P., Breuner, C.W., Vézina, F., Williams, T.D., 2004. Mediation of a corticosterone-induced reproductive conflict. *Hormones and Behavior* 46, 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2004.02.001>
- Lucia, M., André, J.-M., Gontier, K., Diot, N., Veiga, J., Davail, S., 2010. Trace Element Concentrations (Mercury, Cadmium, Copper, Zinc, Lead, Aluminium, Nickel, Arsenic, and Selenium) in Some Aquatic Birds of the Southwest Atlantic Coast of France. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 58, 844–853. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9393-9>
- Lucia, M., Andre, J.M., Gonzalez, P., Baudrimont, M., Gontier, K., Maury-Brachet, R., Davail, S., 2009. Impact of cadmium on aquatic bird *Cairina moschata*. *BioMetals* 22, 843–853. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9232-5>
- MacLeod, R., Barnett, P., Clark, J., Cresswell, W., 2006. Mass-dependent predation risk as a mechanism for house sparrow declines? *Biology Letters* 2, 43–46. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2005.0421>
- Mangiagalli, M.G., Martino, P.A., Smajlovic, T., Guidobono Cavalchini, L., Marelli, S.P., 2010. Effect of lycopene on semen quality, fertility and native immunity of broiler breeder. <http://doi.org/10.1080/00071660903401540> 51, 152–157
- Marasco, V., Stier, A., Boner, W., Griffiths, K., Heidinger, B., Monaghan, P., 2017. Environmental conditions can modulate the links among oxidative stress, age, and longevity. *Mechanisms of Ageing and Development* 164, 100–107. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2017.04.012>
- Marciniak, B., Nadolski, J., Nowakowska, M., Loga, B., Bańbura, J., 2007. Habitat and Annual Variation in Arthropod Abundance Affects Blue Tit *Cyanistes caeruleus* Reproduction. *Acta Ornithologica* 42, 53–62. <https://doi.org/10.3161/068.042.0113>
- Mariani, E., Mangialasche, F., Feliziani, F.T., Cecchetti, R., Malavolta, M., Bastiani, P., Baglioni, M., Dedoussis, G., Fulop, T., Herbein, G., Jajte, J., Monti, D., Rink, L., Mocchegiani, E., Mecocci, P., 2008. Effects of zinc supplementation on antioxidant enzyme activities in healthy old subjects. *Experimental Gerontology* 43, 445–451. <https://doi.org/10.1016/J.EXGER.2007.10.012>
- Marshall, D.J., Uller, T., 2007. When is a maternal effect adaptive? *Oikos*. <https://doi.org/10.1111/j.2007.0030-1299.16203.x>
- Martin, L.B., Hasselquist, D., Wikelski, M., 2006. Investment in immune defense is linked to pace of life in house sparrows. *Oecologia* 147, 565–575. <https://doi.org/10.1007/S00442-005-0314-Y/TABLES/3>
- Martin, T.E., 1987. Food as a limit on breeding birds: a life-history perspective. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18, 453–487. <https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002321>
- Martin, T.E., Martin, P.R., Olson, C.R., Heidinger, B.J., Fontaine, J.J., 2000. Parental care and clutch sizes in north and south american birds. *Science* 287, 1482–1485. <https://doi.org/10.1126/science.287.5457.1482>

- Marzluff, J.M., 2001. Worldwide urbanization and its effects on birds, in: Avian Ecology and Conservation in an Urbanizing World. Springer US, Boston, MA, pp. 19–47. [https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1531-9\\_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4615-1531-9_2)
- Mcdonald, R.I., Kareiva, P., Forman, R.T.T., 2008. The implications of current and future urbanization for global protected areas and biodiversity conservation. *Biological Conservation* 141, 1695–1703. <https://doi.org/10.1016/j.BIOCON.2008.04.025>
- McDonnell, Mark.J., 2011. Urban Ecology Patterns, Processes, and Applications 5–13.
- McGraw, K.J., Ardia, D.R., 2003. Carotenoids, Immunocompetence, and the Information Content of Sexual Colors: An Experimental Test. *American Naturalist* 162, 704–712. <https://doi.org/10.1086/378904>
- McGraw, K.J., Gregory, A.J., Parker, R.S., Adkins-Regan, E., 2003. Diet, plasma carotenoids, and sexual coloration in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Auk* 120, 400–410. [https://doi.org/10.1642/0004-8038\(2003\)120\[1212:DPCASC\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1642/0004-8038(2003)120[1212:DPCASC]2.0.CO;2)
- McKinney, M.L., 2006. Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biological Conservation* 127, 247–260. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2005.09.005>
- McNamara, J.M., Houston, A.I., 1996. State-dependent life histories. *Nature* 380, 215–221. <https://doi.org/10.1038/380215a0>
- Meillère, A., Brischoux, F., Bustamante, P., Michaud, B., Parenteau, C., Marciau, C., Angelier, F., 2016. Corticosterone levels in relation to trace element contamination along an urbanization gradient in the common blackbird (*Turdus merula*). *Science of The Total Environment* 566–567, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.014>
- Meillère, A., Brischoux, F., Henry, P.Y., Michaud, B., Garcin, R., Angelier, F., 2017. Growing in a city: Consequences on body size and plumage quality in an urban dweller, the house sparrow (*Passer domesticus*). *Landscape and Urban Planning* 160, 127–138. <https://doi.org/10.1016/j.landurbplan.2016.12.014>
- Meillère, A., Brischoux, F., Parenteau, C., Angelier, F., 2015a. Influence of urbanization on body size, condition, and physiology in an urban exploiter: A multi-component approach. *PLoS ONE* 10, 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135685>
- Meillère, A., Brischoux, F., Ribout, C., Angelier, F., 2015b. Traffic noise exposure affects telomere length in nestling house sparrows. *Biology Letters* 11. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2015.0559>
- Michalski, M., Nadolski, J., Marciniak, B., Loga, B., Bańbura, J., 2011. Faecal analysis as a method of nestling diet determination in insectivorous birds: A case study in Blue Tits *Cyanistes caeruleus* and Great Tits *Parus major*. *Acta Ornithologica* 46, 164–172. <https://doi.org/10.3161/000164511X625937>
- Migula, P., Augustyniak, M., Kowalczyk, K., 2000. Heavy Metals, Resting Metabolism Rates and Breeding Parameters in Two Populations of Black-Headed Gull *Larus ridibundus* from the

- Industrially Polluted Areas of Upper Silesia, Poland . *Acta Ornithologica* 35, 159–172. <https://doi.org/10.3161/068.035.0209>
- Milenkaya, O., Catlin, D.H., Legge, S., Walters, J.R., 2015. Body condition indices predict reproductive success but not survival in a sedentary, tropical bird. *PLOS ONE* 10, e0136582. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136582>
- Miller, J.R., 2006. Restoration, reconciliation, and reconnecting with nature nearby. *Biological Conservation* 127, 356–361. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2005.07.021>
- Miller, J.R., Hobbs, R.J., 2002. Conservation Where People Live and Work. *Conservation Biology* 16, 330–337. <https://doi.org/10.1046/J.1523-1739.2002.00420.X>
- Miranda, A.C., Schielzeth, H., Sonntag, T., Partecke, J., 2013. Urbanization and its effects on personality traits: a result of microevolution or phenotypic plasticity? *Global Change Biology* 19, 2634–2644. <https://doi.org/10.1111/gcb.12258>
- Møller, A.P., 2008. Flight distance of urban birds, predation, and selection for urban life. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63, 63–75. <https://doi.org/10.1007/s00265-008-0636-y>
- Monaghan, P., 2012. Telomeres and longevity. *Aging* 4, 76–77. <https://doi.org/10.18632/aging.100437>
- Monaghan, P., Metcalfe, N.B., Torres, R., 2009. Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology letters* 12, 75–92. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2008.01258.x>
- Monticelli, D., Ramos, J.A., 2012. Laying date, body mass and tick infestation of nestling tropical Roseate Terns *Sterna dougallii* predict fledging success, first-year survival and age at first return to the natal colony. *Ibis* 154, 825–837. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2012.01271.x>
- Mora, A.R., Firth, A., Blareau, S., Vallat, A., Helfenstein, F., 2017. Oxidative stress affects sperm performance and ejaculate redox status in subordinate house sparrows. *Journal of Experimental Biology* 220, 2577–2588. <https://doi.org/10.1242/jeb.154799>
- Mora, A.R., Meniri, M., Glauser, G., Vallat, A., Helfenstein, F., 2016. Badge size reflects sperm oxidative status within social groups in the house sparrow *Passer domesticus*. *Frontiers in Ecology and Evolution* 4, 1–10. <https://doi.org/10.3389/fevo.2016.00067>
- Müller, C., Jenni-Eiermann, S., Blondel, J., Perret, P., Caro, S.P., Lambrechts, M., Jenni, L., 2006. Effect of human presence and handling on circulating corticosterone levels in breeding blue tits (*Parus caeruleus*). *General and Comparative Endocrinology* 148, 163–171. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2006.02.012>
- Mundy, N.I.I., Stapley, J., Bennison, C., Tucker, R., Twyman, H., Kim, K.W., Burke, T., Birkhead, T.R.R., Andersson, S., Slate, J., 2016. Red Carotenoid Coloration in the Zebra Finch Is Controlled by a Cytochrome P450 Gene Cluster. *Current Biology* 26, 1435–1440. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2016.04.047/ATTACHMENT/90824066-5252-43C4-9A7A-03D6B78E0489/MMC1.PDF>

- Naef-Daenzer, B., Keller, L.F., 1999. The foraging performance of great and blue tits (*Parus major* and *P. caeruleus*) in relation to caterpillar development, and its consequences for nestling growth and fledging weight. *Journal of Animal Ecology* 68, 708–718. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2656.1999.00318.x>
- Naef-Daenzer, B., Widmer, F., Nuber, M., 2001. Differential post-fledging survival of great and coal tits in relation to their condition and fledging date. *Journal of Animal Ecology* 70, 730–738. <https://doi.org/10.1046/J.0021-8790.2001.00533.X>
- Naef-Daenzer, L., Naef-Daenzer, B., Nager, R.G., 2000. Prey selection and foraging performance of breeding Great Tits *Parus major* in relation to food availability. *Journal of Avian Biology* 31, 206–214. <https://doi.org/10.1034/j.1600-048X.2000.310212.x>
- Nain, S., Smits, J.E.G., 2011. Subchronic lead exposure, immunotoxicology and increased disease resistance in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Ecotoxicology and environmental safety* 74, 787–92. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2010.10.045>
- Nakagawa, S., Gemmell, N.J., Burke, T., 2004. Measuring vertebrate telomeres: Applications and limitations. *Molecular Ecology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2004.02291.x>
- Neal, A.P., Guilarte, T.R., 2013. Mechanisms of lead and manganese neurotoxicity. *Toxicology Research* 2, 99–114. <https://doi.org/10.1039/c2tx20064c>
- Nelson, D.R., Nebert, D.W., 2018. Cytochrome P450 (CYP) Gene Superfamily. eLS 1–19. <https://doi.org/10.1002/9780470015902.A0005667.PUB3>
- Nichols, K.S., Homayoun, T., Eckles, J., Blair, R.B., 2018. Bird-building collision risk: An assessment of the collision risk of birds with buildings by phylogeny and behavior using two citizen-science datasets. *PLOS ONE* 13, e0201558. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0201558>
- Niemelä, P.T., Dingemanse, N.J., Alioravainen, N., Vainikka, A., Kortet, R., 2013. Personality pace-of-life hypothesis: testing genetic associations among personality and life history. *Behavioral Ecology* 24, 935–941. <https://doi.org/10.1093/BEHECO/ART014>
- Nilsson, J.-A., 1994. Energetic Bottle-Necks During Breeding and the Reproductive Cost of Being Too Early. *The Journal of Animal Ecology* 63, 200. <https://doi.org/10.2307/5595>
- Nordberg, G.F., Fowler, B. a., Nordberg, M., 2009. *Handbook of The Toxicology of Metal*. Vasa 1024.
- Öberg, M., Arlt, D., Pärt, T., Laugen, A.T., Eggers, S., Low, M., 2015. Rainfall during parental care reduces reproductive and survival components of fitness in a passerine bird. *Ecology and Evolution* 5, 345–356. <https://doi.org/10.1002/ece3.1345>
- O'Brien, R.M., 2007. A caution regarding rules of thumb for variance inflation factors. *Quality and Quantity* 41, 673–690. <https://doi.org/10.1007/s11135-006-9018-6>
- Ouyang, J.Q., de Jong, M., Hau, M., Visser, M.E., van Grunsven, R.H.A., Spoelstra, K., 2015. Stressful colours: corticosterone concentrations in a free-living songbird vary with the spectral

