



**HAL**  
open science

# (Sur) Vivre en milieu agricole : approche systémique des effets sublétaux des pesticides sur l'état de santé de la perdrix grise (Perdix Perdix)

Agathe Gaffard

## ► To cite this version:

Agathe Gaffard. (Sur) Vivre en milieu agricole : approche systémique des effets sublétaux des pesticides sur l'état de santé de la perdrix grise (Perdix Perdix). Sciences agricoles. Université de La Rochelle, 2023. Français. NNT : 2023LAROS001 . tel-04210076

**HAL Id: tel-04210076**

**<https://theses.hal.science/tel-04210076>**

Submitted on 18 Sep 2023

**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.

Présentée par **Agathe GAFFARD**  
Soutenue le 10 Février 2023

Pour l'obtention du grade de Docteur de la Rochelle Université  
Discipline : Biologie de l'environnement, des populations, écologie

**(SUR)VIVRE EN MILIEU AGRICOLE : APPROCHE SYSTEMIQUE DES EFFETS  
SUBLETAUX DES PESTICIDES SUR L'ETAT DE SANTE DE LA PERDRIX GRISE  
(*PERDIX PERDIX*)**



**Jury de thèse :**

|                     |  |                    |
|---------------------|--|--------------------|
| Julien GASPARINI    | Professeur, Sorbonne Université, iEES  | Rapporteur         |
| Aurélie GOUTTE      | Maîtresse de Conférences HDR, Sorbonne Université, EPHE                          | Rapporteuse        |
| Josefa BLEU         | Maîtresse de Conférences, Université de Strasbourg, IPHC                         | Examinatrice       |
| Christel LEFRANCOIS | Professeure, La Rochelle Université, LIENSs                                      | Examinatrice       |
| Vincent BRETAGNOLLE | Directeur de recherche, CNRS, CEBC   | Directeur de thèse |
| Jérôme MOREAU       | Maître de Conférences HDR, Université de Bourgogne Franche-Comté, Biogéosciences | Co-encadrant       |
| Olivier PAYS-VOLARD | Professeur, Université d'Angers, BiodivAG  | Co-encadrant       |

**Cette thèse de doctorat a été réalisée grâce à différents soutiens financiers :**

La Rochelle Université (LRU)

Le Centre National pour la Recherche Scientifique (CNRS)

L'Agence Nationale pour la Recherche (ANR Pestistress)

La région Nouvelle-Aquitaine et le Contrat de Plan Etat-Région (CPER)

Le Comité Départemental des Deux-Sèvres (CDC 79)

L'institut National de Recherche pour l'Agriculture, l'Alimentation et l'Environnement (INRAE)

La Fédération de Chasse des Deux-Sèvres (FdC79)

**Cette thèse de doctorat est basée sur des travaux collaboratifs menés dans différents laboratoires :**

Le Centre d'Etudes Biologiques de Chizé

Le laboratoire Biogéosciences (Université de Bourgogne Franche-Comté)

Le laboratoire BiodivAG (Université d'Angers)

Le laboratoire ICPEES (Université de Strasbourg)



[There is nothing like looking, if you want to find something. You certainly usually find something, if you look, but it is not always quite the something you were after]

J.R.R. Tolkien, *The Hobbit* (1937)

## REMERCIEMENTS

S'il y a une partie du manuscrit que j'avais hâte d'écrire, c'est bien celle-ci. Il me semble même réfléchir à mes remerciements de thèse depuis ma première année car, bien qu'elle ait été entièrement rédigée par mes soins, elle est aussi l'œuvre de nombreuses personnes qui ont croisé mon chemin. Alors, fidèle à mon syndrome de l'imposteur, veuillez trouver ci-dessous les longs remerciements que je dois à toutes les personnes qui ont permis à ma thèse d'être l'une des plus belles expériences de ma vie.