- composition of experimental illumination. *Biology Letters* 11. <https://doi.org/10.1098/RSBL.2015.0517>
- Palafox, A.L., Ho-A, E., 1980. Effect of Zinc Toxicity in Laying White Leghorn Pullets and Hens. *Poultry Science* 59, 2024–2028. <https://doi.org/10.3382/PS.0592024>
- Pamplona, R., Costantini, D., 2011. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 301, 843–863. <https://doi.org/10.1152/AJPREGU.00034.2011/>
- Patankar, S., Jambhekar, R., Suryawanshi, K.R., Nagendra, H., 2021. Which Traits Influence Bird Survival in the City? A Review. *Land* 10, 92. <https://doi.org/10.3390/land10020092>
- Pauliny, A., Wagner, R.H., Augustin, J., Szép, T., Blomqvist, D., 2006. Age-independent telomere length predicts fitness in two bird species. *Molecular Ecology* 15, 1681–1687. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2006.02862.x>
- Peach, W.J., Mallord, J.W., Ockendon, N., Orsman, C.J., Haines, W.G., 2015. Invertebrate prey availability limits reproductive success but not breeding population size in suburban House Sparrows *Passer domesticus*. *Ibis* 157, 601–613. <https://doi.org/10.1111/ibi.12264>
- Pelucchi, C., Negri, E., Gallus, S., Boffetta, P., Tramacere, I., La Vecchia, C., 2009. Long-term particulate matter exposure and mortality: A review of European epidemiological studies. *BMC Public Health* 9, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-9-453/TABLES/2>
- Pérez-Rodríguez, L., Romero-Haro, A.A., Sternalski, A., Muriel, J., Mougeot, F., Gil, D., Alonso-Alvarez, C., 2015. Measuring Oxidative Stress: The Confounding Effect of Lipid Concentration in Measures of Lipid Peroxidation. *Physiological and Biochemical Zoology* 88, 345–351. <https://doi.org/10.1086/680688>
- Pierce, B.J., McWilliams, S.R., 2014. The fat of the matter: how dietary fatty acids can affect exercise performance. *Integrative and comparative biology*. <https://doi.org/10.1093/icb/icu098>
- Pipoly, I., Szabó, K., Bókony, V., Preiszner, B., Seress, G., Vincze, E., Schroeder, J., Liker, A., 2019. Higher Frequency of Extra-Pair Offspring in Urban Than Forest Broods of Great Tits (*Parus major*). *Frontiers in Ecology and Evolution* 7, 229. <https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00229>
- Pompella, A., Visvikis, A., Paolicchi, A., Tata, V. de, Casini, A.F., 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochemical Pharmacology* 66, 1499–1503. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(03\)00504-5](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(03)00504-5)
- Preston, B.T., Saint Jalme, M., Hingrat, Y., Lacroix, F., Sorci, G., 2015. The sperm of aging male bustards retards their offspring's development. *Nature Communications* 6, 1–9. <https://doi.org/10.1038/ncomms7146>
- Quinn, J., Whittingham, M., Butler, S., Cresswell, W., 2006. Noise, predation risk compensation and vigilance in the chaffinch *Fringilla coelebs*. *Journal of Avian Biology* 37, 601–608. <https://doi.org/10.1111/j.2006.0908-8857.03781.x>

- R Development Core Team, 2021. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria.
- Rainio, M.J., 2013. Metal-Induced Oxidative Stress and Antioxidant Defence.
- Rainio, M.J., Eeva, T., Lilley, T., Stauffer, J., Ruuskanen, S., 2015. Effects of early-life lead exposure on oxidative status and phagocytosis activity in great tits (*Parus major*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology* 167, 24–34. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2014.08.004>
- Rainio, M.J., Kanerva, M., Salminen, J.P., Nikinmaa, M., Eeva, T., 2013. Oxidative status in nestlings of three small passerine species exposed to metal pollution. *Science of the Total Environment* 454–455, 466–473. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.03.033>
- Rana, S.V.S., 2014. Perspectives in endocrine toxicity of heavy metals - A review. *Biological Trace Element Research*. <https://doi.org/10.1007/s12011-014-0023-7>
- Réale, D., Garant, D., Humphries, M.M., Bergeron, P., Careau, V., Montiglio, P.O., 2010. Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 4051–4063. <https://doi.org/10.1098/RSTB.2010.0208>
- Reichert, S., 2013. Determinants of telomere length and implications in life history trade-offs. Université de Strasbourg.
- Reichert, S., Criscuolo, F., Zahn, S., Arrive, M., Bize, P., Massemin, S., 2015. Immediate and delayed effects of growth conditions on ageing parameters in nestling zebra finches. *Journal of Experimental Biology* 218, 491–499. <https://doi.org/10.1242/jeb.109942>
- Robb, G.N., McDonald, R.A., Chamberlain, D.E., Reynolds, S.J., Harrison, T.J.E., Bearhop, S., 2008. Winter feeding of birds increases productivity in the subsequent breeding season. *Biology Letters* 4, 220–223. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2007.0622>
- Robertson, R.J., Rendell, W.B., 2001. A long-term study of reproductive performance in tree swallows: the influence of age and senescence on output. *Journal of Animal Ecology* 70, 1014–1031. <https://doi.org/10.1046/j.0021-8790.2001.00555.x>
- Rodewald, A.D., Kearns, L.J., Shustack, D.P., Shustack2, D.P., 2011. Anthropogenic resource subsidies decouple predator-prey relationships. *Source: Ecological Applications* 21, 936–943.
- Roth, M., 2012. Urban heat islands, in: *Handbook of Environmental Fluid Dynamics: Systems, Pollution, Modeling, and Measurements*. Routledge, pp. 143–161. <https://doi.org/10.1201/b13691>
- Ruuskanen, S., Espín, S., Sánchez-Virosta, P., Sarraude, T., Hsu, B.Y., Pajunen, P., Costa, R.A., Eens, M., Hargitai, R., Török, J., Eeva, T., 2019. Transgenerational endocrine disruption: Does elemental pollution affect egg or nestling thyroid hormone levels in a wild songbird? *Environmental Pollution* 247, 725–735. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.01.088>

- Ruuskanen, S., Hsu, B.-Y., 2018. Maternal thyroid hormones - an unexplored mechanism underlying maternal effects in an ecological framework. *Physiological and Biochemical Zoology* 91, 697380. <https://doi.org/10.1086/697380>
- S. F. MacLean, Jr., Seastedt, T.R., 2015. Avian Territoriality: Sufficient Resources or Interference Competition. *https://doi.org/10.1086/283478* 114, 308–312. <https://doi.org/10.1086/283478>
- Salmón, P., Nilsson, J.F., Nord, A., Bensch, S., Isaksson, C., 2016. Urban environment shortens telomere length in nestling great tits, *Parus major*. *Biology Letters* 12, 20160155. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2016.0155>
- Salmón, P., Nilsson, J.F., Watson, H., Bensch, S., Isaksson, C., 2017. Selective disappearance of great tits with short telomeres in urban areas. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 284. <https://doi.org/10.1098/rspb.2017.1349>
- Salmón, P., Stroh, E., Herrera-Dueñas, A., von Post, M., Isaksson, C., 2018a. Oxidative stress in birds along a NO<sub>x</sub> and urbanisation gradient: An interspecific approach. *Science of the Total Environment* 622–623, 635–643. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.354>
- Salmón, P., Watson, H., Nord, A., Isaksson, C., 2018b. Effects of the Urban Environment on Oxidative Stress in Early Life: Insights from a Cross-fostering Experiment. *Integrative and Comparative Biology* 58, 986–994. <https://doi.org/10.1093/icb/icy099>
- Samson, S.L.A., Gedamu, L., 1997. Molecular Analyses of Metallothionein Gene Regulation. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 59, 257–288. [https://doi.org/10.1016/S0079-6603\(08\)61034-X](https://doi.org/10.1016/S0079-6603(08)61034-X)
- Sánchez-Virosta, P., Espín, S., Ruiz, S., Salminen, J.P., García-Fernández, A.J., Eeva, T., 2018. Experimental manipulation of dietary arsenic levels in great tit nestlings: Accumulation pattern and effects on growth, survival and plasma biochemistry. *Environmental Pollution* 233, 764–773. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.10.113>
- Saulnier, A., Bleu, J., Boos, A., El Masoudi, I., Ronot, P., Zahn, S., Del Nero, M., Massemin, S., 2020. Consequences of trace metal cocktail exposure in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) and effect of calcium supplementation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 193, 110357. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2020.110357>
- Schagdarsurenjin, U., Steger, K., 2016. Epigenetics in male reproduction: effect of paternal diet on sperm quality and offspring health. *Nature Reviews Urology* 2016 13:10 13, 584–595. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2016.157>
- Schaper, S. V., Dawson, A., Sharp, P.J., Gienapp, P., Caro, S.P., Visser, M.E., 2012. Increasing temperature, not mean temperature, is a cue for avian timing of reproduction. *The American naturalist* 179. <https://doi.org/10.1086/663675>

- Scheuhammer, A.M., 1996. Influence of reduced dietary calcium on the accumulation and effects of lead, cadmium, and aluminum in birds. *Environmental Pollution* 94, 337–343. [https://doi.org/10.1016/S0269-7491\(96\)00084-X](https://doi.org/10.1016/S0269-7491(96)00084-X)
- Scheuhammer, A.M., 1991. Effects of acidification on the availability of toxic metals and calcium to wild birds and mammals. *Environmental Pollution* 71, 329–375. [https://doi.org/10.1016/0269-7491\(91\)90036-V](https://doi.org/10.1016/0269-7491(91)90036-V)
- Schlicht, L., Kempenaers, B., 2020. The effects of season, sex, age and weather on population-level variation in the timing of activity in Eurasian Blue Tits *Cyanistes caeruleus*. *Ibis* 162, 1146–1162. <https://doi.org/10.1111/IBI.12818>
- Schroeder, J., Nakagawa, S., Cleasby, I.R., Burke, T., 2012. Passerine birds breeding under chronic noise experience reduced fitness. *PLoS ONE* 7, e39200. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0039200>
- Sepp, T., McGraw, K.J., Kaasik, A., Giraudeau, M., 2017. A review of urban impacts on avian life-history evolution: Does city living lead to slower pace of life? *Global Change Biology* 24, 1452–1469. <https://doi.org/10.1111/gcb.13969>
- Seress, G., Bókony, V., Pipoly, I., Szép, T., Nagy, K., Liker, A., 2012. Urbanization, nestling growth and reproductive success in a moderately declining house sparrow population. *Journal of Avian Biology* 43, 403–414. <https://doi.org/10.1111/j.1600-048X.2012.05527.x>
- Seress, G., Sándor, K., Evans, K.L., Liker, A., 2020. Food availability limits avian reproduction in the city: An experimental study on great tits *Parus major*. *Journal of Animal Ecology* 89, 1570–1580. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13211>
- Shao, Y.Z., Zhao, H.J., Wang, Y., Liu, J.J., Li, J.L., Luo, L.Y., Xing, M.W., 2018. The apoptosis in arsenic-induced oxidative stress is associated with autophagy in the testis tissues of chicken. *Poultry Science* 97, 3248–3257. <https://doi.org/10.3382/ps/pey156>
- Sharma, R., Agarwal, A., Rohra, V.K., Assidi, M., Abu-Elmagd, M., Turki, R.F., 2015. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. *Reproductive Biology and Endocrinology*. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0028-x>
- Shochat, E., 2004. Credit or debit? Resource input changes population dynamics of city-slicker birds. *Oikos* 106, 622–626. <https://doi.org/10.1111/j.0030-1299.2004.13159.x>
- Shochat, E., Lerman, S., Fernández-Juricic, E., 2015a. Birds in Urban Ecosystems: Population Dynamics, Community Structure, Biodiversity, and Conservation. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 75–86. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr55.c4>
- Shochat, E., Lerman, S., Fernández-Juricic, E., 2015b. Birds in urban ecosystems: Population dynamics, community structure, biodiversity, and conservation, in: *Urban Ecosystem Ecology, Agronomy Monograph*. American Society of Agronomy, Crop Science Society of America, Soil Science Society of America, pp. 75–86. <https://doi.org/10.2134/agronmonogr55.c4>