Mes premiers mots de remerciements seront bien évidemment pour mes trois encadrants : Vincent, Olivier et Jérôme, qui ont tout mis en œuvre pour me permettre de réaliser cette thèse incroyable. Merci à vous trois de m'avoir permis de « toucher à tout ». Si l'on s'est posé la question à plusieurs reprises de savoir à quelle discipline de l'écologie appartenait ma thèse, c'est justement grâce à vos trois profils différents que ce projet de recherche est devenu si riche et transversal. Vincent, un grand merci pour tous les moyens que tu as mis en œuvre pour que je puisse réaliser cette thèse avec un matériel de qualité. Merci aussi pour ta disponibilité, ta passion à partager tes connaissances et ton envie de toujours aller plus loin dans les questions de recherche. Olivier, bien que le covid et la distance géographique nous aient empêché de se voir autant que prévu, je tiens sincèrement à te remercier pour ta présence « en distanciel » et ta disponibilité, tu n'étais jamais très loin et tu as toujours su répondre à mes interrogations avec patience et bienveillance. Merci de m'avoir accueilli à Angers quelques jours, et de m'avoir fait découvrir le monde merveilleux de l'écologie spatiale ! Jérôme, les mots me manquent pour exprimer toute la gratitude et la reconnaissance que j'éprouve en écrivant ces lignes. Tu as su me guider dès le début, en me laissant toute la liberté dont j'avais besoin pour prendre confiance en moi, en m'encourageant et en me soutenant dans tout ce que je décidais d'entreprendre, que ce soit les enseignements, les colloques, MT180, l'investissement dans le labo... Merci aussi d'avoir su me dire stop quand c'était trop et de m'avoir tirée vers le haut quand j'en ai eu besoin. Je te remercie aussi d'avoir eu le cœur bien accroché pour réussir à suivre toutes mes mésaventures et de ne jamais avoir désespéré face à mon mauvais karma. J'ai énormément appris au cours de ces trois années avec toi, et j'espère sincèrement un jour être à la hauteur de l'encadrement que tu m'as offert.

Karine, mon « encadrante de l'ombre » comme tu dis si bien, merci infiniment pour tout ce que tu as fait pour moi. Tout comme Jérôme, quelques lignes de remerciements ne suffiront pas pour te dire tout ce que je souhaiterais. Tu as été la première à m'ouvrir les portes du CEBC en me prenant en stage, tu m'as encouragé et aidé à postuler à la thèse, et surtout, tu as toujours cru en moi quoiqu'il arrive. C'est aussi grâce à toi que je vais pouvoir continuer mes recherches au labo pour encore un an et demi, merci de me laisser le temps de prendre mon envol, bientôt l'oiseau quittera son nid, mais stp pas tout de suite... Ta sensibilité, ta bienveillance et tes qualités d'encadrement resteront toujours pour moi un exemple à suivre tout au long de ma carrière.

Je tiens bien évidemment à remercier les membres de mon jury de thèse, Julien Gasparini, que j'ai eu la chance d'avoir comme enseignant et comme responsable de master à Sorbonne Université et qui a su me transmettre sa passion pour l'enseignement et la recherche. Merci à Aurélie Goutte, Josefa Bleu et Christel Lefrançois pour avoir accepté de lire, écouter et commenter mon travail de thèse et surtout merci à tou.te.s les quatre pour l'opportunité d'avoir ce travail de thèse relu par des personnes dont j'admire le travail.

Je tiens à remercier tout particulièrement l'équipe Résilience, feu Agripop, dans laquelle je m'épanouis depuis maintenant quatre ans. Merci à Vincent, puis Sabrina depuis un an, de m'avoir accueillie dans cette équipe si bienveillante et solidaire. Merci Sabrina pour ton engagement, et de toujours chercher à améliorer les choses malgré les difficultés associées à ta position de directrice d'équipe. Merci Elsa pour ta prévenance et ta sollicitude, tu es un vrai repère pour cette équipe. Merci Jean-Luc pour ton écoute et ton aide en toutes circonstances. J'adore toujours autant la lueur dans tes yeux quand je débarque essoufflée dans ton bureau : « qu'est-ce qu'elle va me demander encore ? ». Merci à tous les CDD terrains qui ont croisé ma route, et tout particulièrement merci aux équipes ornitho (Landry, Sam, Marie, Gaspouette, Flo, Yohan, Bastien et Guigui) qui se sont succédées sur ces quatre années. Merci de m'avoir aidé pour les manips, les recup de GPS et de cadavres, le suivi des nids... Mais surtout merci pour la bonne ambiance et merci de faire renaître l'équipe chaque année par vos arrivées. Je souhaite tout de même adresser quelques mots spécifiquement à Landry et Sam, les « chefs » ornithos qui m'ont accompagné sur plus d'une année. Vous m'avez été d'une grande aide, toujours prêts à partir en capture nocturne même sous zéro degrés. Merci aussi de m'avoir fait autant rire et d'avoir rendu chaque session sur le terrain unique en son genre. Même si je ne reste qu'une « collègue » à vos yeux, je n'arrêterai jamais de vous rappeler que vous êtes bien mes amis !