- Shochat, E., Warren, P.S., Faeth, S.H., McIntyre, N.E., Hope, D., 2006. From patterns to emerging processes in mechanistic urban ecology. *Trends in ecology & evolution* 21, 186–191. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2005.11.019>
- Shriver, W.G., Ladin, Z.S., Buler, J., D'Amico, V., 2020. Non-native shrubs and calcium availability are important for birds breeding in urban forests. *Urban Ecosystems* 2020 24:3 24, 429–440. <https://doi.org/10.1007/S11252-020-01049-4>
- Sih, A., Bell, A., Johnson, J.C., 2004. Behavioral syndromes: an ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution* 19, 372–378. <https://doi.org/10.1016/J.TREE.2004.04.009>
- Sild, E., 2011. Oxidative defences in immunoeological context: validation and application of assays for nitric oxide production and oxidative burst in a wild passerine. University of Tartu, Estonia.
- Simmons, L.W., Fitzpatrick, J.L., 2012. Sperm wars and the evolution of male fertility. *Reproduction* (Cambridge, England) 144, 519–534. <https://doi.org/10.1530/REP-12-0285>
- Six, K.M., Goyer, R.A., 1970. Experimental enhancement of lead toxicity by low dietary calcium. *Journal of Laboratory and Clinical medicine* 76, 933–942. <https://doi.org/10.5555/URI:PII:0022214370902301>
- Snoeijs, T., Dauwe, T., Pinxten, R., Darras, V.M., Arckens, L., Eens, M., 2005. The combined effect of lead exposure and high or low dietary calcium on health and immunocompetence in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *Environmental Pollution* 134, 123–132. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2004.07.009>
- Sol, D., Lapedra, O., Ducatez, S., 2020. Cognition and adaptation to urban, in: *Urban Evolutionary Biology*.
- Sorace, A., 2002. High density of bird and pest species in urban habitats and the role of predator abundance. *Ornis Fennica* 79, 60–71.
- Spencer, K.A., Verhulst, S., 2008. Post-natal exposure to corticosterone affects standard metabolic rate in the zebra finch (*Taeniopygia guttata*). *General and Comparative Endocrinology* 159, 250–256. <https://doi.org/10.1016/J.YGCEN.2008.09.007>
- Stankevičiūtė, M., Sauliūtė, G., Makaras, T., Markuckas, A., Virbickas, T., Baršienė, J., 2018. Responses of biomarkers in Atlantic salmon (*Salmo salar*) following exposure to environmentally relevant concentrations of complex metal mixture (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd). Part II. *Ecotoxicology* 27, 1069–1086. <https://doi.org/10.1007/s10646-018-1960-2>
- Stankevičiūtė, M., Sauliūtė, G., Svecevičius, G., Kazlauskienė, N., Baršienė, J., 2017. Genotoxicity and cytotoxicity response to environmentally relevant complex metal mixture (Zn, Cu, Ni, Cr, Pb, Cd) accumulated in Atlantic salmon (*Salmo salar*). Part I: importance of exposure time and tissue dependence. *Ecotoxicology* 26, 1051–1064. <https://doi.org/10.1007/s10646-017-1833-0>
- Stauffer, J., Panda, B., Eeva, T., Rainio, M.J., Ilmonen, P., 2017. Telomere damage and redox status alterations in free-living passerines exposed to metals. *Science of the Total Environment* 575, 841–848. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.09.131>

- Stauss, M.J., Burkhardt, J.F., Tomiuk, J., 2005. Foraging flight distances as a measure of parental effort in blue tits *Parus caeruleus* differ with environmental conditions. *Journal of Avian Biology* 36, 47–56. <https://doi.org/10.1111/j.0908-8857.2005.02855.x>
- Stephenson, R., 1997. Effects of oil and other surface-active organic pollutants on aquatic birds. *Environmental Conservation* 24, 121–129. <https://doi.org/10.1017/S0376892997000180>
- Stier, A., Delestrade, A., Zahn, S., Arrivé, M., Criscuolo, F., Massemin-Challet, S., 2014. Elevation impacts the balance between growth and oxidative stress in coal tits. *Oecologia* 175, 791–800. <https://doi.org/10.1007/s00442-014-2946-2>
- Stier, A., Massemin, S., Zahn, S., Tissier, M.L., Criscuolo, F., 2015. Starting with a handicap: effects of asynchronous hatching on growth rate, oxidative stress and telomere dynamics in free-living great tits. *Oecologia* 179, 999–1010. <https://doi.org/10.1007/s00442-015-3429-9>
- Stohs, S.J., Bagchi, D., 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radical Biology and Medicine*. [https://doi.org/10.1016/0891-5849\(94\)00159-H](https://doi.org/10.1016/0891-5849(94)00159-H)
- Stracey, C.M., 2011. Resolving the urban nest predator paradox: The role of alternative foods for nest predators. *Biological Conservation* 144, 1545–1552. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCON.2011.01.022>
- Strasser, E.H., Heath, J.A., 2013. Reproductive failure of a human-tolerant species, the American kestrel, is associated with stress and human disturbance. *Journal of Applied Ecology* 50, 912–919. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12103>
- Sudyka, J., 2019. Does reproduction shorten telomeres? Towards integrating individual quality with life-history strategies in telomere biology. *BioEssays* 41, 1900095. <https://doi.org/10.1002/bies.201900095>
- Sukopp, H., 1998. Urban Ecology — Scientific and Practical Aspects, in: *Urban Ecology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 3–16. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-88583-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-642-88583-9_1)
- Suljević, D., Handžić, N., Fočak, M., Lasić, I., Sipović, F., Sulejmanović, J., Begić, S., Alijagic, A., 2020. Lead Exposure Influences Serum Biomarkers, Hepatocyte Survival, Bone Marrow Hematopoiesis, and the Reproductive Cycle in Japanese Quails. *Biological Trace Element Research* 2020 199:4 199, 1574–1583. <https://doi.org/10.1007/S12011-020-02272-Y>
- Sumasgutner, P., Nemeth, E., Tebb, G., Krenn, H.W., Gamauf, A., 2014. Hard times in the city-attractive nest sites but insufficient food supply lead to low reproduction rates in a bird of prey. *Journal of Wildlife Rehabilitation* 34, 17–31. <https://doi.org/10.1186/1742-9994-11-48>
- Szulkin, M., Munshi-South, J., Charmantier, A., 2020. *Urban Evolutionary Biology*, Oxford Uni. ed, *Urban Evolutionary Biology*. <https://doi.org/10.1093/oso/9780198836841.001.0001>
- Taylor, V., Goodale, B., Raab, A., Schwerdtle, T., Reimer, K., Conklin, S., Karagas, M.R., Francesconi, K.A., 2017. Human exposure to organic arsenic species from seafood. *Science of The Total Environment* 580, 266–282. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2016.12.113>

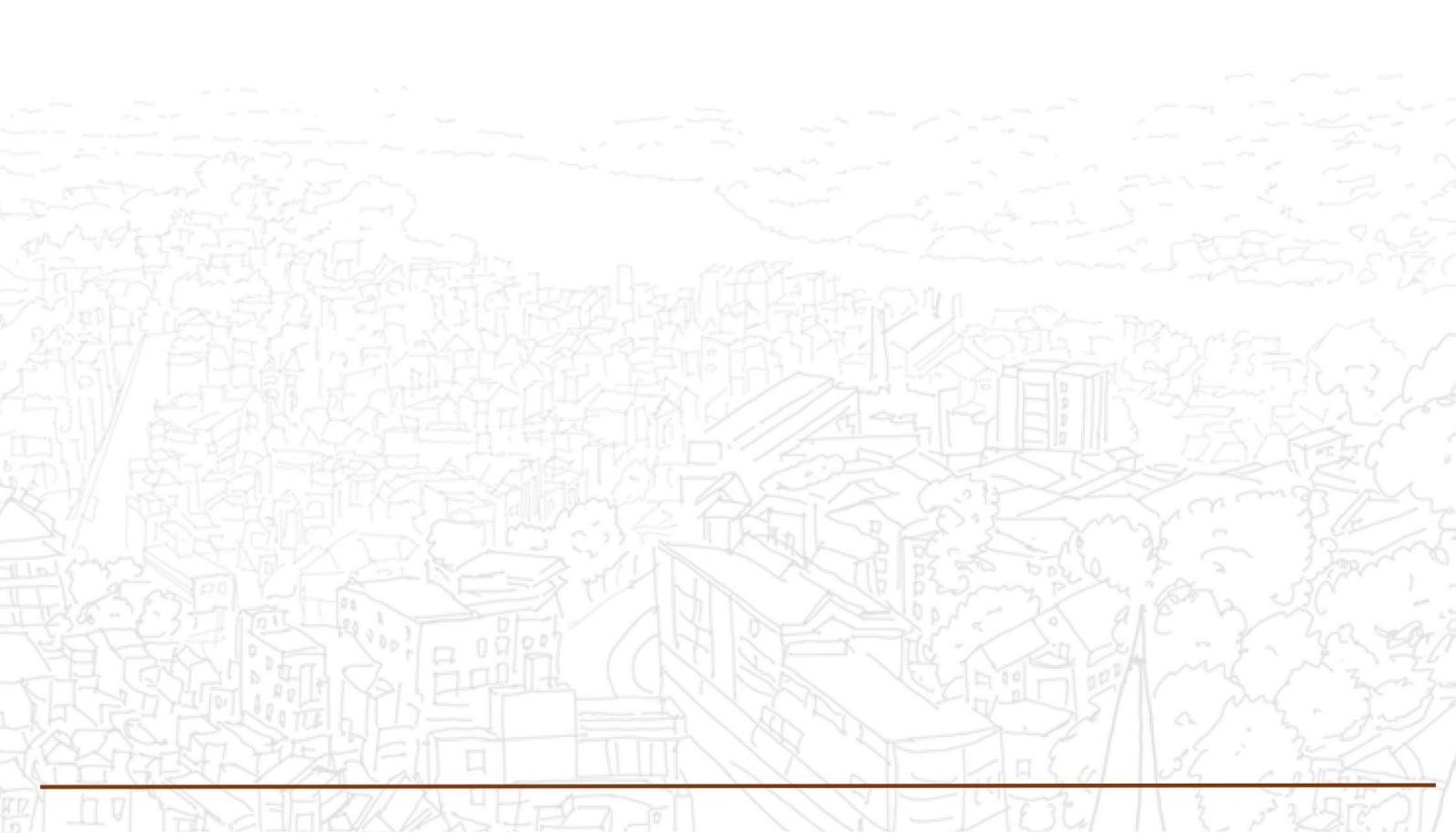
- Thierry, A.-M.M., Massemin, S., Handrich, Y., Raclot, T., 2013. Elevated corticosterone levels and severe weather conditions decrease parental investment of incubating Adélie penguins. *Hormones and Behavior* 63, 475–483. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2012.12.011>
- Thilagavathi, J., Kumar, M., Mishra, S.S., Venkatesh, S., Kumar, R., Dada, R., 2013. Analysis of sperm telomere length in men with idiopathic infertility. *Archives of Gynecology and Obstetrics* 287, 803–807. <https://doi.org/10.1007/s00404-012-2632-8>
- Thomas, D.W., Blondel, J., Perret, P., Lambrechts, M.M., Speakman, J.R., 2001. Energetic and fitness costs of mismatching resource supply and demand in seasonally breeding birds. *Science* 291, 2598–2600. <https://doi.org/10.1126/science.1057487>
- Thompson, M.J., Capilla-Lasheras, P., Dominoni, D.M., Réale, D., Charmantier, A., 2022. Phenotypic variation in urban environments: mechanisms and implications. *Trends in Ecology and Evolution* 37, 171–182. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2021.09.009>
- Titulaer, M., Spoelstra, K., Lange, C.Y.M.J.G., Visser, M.E., 2012. Activity patterns during food provisioning are affected by artificial light in free living great tits (*parus major*). *PLoS ONE* 7, 5–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0037377>
- Toledo, A., Andersson, M.N., Wang, H.L., Salmón, P., Watson, H., Burdge, G.C., Isaksson, C., 2016. Fatty acid profiles of great tit (*Parus major*) eggs differ between urban and rural habitats, but not between coniferous and deciduous forests. *Science of Nature* 103, 1–11. <https://doi.org/10.1007/s00114-016-1381-0>
- Tricola, G.M., Simons, M.J.P., Atema, E., Boughton, R.K., Brown, J.L., Dearborn, D.C., Divoky, G., Eimes, J.A., Huntington, C.E., Kitaysky, A.S., Juola, F.A., Lank, D.B., Litwa, H.P., Mulder, E.G.A., Nisbet, I.C.T., Okanoya, K., Safran, R.J., Schoech, S.J., Schreiber, E.A., Thompson, P.M., Verhulst, S., Wheelwright, N.T., Winkler, D.W., Young, R., Vleck, C.M., Haussmann, M.F., 2018. The rate of telomere loss is related to maximum lifespan in birds. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 373. <https://doi.org/10.1098/rstb.2016.0445>
- Ulpiani, G., 2021. On the linkage between urban heat island and urban pollution island: Three-decade literature review towards a conceptual framework. *Science of The Total Environment* 751, 141727. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.141727>
- Vallverdú-Coll, N., Mougeot, F., Ortiz-Santaliestra, M.E., Castaño, C., Santiago-Moreno, J., Mateo, R., 2016. Effects of lead exposure on sperm quality and reproductive success in an avian model. *Environmental Science and Technology* 50, 12484–12492. <https://doi.org/10.1021/acs.est.6b04231>
- Vanparys, C., Dauwe, T., Van Campenhout, K., Bervoets, L., De Coen, W., Blust, R., Eens, M., 2008. Metallothioneins (MTs) and  $\delta$ -aminolevulinic acid dehydratase (ALAd) as biomarkers of metal pollution in great tits (*Parus major*) along a pollution gradient. *Science of the Total Environment* 401, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2008.04.009>
- Vašák, M., 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 19, 13–17. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2005.03.003>