Merci à toutes les personnes avec lesquelles j'ai eu la chance de collaborer dans le cadre de cette thèse. Merci à la fédération de chasse des Deux-Sèvres et les deux présidents qui se sont succéder pendant ma thèse, Guy Guédon et Guy Talineau. Merci à Fred, Maël et Simon B. pour toute l'aide qu'ils m'ont apporté depuis le début. Vous m'avez accueillie si chaleureusement au sein de cette fédé, merci de m'avoir fait découvrir le monde de la chasse sous un autre angle ! Mais surtout, quelle aurait été ma thèse sans toi Julien ? Merci de m'avoir ouvert les portes de ton élevage pendant trois ans, d'avoir été si accueillant, disponible et enclin à partager toutes tes connaissances sur la perdrix. Merci aussi pour tes encouragements, ton ouverture d'esprit, ta bonne humeur et d'avoir été toujours motivé à suivre toutes mes idées les plus farfelues. Certes je termine cette thèse sans avoir passer mon permis de chasse ni avoir goûté à la perdrix, mais ne désespère pas, il te reste encore un an et demi pour me convaincre ! Merci aussi à l'ICPEES, Anaïs et Maurice, pour les dosages de pesticides dans le sang. Ça n'a pas été facile de votre côté non plus, mais on a fini par y arriver ! Merci à Maria pour tous les dosages de carot, AChE, haptoglobine qui se sont succédés au fil des années. Merci à Clément H. pour toute l'aide qu'il m'a apporté au cours de cette thèse, notamment sur les analyses spatiales. Je suis heureuse de finalement pouvoir co-écrire un papier avec toi !

Merci aussi à Fred Angelier, Karine et Clotilde Biard d'avoir fait partie de mon comité de thèse. Vos conseils et vos encouragements m'ont été d'une grande aide et j'ai hâte de pouvoir travailler avec vous sur différents projets de recherche.

Je remercie la direction du CEBC, enfin plutôt les équipes de direction qui se sont succédées depuis mon arrivée : Christophe Guinet, David Grémillet, Yves Cherel, et le trio fantastique Charly, Chastel et Charline ! Merci à vous de vous battre quotidiennement pour que le petit village du CEBC peuplé d'irréductibles chercheur.euses continue de vivre en paix. Merci à toute l'administration du CEBC, Pascale, Martine, Delphine, Marlène et Arnaud.P. Delphine, tu m'as supporté en tant que stagiaire, puis en tant que doctorante et bientôt en tant que post-doctorante ! Mais ne t'inquiètes pas, je ne compte toujours pas gérer seule mes OM, GESLAB, mes bons de commande, et tous ces mystères administratifs auxquels je ne comprends strictement rien depuis trois ans. Merci pour tous les bonbons, les boutures et les fous rires ! Je

continue le tour du CEBC et je remercie très chaleureusement son restau 5 étoiles inscrit au Gault et Millau depuis 1968 !! Merci Christophe, Arnaud et Morgane, je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous (littéralement). Merci pour les endives, les frites et toutes les bonnes viandes jusqu'au jour fatidique où je vous ai annoncé que je devenais végé. Merci de faire vivre le labo, de participer à cette ambiance familiale et de m'avoir régaler chaque jour. J'ai déjà hâte du prochain jour des frites ☺ ! Parce que sans l'atelier je n'aurais jamais pu réaliser toutes mes expériences, je remercie Simon, Jojo et Anthony d'être toujours prêts à donner un coup de main. Tout comme le restau, vous êtes essentiels à la vie du labo ! Pour finir le tour du CEBC, je remercie l'équipe de la bioch : Charline, Cécile, Marie, Emmanuelle et Mathieu ! Merci pour votre bonne humeur permanente et d'avoir toujours su répondre à toutes mes requêtes de dernière minute (...). Merci aussi à David pour ton aide sur les stats, les formations R et QGIS, ta bonne humeur et ton soutien.