- Vedder, O., 2012. Individual birds advance offspring hatching in response to increased temperature after the start of laying. *Oecologia* 170, 619–628. <https://doi.org/10.1007/s00442-012-2335-7>
- Vedder, O., Verhulst, S., Bauch, C., Bouwhuis, S., 2017. Telomere attrition and growth: a life-history framework and case study in common terns. *Journal of Evolutionary Biology* 30, 1409–1419. <https://doi.org/10.1111/jeb.13119>
- Velando, A., Drummond, H., Torres, R., 2006. Senescent birds redouble reproductive effort when ill: confirmation of the terminal investment hypothesis. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 273, 1443–1448. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2006.3480>
- Verhulst, S., van Balen, J.H., Tinbergen, J.M., 1995. Seasonal Decline in Reproductive Success of the Great Tit: Variation in Time or Quality? *Ecology* 76, 2392–2403. <https://doi.org/10.2307/2265815>
- Victory, W., Thomas, D., Schoeps, P., Vander, A.J., 1982. Lead Increases Urinary Zinc Excretion in Rats. *Biological traces element research* 4, 211–219. [https://doi.org/0163-4984/82/6900~\)211](https://doi.org/0163-4984/82/6900~)211)
- Visser, M.E., Holleman, L.J.M., Caro, S.P., 2009. Temperature has a causal effect on avian timing of reproduction. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276, 2323–2331. <https://doi.org/10.1098/RSPB.2009.0213>
- Visser, M.E., Holleman, L.J.M., Gienapp, P., 2006. Shifts in caterpillar biomass phenology due to climate change and its impact on the breeding biology of an insectivorous bird. *Oecologia* 147, 164–172. <https://doi.org/10.1007/S00442-005-0299-6/FIGURES/4>
- Visser, M. E., te Marvelde, L., & Lof, M. E. (2012). Adaptive phenological mismatches of birds and their food in a warming world. *Journal of Ornithology*, 153(S1), 75–84. <https://doi.org/10.1007/s10336-011-0770-6>
- Vitousek, P.M., Mooney, H.A., Lubchenco, J., Melillo, J.M., 1997. Human Domination of Earth's Ecosystems. *Science* 277, 494–499. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.277.5325.494>
- von Zglinicki, T., 2002. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 339–344. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(02\)02110-2](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(02)02110-2)
- Vos, J.G., 1972. Toxicology of PCBs for Mammals and for Birds. *Environmental Health Perspectives* 1, 105–117. <https://doi.org/10.1289/ehp.7201105>
- Wah Chu, K., Chow, K.L., 2002. Synergistic toxicity of multiple heavy metals is revealed by a biological assay using a nematode and its transgenic derivative. *Aquatic Toxicology* 61, 53–64. [https://doi.org/10.1016/S0166-445X\(02\)00017-6](https://doi.org/10.1016/S0166-445X(02)00017-6)
- Waisberg, M., Joseph, P., Hale, B., Beyersmann, D., 2003. Molecular and cellular mechanisms of cadmium carcinogenesis. *Toxicology* 192, 95–117. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00305-6](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00305-6)

- Walsberg, G.E., Wolf, B.O., 1995. Variation in the respiratory quotient of birds and implications for indirect calorimetry using measurements of carbon dioxide production. *Journal of Experimental Biology* 198, 213–219. <https://doi.org/10.1242/jeb.198.1.213>
- Wani, A.L., Hammad Ahmad Shadab, G.G., Afzal, M., 2021. Lead and zinc interactions – An influence of zinc over lead related toxic manifestations. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology* 64, 126702. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126702>
- Watson, J.D., 1972. Origin of Concatemeric T7DNA. *Nature New Biology* 1972 239:94 239, 197–201. <https://doi.org/10.1038/newbio239197a0>
- Wawrzyniak, J., Gładalski, M., Kaliński, A., Bańbura, M., Markowski, M., Skwarska, J., Zieliński, P., Bańbura, J., 2020. Differences in the breeding performance of great tits *Parus major* between a forest and an urban area: a long term study on first clutches. *The European Zoological Journal* 87, 294–309. <https://doi.org/10.1080/24750263.2020.1766125>
- Wawrzyniak, J., Kaliński, A., Gładalski, M., Bańbura, M., Markowski, M., Skwarska, J., Zieliński, P., Cyżewska, I., Bańbura, J., 2015b. Long-Term Variation in Laying Date and Clutch Size of the Great Tit *Parus major* in Central Poland: A Comparison between Urban Parkland and Deciduous Forest. *Ardeola* 62, 311–322. <https://doi.org/10.13157/arla.62.2.2015.311>
- Weart, S., 2003. The Discovery of Rapid Climate Change. *Physics Today* 56, 30–36. <https://doi.org/10.1063/1.1611350>
- Welbers, A.A.M.H., van Dis, N.E., Kolvoort, A.M., Ouyang, J., Visser, M.E., Spoelstra, K., Dominoni, D.M., 2017. Artificial light at night reduces daily energy expenditure in breeding great tits (*Parus major*). *Frontiers in Ecology and Evolution* 5, 55. <https://doi.org/10.3389/FEVO.2017.00055/BIBTEX>
- Welcker, J., Chastel, O., Gabrielsen, G.W., Guillaumin, J., Kitaysky, A.S., Speakman, J.R., Tremblay, Y., Bech, C., 2013. Thyroid Hormones Correlate with Basal Metabolic Rate but Not Field Metabolic Rate in a Wild Bird Species. *PLoS ONE* 8, e56229. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056229>
- Wilson, A.J., Nussey, D.H., 2010. What is individual quality? An evolutionary perspective. *Trends in Ecology & Evolution* 25, 207–214. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2009.10.002>
- Wingfield, J.C., 1988. Changes in reproductive function of free-living birds in direct response to environmental perturbations. Springer, New York, NY, pp. 121–148. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3740-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-3740-2_7)
- Yang, Y., Zhang, W., Wang, S., Zhang, H., Zhang, Y., 2020. Response of male reproductive function to environmental heavy metal pollution in a free-living passerine bird, *Passer montanus*. *Science of The Total Environment* 747, 141402. <https://doi.org/10.1016/j.SCITOTENV.2020.141402>
- Yenice, E., Mizrak, C., Gültekin, M., Atik, Z., Tunca, M., 2015. Effects of dietary organic or inorganic manganese, zinc, copper and chrome supplementation on the performance, egg quality and hatching characteristics of laying breeder hens. *Ankara Üniv Vet Fak Derg* 62, 63–68.

## Bibliographie

- Yoo, S., 2018. Investigating important urban characteristics in the formation of urban heat islands: a machine learning approach. *Journal of Big Data* 5, 1–24. <https://doi.org/10.1186/S40537-018-0113-Z/TABLES/3>
- Zuur, A.F., Ieno, E.N., Walker, N.J., Saveliev, A.A., Smith, G.M., 2009. *Mixed effects models and extension in ecology with R*, First Edit. ed. Springer. <https://doi.org/10.1017/CB09781107415324.004>



---

# ANNEXES

---





# Annexes manuscrit 1

---

## Reproductive differences between urban and forest birds across the years: importance of environmental and weather parameters

Agnès Saulnier\*<sup>1</sup>, Josefa Bleu<sup>1,2</sup>, Anne Boos <sup>1,2</sup>, Maurice Millet<sup>2,3</sup>, Sandrine Zahn<sup>1,2</sup>, Pascale Ronot<sup>1,2</sup>, Islah El Masoudi<sup>1</sup>, Emilio R. Rojas<sup>1,4</sup>, Pierre Uhlrich<sup>1,2</sup>, Mirella Del Nero<sup>1,2</sup>, Sylvie Massemin<sup>1,2</sup>

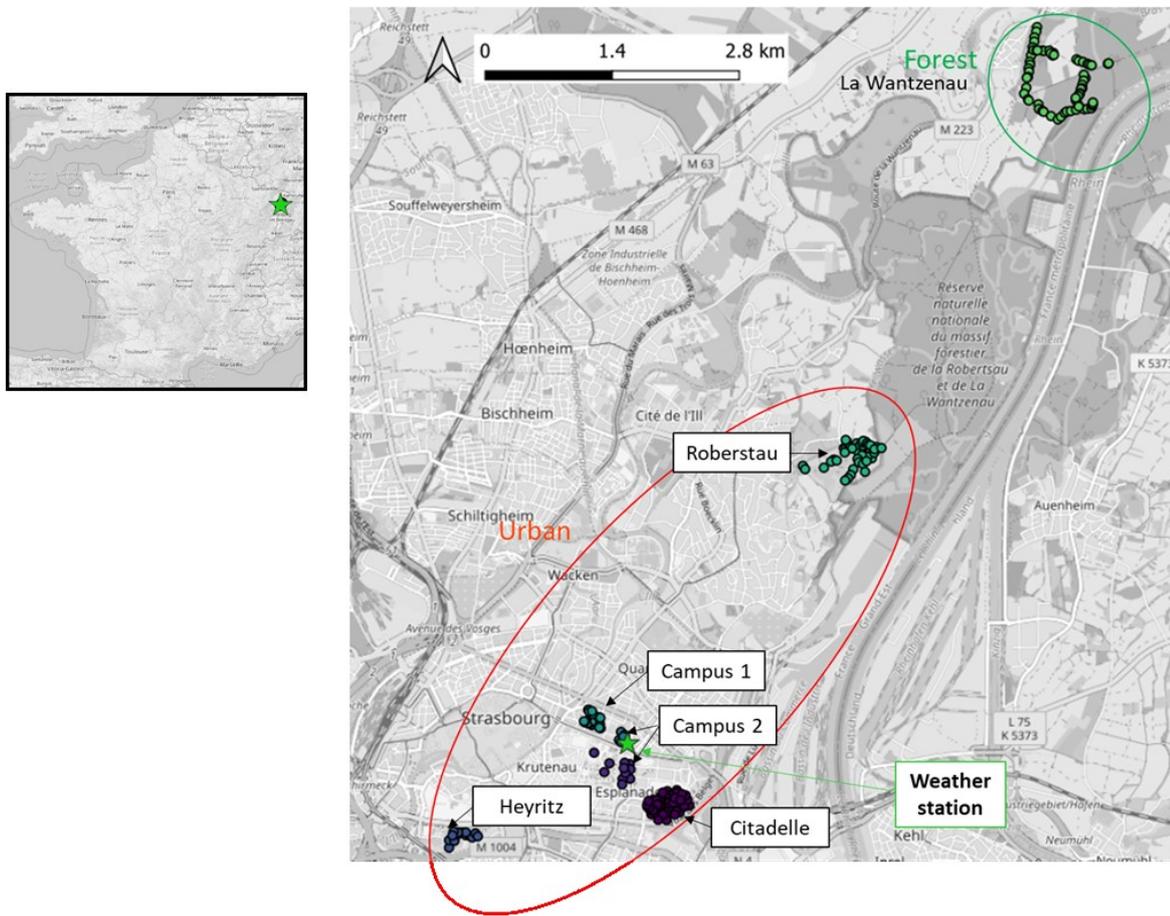
### Appendix A) Study sites and occupation of nestboxes

#### A.1) Occupation of nestboxes during the three years of the study

		Success ( <i>P.major</i> )	Failure ( <i>P.major</i> )	Predation/ Parental death ( <i>P.major</i> )	Non Occupied / Other species	Total
Urban	2015	15	6	0	30	51
	2016	12	17	2	48	79
	2018	23	5	0	62	90
	2019	37	16	0	71	124
Forest	2015	16	0	1	8	25
	2016	16	12	1	25	54
	2018	17	4	5	23	49
	2019	34	2	1	23	60