Je souhaite maintenant adresser une attention particulière aux personnes qui m'ont tant inspiré et emmené à ce moment précis de ma vie. Je remercie Clotilde Biard (encore !), qui m'a offert mon premier stage de recherche en licence. C'est grâce à toi et à ce stage que j'ai décidé de devenir Maîtresse de Conférences. Merci de m'avoir donné ma chance, et d'être un si bon exemple de pédagogie. Je suis reconnaissante qu'on ait pu garder contact pendant toutes ces années et j'espère pouvoir collaborer avec toi un de ces jours. Je tiens aussi à remercier plusieurs de mes enseignants de Sorbonne Université, notamment Julien Gasparini (encore !), Nicolas Loeuille et Jean-Baptiste Mihoub, pour qui j'ai une pensée en écrivant ces lignes. Vous m'avez accompagné tout au long de mon cursus universitaire et m'avez fait découvrir votre passion pour l'enseignement et la recherche. Merci pour votre patience, votre bienveillance et pour tout le travail que vous faites au quotidien pour que notre formation soit la meilleure. Vous m'avez permis de m'épanouir et de m'affirmer, j'ai toujours une pensée pour vous lorsque j'encadre des étudiants.

Je remercie également Gilles Radenac, Denis Fichet, Paco Bustamante, Coraline Bichet (je ne savais pas où te mettre !) et toute l'équipe pédagogique de La Rochelle Université pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner en travaux pratiques de Biologie Animale. J'ai pris un grand plaisir à réaliser ces enseignements, qui m'ont permis de confirmer ce que je souhaitais faire de ma vie professionnelle ! Merci aussi à Jennifer et Isabelle de l'ED pour votre gentillesse et votre aide dans toutes les démarches administratives qui restent définitivement une phobie pour moi.

Bien évidemment je tiens à remercier les stagiaires et services civiques qui m'ont accompagné pendant cette thèse et qui ont dû subir avec moi le rythme effréné des manips ! Merci à Clotilde, Clémentine et Marie, et Amandine et Aldric côté fédé, je vous dois beaucoup. Ça n'a pas été évident pour moi de lâcher prise et je vous suis très reconnaissante pour toute l'aide que vous m'avez apporté, tant sur le terrain que dans l'analyse des données ! Cette thèse, c'est aussi un peu la vôtre ☺

Enfin, je remercie la Région Nouvelle Aquitaine et le Conseil Général des Deux-Sèvres pour avoir financé cette thèse. Je remercie aussi le CPER pour avoir financé les GPS.

Mais la thèse, ça n'était pas que ça. Le CEBC c'est aussi une grande famille, un lieu de rencontre, qui m'a permis de me lier d'amitié avec de nombreuses personnes toutes plus inspirantes les unes que les autres. J'ai grandi auprès de vous tous, merci de m'avoir tant apporté.

Je souhaite tout d'abord remercier la Onch : Mati, Syd, Pipou, mais aussi Malo, Nono et Zaza. C'est compliqué de résumer cette aventure en quelques mots. Merci de m'avoir accueillie à toute heure dans votre maison. Merci aussi pour les soirées de folie, la cave, les feux d'artifices, les animaux, les repas (et je vais m'arrêter là pq la liste est trop longue). Très honnêtement, je ne sais pas ce que j'aurais fait sans vous. On a vécu de très beaux moments ensemble, qui resteront à jamais gravé dans ma mémoire. Vos départs successifs ont été compliqués à vivre pour moi, mais je sais qu'on reste lié les uns aux autres, même aux quatre coins de la planète et pour toujours. Je vous aime très fort.