**A.2) Maps and coordinates of the different study sites. The urban site was composed of several groups of nestboxes in different urban parks and roads of Strasbourg (France)**

Site	Sub-site	Coordinates (lat. long.)	Type	years
Urban	Campus 1	48.5843209°;7.76366473°	Urban square	2015-2016-2018-2019
	Campus 2	48.5793147°;7.76771816°	University campus	2015-2016-2018-2019
	Citadelle	48.5759021°;7.77478846°	Urban park	2018-2019
	Heyritz	48.5727264°;7.74411567°	Urban square	2018-2019
	La Robertsau	48.6106693°;7.80285278°	Suburban park	2015-2016-2019
Forest	La Wantzenau	48.6479622°;7.83366664°	Alluvial forest	2015-2016-2018-2019
Weather station		48.5819444° 7.7688889 °		2015-2016-2018-2019



## Appendix B) Details of ICP-MS analysis of biological samples

### B. 1) Operational conditions of ICP-MS analysis

ICP-MS	Agilent 7700
RF Power	1550 W
Sampling and skimmer cones	Nickel
Nebulizer	MicroMist
Spray chamber	Scott double-pass, quartz
Plasma Gas	15.0 L/min
Nebulizer Gas	1.03 L/min
Makeup Gas	0.00 L/min
Auxiliary Gas	0.9 L/min
Spray chamber temp	2 °C
Sampling depth	8 mm
Dwell time	0.003 s
Isotopes	<sup>27</sup> Al <sup>75</sup> As <sup>137</sup> Ba <sup>111</sup> Cd <sup>140</sup> Ce <sup>53</sup> Cr <sup>59</sup> Co <sup>63</sup> Cu <sup>208</sup> Pb <sup>95</sup> Mo <sup>60</sup> Ni <sup>85</sup> Rb <sup>88</sup> Sr <sup>51</sup> V <sup>66</sup> Zn
ORS mode	He collision ORS <sub>3</sub> for As, Cr, Co, Cr, Cu, Ni, V and Zn ; no gas for Ba, Cd, Ce, Pb, Mo, Rb and Sr
Nebulizer Pump	0.10 rps

### B.2) LOD of the ICP-MS analysis

Isotope	LOD (µg/kg)
<sup>27</sup> Al [ No Gas ]	1
<sup>51</sup> V [ He ]	0.01
<sup>53</sup> Cr [ He ]	0.05
<sup>59</sup> Co [ He ]	0.01
<sup>60</sup> Ni [ He ]	0.05
<sup>63</sup> Cu [ He ]	0.5
<sup>66</sup> Zn [ He ]	1
<sup>75</sup> As [ He ]	0.03
<sup>85</sup> Rb [ No Gas ]	0.1
<sup>88</sup> Sr [ No Gas ]	0.05
<sup>95</sup> Mo [ No Gas ]	0.01
<sup>111</sup> Cd [ No Gas ]	0.1
<sup>137</sup> Ba [ No Gas ]	0.1
<sup>140</sup> Ce [ No Gas ]	0.1
<sup>208</sup> Pb [ No Gas ]	0.1

## Appendix C) Summary of the principal components analyses of environmental parameters

### C.1) PCA of air pollutant – List of pollutants detected in each category and results of the PCA

**Notes:** Four types of pollutants were measured with the XAD-2<sup>®</sup> passive air sampler and classified in eight categories according to their characteristics and their toxicity: **the polychlorinated biphenyls (PCB)** separated as dioxin-like PCBs (DL-PCBs) and non-dioxin-like PCBs (NDL-PCBs), **polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH)**, **organochlorines pesticides (OCCs)** and **non-organochlorines pesticides** components separated as insecticides, herbicides and fungicides.

DL-PCB	NDL-PCB	PAH	OCCs	Insecticides	Herbicides	Fungicides
PCB 81	PCB 18	Naphtalene	α-HCH	Acetamidiprid	2,4 MPCA*	Azoxystrobin
PCB 123	PCB 31	Acenaphtene	Hexachlorobenzene	Aldrine	2,4D*	Boscalid
PCB 118	PCB 28	Fluorene	γ-HCH	Bifenthrin	Acetochlore	Bupirimate
PCB 114	PCB 52	Phenanthrene	β-HCH	Buprofezin	Aclonifen	Captan
PCB 105	PCB 44	Anthracene	δ-HCH	Chlorfenvinphos	Alachlore	Carbendazim
PCB 126	PCB 70	Fluoranthene	Heptachlore	Chlorpyriphos	Benoxacor	Chlorothalonil
PCB 167	PCB 101	Pyrene	Aldrine	Clofentezine	Bifenox	Cyazofamid
PCB 156	PCB 149	Benzo(a)anthracene	Heptachlore epoxyde B	Deltamethrin	Bromoxynil*	Cyproconazole*
PCB 157	PCB 153	Chrysene	Heptachlore epoxyde A	Dichlorvos	Carbetamide	Cyprodinil
PCB 169	PCB 138	Benzo(b)fluoranthene	o,p'-DDE	Diflubenzuron	Chloridazon	Dimethomorph
PCB 189	PCB 180	Benzo(k)fluoranthene	Transchlordan	Fenpropathrine	Chloridazone	Dimoxystrobin
		Benzo(e)pyrene	Cischlordane	Flufenoxuron	Chloroprotham	Diphenconazole
		Benzo(a)pyrene	α-endosulfan	Isodrine	Chlorotoluron	Diphenylamine
		Dibenzo(a,h)anthracene	o,p'-DDD	Isoxadifen	Clomazone	Epoxiconazole
		Indenol(1,2,3)pyrene	p,p'-DDE	Lambda-cyalo	Desm-Phen	Etridiazole
		Benzo(g,h,i)perylene	Dieldrine	Lindane	Dicamba	Fenarimol
		Coronene	o,p'-DDT	Lufenuron	Diclofop-methyl	Fenpropidine
			p,p'-DDD	Propargite	Diflufenican	Fenpropimorphe
			β-endosulfan	Pymetrozine	Dimethenamid-P	Fluodioxonyl
			p,p'-DDT	Pymetrozine	Diuron	Fluzilazole
			Metoxychlore	Spinosad A	DPMU	Folpet
				Spinosad D	Ethofumesate	Kresoxim-methyl
				Tebufenpyrad	Florasulam	Mepanipyrim
				Thiacloprid	Fluroxypyr	Meta-M
				Thiamethoxam	Foramsulfuron	Metconazole
					Ioxinil*	Myclobutanil
					Irgarol	Penconazole
					Isoproturon	Propiconazole
					Lenacil	Propiconazole
					Mecoprop-p*	Prothioconazole
					Metamitrone	Pyraclostrobine
					Metazachlore	Pyrimethanil
					Nicosulfuron	Quinoxifene
					Oxadiazon	Spiroxamine
					Oxyfluorfen	Tebuconazole
					Pendimethalin	Tetraconazole
					Procymidon	Tolyfluanid
					Propachlore	Trifloxystrobin
					Propyzamid	
					Prosulfocarb	
					s-Metolachlor	
					Sulcotrione	
					Tebutam	
					Terbutryn	
					Triclopyr*	
					Triflsulfuron-Met	
					Trifluraline	

	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>	<b>cos2_PC1</b>	<b>contrib_PC1</b>	<b>cos2_PC2</b>	<b>contrib_PC2</b>
<b>COC</b>	0.822	-0.369	0.675	24.267	0.136	6.218
<b>DL-PCB</b>	0.717	-0.511	0.514	18.473	0.261	11.907
<b>Fungicides</b>	0.493	0.618	0.243	8.726	0.382	17.420
<b>Herbicides</b>	0.741	0.561	0.549	19.745	0.315	14.367
<b>PAH</b>	-0.341	-0.391	0.116	4.181	0.153	6.976
<b>Insecticides</b>	0.316	0.790	0.100	3.579	0.624	28.464
<b>NDL-PCB</b>	0.765	-0.567	0.585	21.030	0.321	14.649

## C.2) PCA and metal concentrations in leaves and preys

<b>Name</b>	<b>PC1</b>	<b>PC2</b>	<b>cos2_PC1</b>	<b>contrib_PC1</b>	<b>cos2_PC2</b>	<b>contrib_PC2</b>
<b>Aluminium (Al)</b>	0.919	-0.017	0.845	10.728	0.000	0.012
<b>Arsenic (As)</b>	0.277	-0.561	0.077	0.975	0.315	12.566
<b>Barium (Ba)</b>	0.675	-0.168	0.455	5.778	0.028	1.123
<b>Cadmium (Cd)</b>	0.390	0.708	0.152	1.928	0.501	19.981
<b>Cerium (Ce)</b>	0.924	-0.234	0.853	10.832	0.055	2.193
<b>Chromium (Cr)</b>	0.910	0.145	0.827	10.504	0.021	0.837
<b>Cobalt (Co)</b>	0.876	0.000	0.767	9.733	0.000	0.000
<b>Copper (Cu)</b>	0.581	0.714	0.338	4.291	0.510	20.355
<b>Molybdenum (Mo)</b>	0.246	-0.442	0.060	0.768	0.195	7.798
<b>Nickel (Ni)</b>	0.919	0.056	0.845	10.732	0.003	0.125
<b>Lead (Pb)</b>	0.726	-0.535	0.527	6.689	0.286	11.430
<b>Rubidium (Rb)</b>	0.695	0.304	0.483	6.135	0.093	3.697
<b>Strontium (Sr)</b>	0.650	-0.219	0.423	5.368	0.048	1.922
<b>Vanadium (V)</b>	0.936	-0.315	0.875	11.117	0.099	3.956
<b>Zinc (Zn)</b>	0.590	0.592	0.348	4.422	0.351	14.007

Table C.2- Concentration of metals in leaves and preys

		Mean (SD)								
Site	Tissue	N	Al (mg/kg)	As (mg/kg)	Ba (mg/kg)	Cd (mg/kg)	Ce (mg/kg)	Cr (mg/kg)	Co (mg/kg)	Cu (mg/kg)
Urban	Spiders	10	17 (30)	0.2 (0.2)	5 (8)	0.5 (0.2)	0.04 (0.04)	0.1 (0.1)	0.02 (0.02)	19 (11)
	Caterpillars	9	3 (3)	0.1 (0.1)	1 (2)	0 (0)	0 (0)	0.01 (0.02)	0 (0)	2 (1)
	Leaves	5	5 (0)	1(0.4)	4 (3)	0 (0)	0.07 (0.1)	0.1 (0.2)	0.04 (0.04)	6 (4)
Forest	Spiders	6	24 (25)	0.11 (0.09)	2 (1)	0.5 (0.2)	0.05 (0.04)	0.2 (0.1)	0.04 (0.04)	23 (11)
	Caterpillars	6	7 (15)	0.3 (0.4)	0.4 (0.6)	0.06 (0.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	8 (9)
	Leaves	3	2 (3)	0.2 (0.1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)	0.01 (0.01)	0.02 (0.03)	2 (1)

		Mean (SD)							
Site	Tissue	N	Mo (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Rb (mg/kg)	Sr (mg/kg)	V (mg/kg)	Zn (mg/kg)
Urban	Spiders	10	0.3 (0.5)	0.3 (0.3)	0.5 (0.5)	2 (1)	5 (5)	0.01 (0.01)	72 (43)
	Caterpillars	9	0.2 (0.1)	0.06 (0.05)	0.01 (0.02)	0.7 (0.4)	2 (3)	0 (0)	14 (6)
	Leaves	5	0.5 (0.5)	0.5 (0.4)	2 (3)	2 (1)	4 (4)	0.1 (0.2)	53 (48)
Forest	Spiders	6	0.2 (0.2)	0.3 (0.2)	0.3 (0.3)	2 (0.7)	4 (2)	0 (0)	85 (39)
	Caterpillars	6	0.2 (0.1)	0.05 (0.05)	0.1 (0.1)	0.9 (0.8)	0.7 (0.6)	0 (0)	41 (35)
	Leaves	3	0.3 (0.3)	0.2 (0.1)	0.05 (0.03)	2 (0.9)	3 (3)	0 (0)	11 (2)

**NB:** A significant difference of metal concentrations was observed between prey for both axes (PC1: Kruskal-Wallis,  $\chi^2=22.6$ ,  $p<0.001$  and PC2: Kruskal-Wallis,  $\chi^2=31.6$ ,  $p<0.001$ ). PC1 separated caterpillars sparsely polluted from spiders and leaves which contained higher concentration of metals ( $p_{\text{caterpillars-spiders}}$  and  $p_{\text{caterpillars-leaves}} <0.001$  and  $p_{\text{leaves-spiders}} =0.85$ ). The PC2 separated spiders, rich in Cu, Zn and Cd, from caterpillars and leaves ( $p_{\text{caterpillars-spiders}}$  and  $p_{\text{leaves-spiders}} <0.001$  and  $p_{\text{caterpillars-leaves}} =0.23$ ). N represents the number of samples in each category