Marionche et JE, vous aussi, vous avez fait partie intégrante de mon aventure. Merci pour toutes ces soirées, ces rires et ces débats. Merci d'avoir été si bienveillants et attentionnés à mon égard. Je vous dois beaucoup et j'espère que notre amitié continuera encore très longtemps.

Pauline, c'est dur de trouver les mots pour t'exprimer toute mon amitié. On a vécu tant de choses toutes les deux, des très drôles mais aussi des beaucoup moins drôles. Merci d'être toi, si passionnée et passionnante. J'espère que dans 10, 20, 30 ans on continuera de s'envoyer des photos de chats chaque soir. Tu sais déjà à quel point je t'aime, mais je préfère te le rappeler ici encore une fois.

Elva, tu as débarqué dans ma vie il y a à peine un an, et pourtant que de bouleversements ! A peine arrivée que tu me convaincs d'adopter un chien (oups). S'en est suivie une merveilleuse aventure à tes côtés, beaucoup de rires, quelques pleurs aussi mais surtout une belle amitié. J'ai hâte que nos péripéties se poursuivent encore de longues années, accompagnées de nos deux plus fidèles compagnons !

Ambre, merci de m'avoir fait si bon accueil en terre melloise. Tu es une personne si généreuse et bienveillante, merci pour tout ce que tu as fait depuis ces trois ans pour que je me sente comme chez moi, et surtout, merci pour ton amitié si fidèle.

Il y a encore tant de personnes à remercier, et pas des moindres. Thomas, merci pour ta gentillesse et ta bienveillance au quotidien. Merci aussi pour les heures que tu as passé à faire des boucles sur R ! Je suis heureuse de pouvoir encore passer une année à tes côtés. Léa, mon petit pélobate, merci pour ton enthousiasme et ton énergie à toute épreuve. Merci aussi de me laisser terminer tes plats au restau et d'être ma partenaire de chansons en toute circonstance. Bertille, on se connaît depuis quatre ans maintenant, merci d'être toujours là (bon sauf quand tu vas faire du terrain en Finlande) et de répondre présente à chaque fois que j'ai besoin de toi. J'ai encore tant d'histoires à te raconter, alors stp rentre vite ! Merci également à Martin, Yoann OFB, Adrien, Claire, Emilie, Erika, Maxime L., Maxime S. Maxime R., Guigui F, Gopal, Guigui C et Bastien, Thomas P, Simon D (et merci ++ pour le soutien de fin de thèse), Thomas M, Julie, Elodie, Yves, Yann, Mathilde, Nisnis, Marie BD & Didier, Marie P, Audrey, Alexis S, Alexis M, Baptiste & Sophie, William & Jade, Landry & Sam (oui j'ai dit que vous étiez mes amis aussi) et encore probablement beaucoup de personnes !

Merci aussi à mes amis de Paris. Je vais commencer par Toto et MathMath, mes fidèles amies depuis tant d'années. On est loin, on ne se voit pas beaucoup, mais les souvenirs que l'on a créés ensemble sont si intenses qu'ils nous lieront pour toujours. J'ai hâte de vous retrouver (bientôt il paraît). Nothing crushes us.

Je vais continuer avec mes Lesbos, mes sœurs de cœur, qui continue de me faire devenir chaque jour une meilleure personne. Vous êtes mon soleil, ma lumière, et je vous dois beaucoup. Evidemment, ces quelques lignes ne sont pas suffisantes, mais vous savez déjà tout. Merci d'être vous, et merci spécial pour ces dernières semaines, où vous avez su m'encourager et me pousser à terminer cette thèse dans les meilleures conditions.



Merci à la team Banyuls (élargie), toujours là après toutes ces années. Je suis si heureuse de vous retrouver à chaque fois que je rentre à Paris.

Merci aussi à la team Montrouge (élargie), nos amitiés durent depuis 25 ans et quel bonheur de continuer à rire, à pleurer, à vivre plein d'aventures avec vous.