### C.3) PCA and metal concentrations in feathers of adult birds

Name	PC1	PC2	cos2_PC1	contrib_PC1	cos2_PC2	contrib_PC2
Al	0.283	0.734	0.080	1.817	0.539	38.613
Ba	0.659	-0.338	0.434	9.848	0.114	8.203
Cs	-0.810	0.240	0.657	14.906	0.058	4.131
Cu	0.522	0.696	0.272	6.183	0.484	34.729
Ni	0.734	0.325	0.538	12.210	0.106	7.582
Pb	0.829	-0.087	0.687	15.600	0.008	0.544
Rb	-0.845	0.123	0.714	16.210	0.015	1.091
Sr	0.714	-0.036	0.509	11.553	0.001	0.095
Zn	0.717	-0.264	0.514	11.674	0.070	5.013

Table C.3) Metal concentrations in feathers of adult birds

		Al (mg/kg)	Ba (mg/kg)	Cs (mg/kg)	Cu (mg/kg)	Ni (mg/kg)	Pb (mg/kg)	Rb (mg/kg)	Sr (mg/kg)	Zn (mg/kg)
Site	N	Mean (SD)								
Urban	13	36 (22)	9 (13)	0 (0)	8 (2)	1 (0.07)	2 (2)	0.6 (0.3)	9 (4)	129 (94)
Forest	20	51 (98)	6 (3)	0.4 (0.4)	7 (2)	1 (1)	1 (2)	0.2 (0.07)	12 (5)	201 (141)

NB: N represents the number of samples in each category

#### C.4) PCA vegetal cover

Name	PC1	PC2	cos2_PC1	contrib_PC1	cos2_PC2	contrib_PC2
No - vegetation	0.860	-0.417	0.739	36.749	0.174	14.452
Water	-0.251	-0.452	0.063	3.144	0.204	16.964
Arable	0.025	0.705	0.001	0.031	0.497	41.252
Low Vegetation	0.518	0.570	0.268	13.354	0.324	26.927
High Vegetation	-0.969	0.070	0.939	46.722	0.005	0.406

### Appendix D) Estimates of generalized linear model used for reproduction parameters.

	Hatching date	Clutch size	Hatching rate	Fledging rate	Fledging number
Variable	Estimate (SE)				
Intercept	4.175 (0.03)	1.967 (0.08)	1.053 (0.41)	1.878 (0.63)	1.498 (0.11)
Site[Forest]	-0.058 (0.04)	0.223 (0.12)	0.951 (0.68)	1.836 (1.39)	0.541 (0.14)
Year[2016]	-0.052 (0.05)	0.077 (0.11)	-1.042 (0.51)	-0.651 (0.81)	-0.4 (0.16)
Year[2018]	-0.077 (0.04)	0.033 (0.11)	0.408 (0.56)	-0.682 (0.74)	0.029 (0.14)
Year[2019]	-0.203 (0.04)	0.077 (0.1)	1.156 (0.54)	-1.985 (0.67)	-0.306 (0.13)
Site[Forest]:Year[2016]	0.051 (0.06)			-2.432 (1.52)	-0.187 (0.2)
Site[Forest]:Year[2018]	0.085 (0.06)			-2.537 (1.48)	-0.506 (0.19)
Site[Forest]:Year[2019]	0.102 (0.05)			-0.546 (1.44)	0.171 (0.17)

NB: For the variable 'Site' the reference level was Urban and for the variable Year the reference was 2015

### Appendix E) Summary of the principal components analyses of weather condition during the reproduction of birds and estimates of generalized linear model used to test relation between PC1 and PC2 with reproduction parameters

Name	Dim.1	Dim.2	cos2_PC1	cos2_PC2	contrib_PC1	contrib_PC2
Tampli_rearing	-0.386	0.8	0.149	0.639	3.553	32.754
Tmean_rearing	0.296	0.814	0.088	0.663	2.091	33.952
RRmean_rearing	0.655	0.06	0.429	0.004	10.245	0.182
Tampli_incubation	0.899	-0.288	0.808	0.083	19.277	4.262
Tmean_incubation	0.912	0.232	0.831	0.054	19.84	2.755
RRmean_incubation	-0.855	0.233	0.73	0.054	17.429	2.781
NbRD_incubation	-0.853	0.176	0.728	0.031	17.364	1.591
NbRD_rearing	-0.654	-0.651	0.428	0.424	10.201	21.722

	Hatching rate	Fledging rate	Fledging number
Variable	Estimate (SE)	Estimate (SE)	Estimate (SE)
Intercept	4.74 (1.82)	-0.306 (1.82)	1.228 (0.58)
Site[Forest]	0.416 (0.26)	0.65 (0.27)	0.455 (0.09)
PC1	-0.009 (0.16)	-0.047 (0.13)	-0.04 (0.05)
PC2		0.398 (0.16)	0.186 (0.07)
Hatching date	-0.052 (0.03)	0.016 (0.03)	0.002 (0.01)
Site[Forest]:PC1	0.266 (0.1)		
Site[Forest]:PC2		-0.446 (0.19)	-0.193 (0.07)

NB: For the variable 'Site' the reference level was Urban

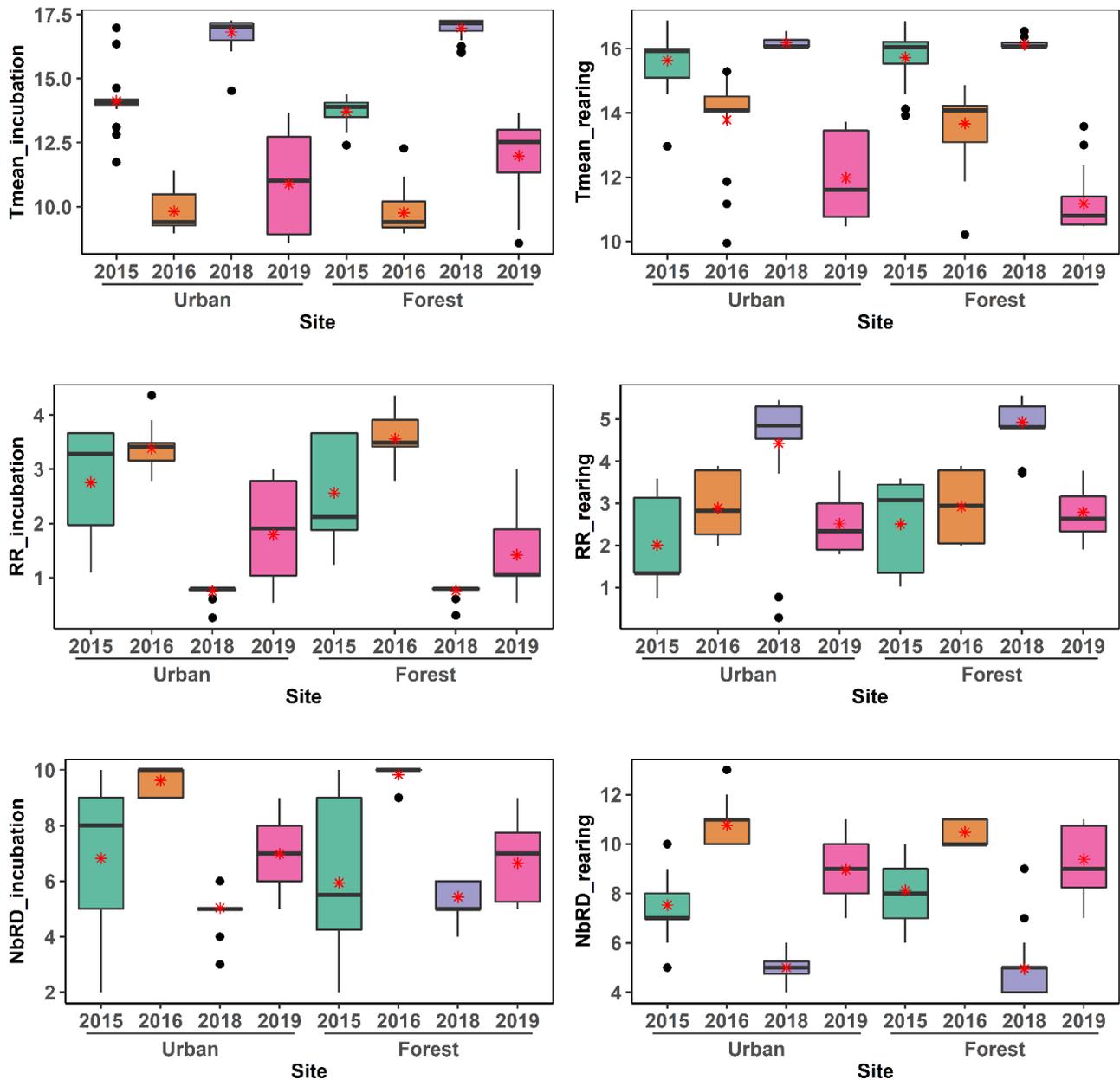


Figure E.5 – Boxplot of different weather parameters during the reproduction across the years and between reproduction. Red asterisks represent the mean whereas the bar represent median. RR correspond to mean raining rate (mm) during incubation/rearing, NbrD (days) to the number of rainy day during incubation/rearing and Tmean (°C) to the mean temperatures during incubation/rearing

## Annexes manuscrit 2

---

### Interannual variation of physiological differences between urban and forest great tits

Agnès Saulnier\*<sup>1</sup>, Josefa Bleu<sup>1,2</sup>, Anne Boos<sup>1,2</sup>, Maurice Millet<sup>2,3</sup>, Sandrine Zahn<sup>1,2</sup>, Pascale Ronot<sup>1,2</sup>, Islah El Masoudi<sup>1</sup>, Emilio R. Rojas<sup>1,4</sup>, Pierre Uhlrich<sup>1</sup>, Mirella Del Nero<sup>1,2</sup>, Sylvie Massemin<sup>1,2</sup>

#### Appendix A) Headcount of Age category per year and per site for fledglings and for adults

##### A.1) Fledglings

Age (days)	2015		2016		2018	
	Urban	Forest	Urban	Forest	Urban	Forest
14	2	7	5	5	61	28
15	9	12	26	50	41	44
16	20	46	40	35	20	6
17	33	52	0	16	0	13
18	25	6	4	19	0	0

##### A.2) Adults

Age	2018	
	Urban	Forest
(1 y.o.)	19	8
(> 1 y.o.)	14	7

NB: The age of the individuals was estimated in 2018 from the colour of the cover feathers on the wings. This technique allows distinction between one-year-old breeders (1 y.o.) with a partial post-juvenile molt (bluish edges only on greater coverts) from older breeders (> 1 y.o.) with a complete post-breeding molt.