Merci à ma famille, Maman, Papa, Claire, Mathilde et Grand-Mère. Vous m'avez toujours encouragé et soutenu dans mes choix, même quand ils vous semblaient mauvais (genre acheter un cheval, adopter un chien, etc etc). Merci de toujours être là, financièrement déjà (promis un jour je gérerai mon argent) mais surtout de m'apporter au quotidien tout l'amour dont j'ai besoin. Cette thèse, c'est aussi grâce à vous que je la réalise. Grand-Mère, je voulais ajouter quelques mots spécialement pour toi. Merci d'être mon exemple, mon modèle, mon inspiration. Tu es la personne que j'admire le plus sur cette Terre.

Merci aussi à Cathy et Thierry, la famille Normand de Bordeaux, la famille Normand de Cherbourg et la famille Septenville pour votre soutien, vos encouragements et votre intérêt pour ma thèse.

Enfin, je terminerai ces (très longs) remerciements avec ceux qui m'ont supporté au quotidien, 24h/24h pendant ces trois années de thèse : mon cheval Denjiro, mon chien Séthi (mais aussi Chikako), mes chats Pyrrah, Loki et Nephtys et mes moutons Jul Aya et Dadju. Pour tous ceux qui me connaissent, vous savez à quel point mes animaux sont la prunelle de mes yeux. Sans eux la vie à Chizé n'aurait pas été pareil, et j'aurais probablement eu beaucoup moins de galère et beaucoup plus d'argent !

Merci également à toutes les perdrix qui ont croisé ma route (pas sûre qu'elles en disent autant). Spéciale dédicace à P796213, ma survivante, ma warrior !

# TABLE DES MATIERES

|  |           |
|--|-----------|
| <b>PREFACE</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>1. Publications</b> .....   | <b>1</b>  |
| 1.1. Publications en relation avec le manuscrit de thèse.....  | 1         |
| 1.2. Publications en collaboration dans des projets scientifiques annexes .....                          | 2         |
| <b>2. Participation à des colloques scientifiques</b> .....  | <b>2</b>  |
| <b>3. Vulgarisation grand public</b> .....   | <b>2</b>  |
| <b>4. Tutorat</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>5. Enseignements</b> .....  | <b>3</b>  |
| <b>6. Formations</b> .....   | <b>4</b>  |
| <b>7. Préambule de la thèse</b> .....  | <b>4</b>  |
| <b>8. Terminologie</b> .....   | <b>5</b>  |
| 8.1. Pesticides.....   | 5         |
| 8.2. Traits d’histoire de vie .....  | 6         |
| <b>9. Abbreviations</b> .....  | <b>6</b>  |
| <br>   |           |
| <b>INTRODUCTION GENERALE</b> .....   | <b>8</b>  |
| <b>1. Les agroécosystèmes contaminés par l’utilisation des pesticides</b> .....                          | <b>9</b>  |
| 1.1. Utilisation des pesticides sur les espèces ciblées .....  | 10        |
| 1.2. Evaluation des risques pour les espèces non ciblées.....  | 12        |
| 1.3. Contamination ubiquitaire des pesticides dans l’environnement.....                                  | 14        |
| <b>2. Impacts sur les espèces non-cibles : le cas de l’avifaune spécialiste du milieu agricole</b> ..... | <b>16</b> |
| 2.1. Effets indirects des pesticides .....   | 16        |
| 2.2. Effets directs des pesticides .....   | 17        |
| <b>3. Front de science et axes de recherche de la thèse</b> .....  | <b>26</b> |
| 3.1. Etudes expérimentales en conditions contrôlées : quelles améliorations apporter ? .                 | 26        |
| 3.2. Nécessité du biomonitoring sur les espèces sauvages sentinelles .....                               | 31        |
| <b>4. Objectifs et organisation de la thèse</b> .....  | <b>34</b> |
| 4.1. Problématique .....   | 34        |
| 4.2. Axes de recherche .....   | 34        |