Result of  $\chi^2$  test of the equality of proportion:  $\chi^2 = 1.75 \text{ e-}31$  and p-value= 1

**Appendix B) Mean and SD of each morphological and physiological parameters of adults and fledglings great tits**

**B.1) Adults**

<i>Site</i>	<i>Year</i>	<b>Body size</b>			<b>Body condition</b>			<b>ROM</b>			<b>OXY</b>			<b>RTL</b>		
		<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>
Urban	2015	21	-0.04	1.37	21	-0.12	0.96	17	1.44	0.93	21	234.32	48.54	21	1.09	0.31
	2016	15	0.13	1.55	15	-0.25	0.7	9	1.16	0.57	11	175.38	26.62	15	1.3	0.54
	2018	33	-0.84	1.31	31	0.07	0.66	27	2.32	0.76	26	212.7	72.84	30	0.76	0.35
Forest	2015	24	0.52	1.16	24	0.26	0.78	19	1.54	1.25	23	202.21	37.07	21	0.88	0.43
	2016	20	0.35	0.81	20	-0.1	0.96	17	1.61	1.05	17	129.5	40.52	20	1.35	0.34
	2018	15	0.47	1.38	15	0	0.62	11	1.38	0.41	13	192.08	70.06	13	0.53	0.11

**B.2) Fledglings**

<i>Site</i>	<i>Year</i>	<b>Body size</b>			<b>Body condition</b>			<b>ROM</b>			<b>OXY</b>			<b>RTL</b>		
		<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>	<i>N</i>	<i>Mean</i>	<i>SD</i>
Urban	2015	89	0.91	1.01	89	-0.9	1.57	62	1.91	1.13	74	194.95	31.86	59	0.94	0.39
	2016	75	0.3	0.96	75	-0.01	1.04	51	1.47	0.94	59	154.78	31.88	39	1.23	0.26
	2018	122	-1.67	1.51	122	-0.2	1.42	36	2.41	0.91	73	157.48	50.29	63	0.85	0.3
Forest	2015	123	0.64	1.16	123	0.26	0.84	73	1.86	1.07	91	195.38	45.43	60	0.9	0.45
	2016	125	0.12	1.16	125	0.34	1.34	37	2.22	1.09	46	130.17	30.7	46	1.21	0.37
	2018	92	0.07	1.27	92	0.34	1.49	41	2.61	1.26	76	162.98	45.97	48	0.69	0.26

## Appendix C) Primers sequence for qPCR RTL analysis

- Control gene *P. major* Zinc finger protein (GenBank: EF568148)

F: ZENK1: 5'-TACATGTGCCATGGTTTTGC-3'

R: ZENK2 :5'-AAGTGCTGCTCCCAAAGAAG-3'

- Telomeres

F: Tel1b: 5'-CGGTTTGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT-3'

R: Tel2b 5'-GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTACCCTTACCCT-3'

## Appendix D) Estimates of linear models used for physiological and morphological parameters of adults and fledglings great tits

### D.1) Adults

	Body size (n=128)	Body condition (n=126)	ROM (n=98)	OXY (n=111)	RTL (n=120)
	Estimate (SE)	Estimate. (SE)	Estimate (SE)	Estimate (SE)	Estimate (SE)
Intercept	-1.988 (0.98)	0.44 (0.8)	4.047 (1.12)	212.115 (56.85)	3.37 (1.03)
Site[Forest]	0.596 (0.19)	0.243 (0.15)	-0.047 (0.32)	-30.125 (11.12)	-0.74 (0.31)
Sex[M]	1.625 (0.18)	0.09 (0.14)	0.112 (0.19)	-2.499 (10.38)	0.19 (0.18)
Year[2016]	0.172 (0.22)	-0.247 (0.18)	-0.437 (0.38)	-64.772 (13.16)	-0.66 (0.33)
Year[2018]	-0.137 (0.23)	-0.07 (0.18)	0.614 (0.32)	-18.647 (13.04)	-0.40 (0.30)
Hatching date	0.006 (0.01)	-0.002 (0.01)	-0.042 (0.02)	0.562 (0.81)	-0.04 (0.01)
Flegling number	0.108 (0.04)	-0.054 (0.04)	0.015 (0.05)	-2.081 (2.54)	-0.08 (0.04)
Body condition			-0.032 (0.13)	10.359 (6.8)	0.02 (0.12)
Site*Year[2016]			0.478 (0.48)		1.22 (0.45)
Site*Year[2018]			-0.781 (0.46)		0.10 (0.45)
Site*Sex[M]					

Note. For the variable 'Site' the reference level was Urban, for the variable 'Sex' the reference level was Female and for the variable 'Year' the reference level was 2015. ROM corresponds to plasmatic concentration of reactive oxygen metabolites; OXY corresponds to plasmatic total antioxidant capacity and RTL corresponds to relative telomere length. RTL was transformed as Z-scores due to protocol modifications (see Material and methods for more details).

## D.2) Fledglings

	Body size (n= 625)	Body condition (n= 627)	ROM (n=299)	OXY (n=418)	RTL (n=314)
	Estimate (SE)	Estimate (SE)	Estimate (SE)	Estimate (SE)	Estimate (SE)
Intercept	-1.86 (1.20)	3.35 (1.36)	0.88 (0.96)	217.72 (26.94)	0.20 (0.87)
Site[Forest]	0.01 (0.32)	0.69 (0.23)	0.26 (0.17)	-7.29 (4.98)	-0.28 (0.15)
Year[2016]	0.17 (0.35)	0.35 (0.28)	-0.00 (0.19)	-51.49 (5.76)	-0.04 (0.19)
Year[2018]	-1.08 (0.32)	-0.09 (0.28)	0.72 (0.22)	-33.21 (5.98)	-0.11 (0.19)
Hatching date	0.02 (0.02)	-0.04 (0.02)	0.02 (0.01)	-0.21 (0.39)	0.00 (0.01)
Flegling number	0.10 (0.05)	-0.21 (0.06)	-0.03 (0.05)	-1.00 (1.40)	-0.01 (0.04)
Body size			0.04 (0.05)	3.67 (1.66)	-0.03 (0.05)
Body condition			0.20 (0.06)	2.79 (1.68)	0.01 (0.05)
Site*Year[2016]	-0.47 (0.45)				
Site*Year[2018]	1.61 (0.42)				
<b>Random</b>	Var (SD)	Var (SD)	Var (SD)	Var (SD)	Var (SD)
Brood	0.60 (0.77)	1.05 (1.03)	0.24 (0.50)	80.67 (8.98)	0.15 (0.39)
Age	1.05 (1.02)	8.59e-11 (9.268e-06)	0.001 (0.03)	0 (0)	6.0e-10 (2.5e-05)

Note. For the variable 'Site' the reference level was Urban and for the variable 'Year' the reference level was 2015. ROM corresponds to plasmatic concentration of reactive oxygen metabolites; OXY corresponds to plasmatic total antioxidant capacity and RTL corresponds to relative telomere length. RTL was transformed as Z-scores due to protocol modifications (see Material and methods for more details).

## **Annexes manuscrit 4**

---

### **Consequences of trace metal cocktail exposure in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) and effect of calcium supplementation**

Agnès Saulnier<sup>1</sup>, Josefa Bleu<sup>1</sup>, Anne Boos<sup>1</sup>, Islah El Masoudi<sup>1</sup>, Pascale Ronot<sup>1</sup>, Sandrine Zahn<sup>1</sup>,  
Mireille Del Nero<sup>1</sup> & Sylvie Massemin<sup>1</sup>

**Consequences of trace metal cocktail exposure in zebra finch (*Taeniopygia guttata*) and effect of calcium supplementation**

Agnès Saulnier<sup>1</sup>, Josefa Bleu<sup>1</sup>, Anne Boos<sup>1</sup>, Islah El Masoudi<sup>1</sup>, Pascale Ronot<sup>1</sup>, Sandrine Zahn<sup>1</sup>, Mireille Del Nero<sup>1</sup> & Sylvie Massemin<sup>1</sup>

<sup>1</sup> **Université de Strasbourg, CNRS, IPHC UMR 7178, F-67000 Strasbourg, France**

Corresponding author: [agnes.saulnier@iphc.cnrs.fr](mailto:agnes.saulnier@iphc.cnrs.fr)

**Table A.1.** Metal concentrations measured in great tits faeces within the Eurometropolis of Strasbourg, FR-67000

These analyses of concentrations were performed with ICMP-MS. Samples were collected on different individuals along an urban gradient in Eurometropolis of Strasbourg. TME cocktail was based on mean concentrations of faeces. For Pb, the concentration in the cocktail is based on the concentration used in previous laboratory studies (Scheuhammer 1996; Chatelain et al. 2016).

		<b>Arsenic</b>	<b>Cadmium</b>	<b>Chromium</b>	<b>Cobalt</b>	<b>Copper</b>	<b>Nickel</b>	<b>Lead</b>	<b>Zinc</b>
<b>Faeces concentration (ppm)</b>	Mean	1.07144	0.13203	0.62459	0.12544	21.5025	0.48918	1.14045	79.7131
	±SD	0.87507	0.11154	0.89112	0.16801	20.9864	0.69122	1.04533	36.0828
	N	31	32	23	32	32	31	31	32
<b>Cocktail concentration (ppm)</b>		<b>1</b>	<b>0.1</b>	<b>0.7</b>	<b>0.2</b>	<b>24</b>	<b>0.5</b>	<b>10</b>	<b>100</b>

Chatelain M, Gasparini J, Haussy C, Frantz A (2016) Trace Metals Affect Early Maternal Transfer of Immune Components in the Feral Pigeon. *Physiol Biochem Zool* 89:206–212. doi: 10.1086/685511

Scheuhammer AM (1996) Influence of reduced dietary calcium on the accumulation and effects of lead, cadmium, and aluminium in birds. *Environ Pollut* 94:337–343. doi: 10.1016/S0269-7491(96)00084-X

**Table A.2.** Operational conditions applied for ICP-MS elemental analysis and detection limit values for each metals.

Table A.2.1: Operational conditions of ICP-MS analysis

ICP-MS	Agilent 7700
RF Power	1550 W
Sampling and skimmer cones	Nickel
Nebulizer	MicroMist
Spray chamber	Scott double-pass, quartz
Plasma Gas	15.0 L/min
Nebulizer Gas	1.03 L/min
Makeup Gas	0.00 L/min
Auxiliary Gas	0.9 L/min
Spray chamber temp	2 °C
Sampling depth	8 mm
Dwell time	0.003 s
Isotopes	<sup>52</sup> Cr <sup>53</sup> Cr <sup>59</sup> Co <sup>60</sup> Ni <sup>62</sup> Ni <sup>63</sup> Cu <sup>65</sup> Cu <sup>66</sup> Zn <sup>68</sup> Zn <sup>75</sup> As <sup>111</sup> Cd <sup>114</sup> Cd <sup>115</sup> In <sup>206</sup> Pb <sup>208</sup> Pb
ORS mode	He collision ORS <sub>3</sub> for Cr, Co, Ni, Cu, Zn and As ; no gas for Cd and Pb
Nebulizer Pump	0.10 rps

Table A.2.2: LOD of the ICP-MS analysis

Isotope	LOD (µg/kg)
52 Cr [ He ]	0.05
53 Cr [ He ]	0.1
59 Co [ He ]	0.05
60 Ni [ He ]	0.05
62 Ni [ He ]	0.05
63 Cu [ He ]	0.5
65 Cu [ He ]	0.5
66 Zn [ He ]	1
68 Zn [ He ]	1
75 As [ He ]	0.03
111 Cd [ No Gas ]	0.1
116 Cd [ No Gas ]	0.1
206 Pb [ No Gas ]	0.04

207 Pb [ No Gas ]	0.05
208 Pb [ No Gas ]	0.1

**Table A.3.** Results of generalized Wilcoxon tests performed for pairwise comparisons of metal concentrations in blood between treatments at each exposure time (day 0, 14, 29, 43, and 57). Post-hoc tests were performed when differences between treatments were significant (Table 2). We applied a Bonferroni correction of the p-value ( $=0.05/6$  pairs). Only tests with  $p\text{-value} < 0.0083$  are significant and are represented in bold. ‘Ctrl’: control group with low-Ca diet and no TME, ‘TME’: birds with low-Ca diet exposed to a TME cocktail, ‘Ca’: rich-Ca diet and no TME and ‘TME+Ca’: rich-Ca diet and TME cocktail.

		T0		T14		T29		T43		T57	
p-value Bonferroni =0.0083		X <sup>2</sup>	p-value	X <sup>2</sup>	p-value	X <sup>2</sup>	p-value	X <sup>2</sup>	p-value	X <sup>2</sup>	p-value
<i>Arsenic (As)</i>	Ctrl-TME	0.00	NA	15.4	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	16.2	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	16.4	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	13.5	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>
	Ctrl-Ca	0.00	NA	1.00	0.3	1.3	0.2	0.00	0.9	0.00	NA
	Ctrl-TME+Ca	2.8	0.1	0.6	0.5	0.00	1.00	4.8	0.03	4.8	0.03
	TME+Ca-Ca	2.8	0.1	2.1	0.1	1.00	0.3	3.1	0.08	4.8	0.03
	Ca-TME	0.00	NA	16.4	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	13.2	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	16.4	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	13.5	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>
	TME+Ca-TME	2.5	0.1	13.6	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	16.2	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	14.5	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	11.4	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>
<i>Cadmium (Cd)</i>	Ctrl-TME					4.8	0.03	2.4	0.1		
	Ctrl-Ca					0.00	NA	2.1	0.1		
	Ctrl-TME+Ca					13.1	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	2.1	0.1		
	TME+Ca-Ca					13.1	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	9.00	<b>0.003</b>		
	Ca-TME					4.8	0.03	10.00	<b>0.002</b>		
TME+Ca-TME					4.9	0.03	0.1	0.7			
<i>Chromium (Cr)</i>	Ctrl-TME										
	Ctrl-Ca										
	Ctrl-TME+Ca										
	TME+Ca-Ca										
	Ca-TME										
TME+Ca-TME											
<i>Copper (Cu)</i>	Ctrl-TME					7.1	<b>0.008</b>	6.7	0.009		
	Ctrl-Ca					0.6	0.5	0.2	0.6		
	Ctrl-TME+Ca					8.3	<b>0.004</b>	10.00	<b>0.002</b>		
	TME+Ca-Ca					9.00	<b>0.003</b>	1.9	0.2		
	Ca-TME					9.00	<b>0.003</b>	1.1	0.3		
TME+Ca-TME					0.4	0.5	0.3	0.6			
<i>Nickel (Ni)</i>	Ctrl-TME										
	Ctrl-Ca										
	Ctrl-TME+Ca										
	TME+Ca-Ca										
	Ca-TME										
TME+Ca-TME											
<i>Lead (Pb)</i>	Ctrl-TME			15.4	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	16.2	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	9.8	<b>0.002</b>	15.4	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>
	Ctrl-Ca			0.1	0.8	3.6	0.06	2.2	0.1	0.2	0.6
	Ctrl-TME+Ca			1.8	0.2	3.3	0.07	1.00	0.3	6.00	0.01
	TME+Ca-Ca			1.7	0.2	5.7	0.02	6.00	0.01	7.00	<b>0.008</b>
	Ca-TME			16.4	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	16.2	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	15.4	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	11.5	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>
TME+Ca-TME			10.7	0.001	15.1	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	16.4	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	13.7	<b>&lt;0.00</b> <b>1</b>	
<i>Zinc (Zn)</i>	Ctrl-TME					10.7	<b>0.001</b>	6.9	0.009	6.2	0.01
	Ctrl-Ca					1.6	0.2	6.9	<b>0.008</b>	0.6	0.5
	Ctrl-TME+Ca					8.7	<b>0.003</b>	5.00	0.02	0.7	0.4
	TME+Ca-Ca					5.4	0.02	0.2	0.6	2.2	0.1
	Ca-TME					6.9	<b>0.009</b>	0.4	0.5	6.7	0.01
TME+Ca-TME					0.00	0.8	0.1	0.8	4.5	0.03	

**Table A.4.** - PCA results for metal concentrations in feathers and p-value of Tukey post-hoc following the ANOVA tests performed to identify significant differences between treatments along these axes. 'Ctrl': control group with low-Ca diet and no TME, 'TME': birds with low-Ca diet exposed to a TME cocktail, 'Ca': rich-Ca diet and no TME and 'TME+Ca': rich-Ca diet and TME cocktail. Only tests with p-value<0.05 are significant and are represented in bold and red.

Variables	PC1Feather		PC2Feather		Contribution	
	correlation	p.value	correlation	p.value	PC1Feather	PC2Feather
Copper	0.783	1.63E-16	-	-	23.73	0.24
Zinc	0.692	8.58E-12	-0.34	2.99E-03	18.52	9.12
Chromium	0.689	1.18E-11	-0.435	1.08E-04	18.35	14.87
Lead	0.629	1.84E-09	0.524	1.62E-06	15.34	21.63
Nickel	0.493	8.06E-06	-0.401	3.92E-04	9.40	12.67
Cadmium	0.439	8.88E-05	0.553	3.20E-07	7.48	24.06
Arsenic	0.431	1.25E-04	0.471	2.31E-05	7.19	17.42

		T0				T29			
		TME+Ca				TME+Ca			
		Ctrl	Ca	a	TME	Ctrl	Ca	a	TME
		PC1 Feather							
T0	Ctrl		0.9999	0.8614	0.9846	0.9725	0.9879	<.0001	0.0703
	Ca	0.6640		0.9770	0.9997	0.9998	0.8296	<.0001	5
	TME+Ca	1.0000	0.7987		0.9995	0.9996	0.3590	<.0001	9
	TME	0.6038	1.0000	0.7497		1.0000	0.6414	<.0001	2
T29	Ctrl	0.0073	0.7947	0.0811	0.8003		0.6678	<.0001	6
	Ca	0.0012	0.0221	0.0024	0.0987	0.8551		<.0001	0.3748
	TME+Ca	0.0231	0.6153	0.0058	0.6170	1.0000	0.9545		0.0001
	TME	0.7747	0.0394	0.6321	0.0035	0.0006	<.0001	0.0003	

**Table A.5.** Metal concentrations in feathers (ppm or mg/kg) for each group at day 0 and 29. ‘Ctrl’: control group with low-Ca diet and no TME, ‘TME’: birds with low-Ca diet exposed to a TME cocktail, ‘Ca’: rich-Ca diet and no TME and ‘TME+Ca’: rich-Ca diet and TME cocktail.

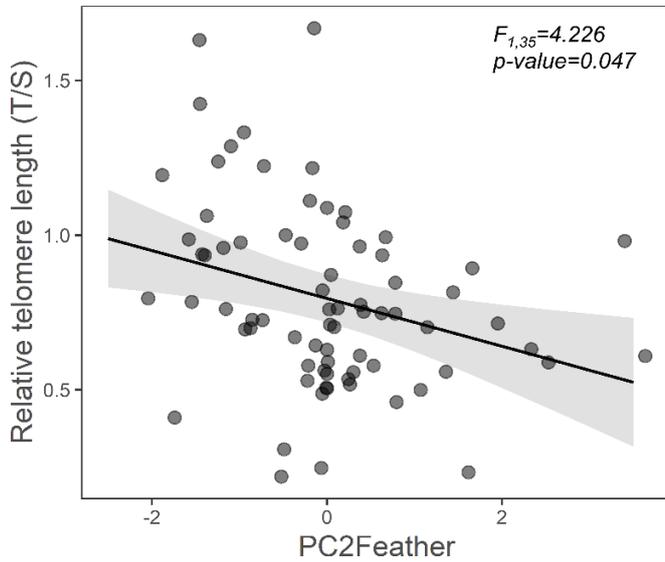
	<i>Exposure (day)</i>	<b>Ctrl</b>	<b>TME</b>	<b>Ca</b>	<b>TME+Ca</b>
		<i>mean±SD</i>	<i>mean±SD</i>	<i>mean±SD</i>	<i>mean±SD</i>
<b>Lead</b>	<b>0</b>	5.31±5.1	3.92±1.57	4.21±2.3	4.54±3.16
	<b>29</b>	2.45±2.91	6.5±2.19	2.15±0.71	7.86±3.01
<b>Arsenic</b>	<b>0</b>	0.05±0.03	0.05±0.03	0.05±0.03	0.04±0.03
	<b>29</b>	0.03±0.01	0.99±0.59	0.04±0.01	0.36±0.14
<b>Zinc</b>	<b>0</b>	196.46±55.88	176.2±32.59	173.52±18.93	208.08±44.26
	<b>29</b>	223.49±51.2	231.78±51.6	772.71±323.27	890.82±431.71
<b>Copper</b>	<b>0</b>	8.28±1.69	8.3±1.68	8.53±1.19	8.36±2.08
	<b>29</b>	7.28±1.83	9.47±1.39	6.6±1.33	14.48±3.71
<b>Chromium</b>	<b>0</b>	0.35±0.08	0.49±0.22	0.35±0.11	0.27±0.04
	<b>29</b>	0.57±0.12	0.63±0.17	0.69±0.24	1.17±0.48
<b>Cadmium</b>	<b>0</b>	0.31±0.17	0.15±0.11	0.2±0.06	0.21±0.24
	<b>29</b>	0.14±0.04	0.28±0.16	0.2±0.08	0.26±0.08
<b>Nickel</b>	<b>0</b>	0.31±0.17	0.15±0.11	0.2±0.06	0.21±0.24
	<b>29</b>	0.14±0.04	0.28±0.16	0.2±0.08	0.26±0.08

**Table A.6.** Estimates values of the linear mixed models performed for physiological parameters and body mass. The ANOVA of these models are presented in Table 4A. ‘Ctrl’: control group with low-Ca diet and no TME, ‘TME’: birds with low-Ca diet exposed to a TME cocktail, ‘Ca’:rich-Ca diet and no TME and ‘TME+Ca’: rich-Ca diet and TME cocktail.

	Groupe	T0		T29		T57	
		Estimate	SE	Estimate	SE	Estimate	SE
<b>GPx</b>	<i>model:</i>	<i>log(GPx)~Exposure time X Treatment</i>					
	Ctrl	6.658	0.067	6.603	0.067	6.508	0.067
	TME	6.565	0.064	6.480	0.064	6.606	0.064
	Ca	6.705	0.067	6.440	0.067	6.617	0.067
	TME+Ca	6.509	0.067	6.648	0.067	3.948	0.613
<b>GSH</b>	<i>model:</i>	<i>log(GSH)~Exposure time X Treatment</i>					
	Ctrl	4.995	0.613	5.318	0.613	6.016	0.581
	TME	4.507	0.581	5.646	0.581	5.140	0.613
	Ca	3.213	0.613	5.940	0.613	4.932	0.613
	TME+Ca	5.266	0.613	4.461	0.613	5.266	0.613
<b>ROM</b>	<i>model:</i>	<i>log(ROM)~Exposure time</i>					
	-	1.332	0.106	1.400	0.106	0.936	0.106
<b>GSSG</b>	<i>model:</i>	<i>log(GSSG)~Exposure time</i>					
	-	4.412	0.268	4.276	0.350	5.656	0.350
<b>GSHtot</b>	<i>model:</i>	<i>log(GSHtot)~Exposure time</i>					
	-	5.923	0.198	6.191	0.198	6.953	0.198
<b>RTL</b>	<i>model:</i>	<i>log(RTL)~Exposure time</i>					
	-	-0.383	0.063	-0.225	0.072	-0.375	0.072
<b>Body mass</b>	<i>model:</i>	<i>mass~ Treatment</i>					
	Ctrl	16.33	0.65				
	TME	17.06	0.93				
	Ca	18.38	0.93				
	TME+Ca	16.92	0.90				

Note: ROM= Reactive oxygen metabolites; GSSG= oxidised glutathione; GSH= free glutathione  
 GSHtot=glutathione total; GPx= glutathione peroxidase; RTL= Relative telomere length

**Fig. A.1.** Relation between the composite variable PC2Feather and relative telomere length (T/S). PC2Feather is positively correlated with Pb, As and Cd concentration and negatively correlated with Zn, Ni and Cr, see Fig. 1. (T/S) corresponds to the ratio copy telomere/copy control gene. The regression line and the confidence interval were drawn with the estimates of the linear model presented in table 4





## De l'approche corrélative à l'expérimentation : Impact de l'urbanisation et des cocktails de polluants sur l'écologie et la physiologie des oiseaux

### Résumé

---

Le milieu urbain est un milieu artificiel pouvant être contraignant pour la faune sauvage. Chez les espèces qui persistent en ville, des divergences de traits d'histoire de vie, physiologiques et morphologiques sont observées avec les populations non urbaines. Ce travail explore l'impact de l'urbanisation sur la faune sauvage en combinant des approches corrélatives *in situ* sur une espèce « d'urban adapter », la mésange charbonnière (*Parus major*), et des approches expérimentales *ex situ* sur le diamant mandarin (*Taenopygia guttata*), pour comprendre les mécanismes impactant les divergences phénotypiques entre ville et forêt. Les approches *in situ* chez la mésange ont révélé une taille de nichée réduite et une meilleure maintenance somatique en ville suggérant en partie un rythme de vie plus lent par rapport aux oiseaux forestier mais également que la ville a un rôle de filtre sur la qualité des individus. Les expériences chez le diamant mandarin testent les effets de l'exposition à des cocktails de métaux urbain sur la physiologie. Des effets toxiques ont été observés sur les télomères, un indicateur de longévité et de survie. Ce travail souligne l'importance d'utiliser les approches *in situ* et expérimentales de manière conjointe pour appréhender l'ensemble des mécanismes sous-jacents aboutissant aux divergences phénotypiques liées à l'urbanisation.

**Mots clés :** urbanisation, *parus major*, *taenopygia guttata*, éléments traces métalliques, statut oxydatif, télomères

### Résumé en anglais

---

Urban environment is an artificial environment that can be constraining for wildlife. For urban-tolerant species, divergences in life history traits, physiology, and morphology are often observed with natural populations. This thesis aims to explore the impact of urbanisation on wildlife by combining correlative *in situ* approaches on an 'urban adapter' species, the great tit (*Parus major*), and *ex situ* experimental approaches on the zebra finch (*Taenopygia guttata*), to understand the mechanisms of phenotypic divergences between city and forest. *In situ* experiment in great tit revealed a lower brood size and a better somatic maintenance in urban birds, suggesting a slower pace of life compared to forest birds, but also that the city acts as a filter on the quality of individuals. Experimental approaches in zebra finches testing the phenotypic effects of exposure to metal cocktails representative of urban exposure revealed toxic effects of these cocktails on bird telomeres, a potential indicator of longevity and survival. This work highlights the importance of using *in situ* and experimental approaches together to understand the underlying mechanisms leading to urbanisation-related phenotypic divergence.

**Keywords:** urbanisation, trace metal element, oxidative statut, telomere