|  |            |
|--|------------|
| <b>METHODES GENERALES .....</b>  | <b>37</b>  |
| <b>1. Modèle d'étude : la perdrix grise (<i>Perdix perdix</i>).....</b>            | <b>38</b>  |
| 1.1. Description de l'espèce .....   | 38         |
| 1.2. Une espèce en fort déclin depuis 1950.....                                    | 39         |
| 1.3. Lâchers cynégétiques .....  | 41         |
| <b>2. Approche expérimentale en conditions contrôlées .....</b>                    | <b>42</b>  |
| 2.1. Maintien des oiseaux en captivité .....                                       | 42         |
| 2.2. Design expérimental .....   | 43         |
| <b>3. Approche expérimentale <i>in natura</i> .....</b>                            | <b>45</b>  |
| 3.1. Site d'étude : La Zone Atelier Plaine et Val de Sèvre (ZAPVS).....            | 45         |
| 3.2. Design expérimental .....   | 47         |
| <b>4. Traits d'histoire de vie mesurés .....</b>                                   | <b>49</b>  |
| 4.1. Paramètres morphologiques.....  | 49         |
| 4.2. Paramètres physiologiques.....  | 50         |
| 4.3. Paramètres comportementaux .....  | 52         |
| 4.4. Dosages des pesticides dans le sang et proxy de la contamination.....         | 54         |
| <br>   |            |
| <b>CHAPITRE I .....</b>  | <b>58</b>  |
| <b>Avant-propos et résumé du Chapitre I.....</b>                                   | <b>59</b>  |
| <br>   |            |
| <b>CHAPITRE II.....</b>  | <b>71</b>  |
| <b>Avant-propos et résumé du Chapitre II .....</b>                                 | <b>72</b>  |
| <br>   |            |
| <b>CHAPITRE III .....</b>  | <b>85</b>  |
| <b>Avant-propos et résumé du Chapitre III.....</b>                                 | <b>86</b>  |
| <br>   |            |
| <b>Chapitre IV .....</b>   | <b>126</b> |
| <b>Avant-propos et résumé du Chapitre IV .....</b>                                 | <b>127</b> |
| <br>   |            |
| <b>DISCUSSION GENERALE .....</b>   | <b>165</b> |
| <b>1. Effets des pesticides sur les traits d'histoire de vie des perdrix .....</b> | <b>168</b> |

|  |            |
|--|------------|
| 1.1. Synthèse des principaux effets sublétaux observés .....   | 168        |
| 1.2. La détoxification : un mécanisme coûteux ? .....  | 172        |
| 1.3. Différences de sensibilité dans la réponse à la contamination.....  | 176        |
| <b>2. Contamination par les mélanges de pesticides : interrogations autour des sources d'exposition et levier d'atténuation.....</b> | <b>177</b> |
| 2.1. Quantification de l'exposition <i>versus</i> quantification de la contamination.....  | 178        |
| 2.2. Rémanence des molécules interdites ou utilisation illégale ? .....  | 179        |
| 2.3. L'agriculture biologique comme outil d'atténuation des effets sublétaux ?.....  | 180        |
| <b>3. Perspectives de recherche .....</b>  | <b>182</b> |
| 3.1. Explorer les conséquences évolutives des effets sublétaux des pesticides .....  | 182        |
| 3.2. Aborder la difficulté des effets cocktails .....  | 183        |
| 3.3. La perdrix grise comme espèce sentinelle de la ZAPVS .....  | 184        |
| <b>4. Conclusion .....</b>   | <b>185</b> |
| <b>REFERENCES .....</b>  | <b>186</b> |
| <b>ANNEXE A .....</b>  | <b>208</b> |
| <b>ANNEXE B .....</b>  | <b>258</b> |
| <b>ANNEXE C .....</b>  | <b>272</b> |
| <b>ANNEXE D .....</b>  | <b>298</b> |
| <b>ANNEXE E .....</b>  | <b>300</b> |

# PREFACE

## 1. Publications

### 1.1. Publications en relation avec le manuscrit de thèse

Ce manuscrit est basé sur la liste des publications suivantes :

**Article I: Gaffard, A.**, Loiseau, C., Bretagnolle, V., Pays, O., & Moreau, J. (2022). Sublethal effects of pesticide residues differ between strains of captive Grey partridge : Consequences in terms of rearing conditions. *Applied Animal Behaviour Science*, 257, 105791. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2022.105791>

**Article II: Gaffard, A.**, Pays, O., Monceau, K., Teixeira, M., Bretagnolle, V., & Moreau, J. (2022). Feeding on grains containing pesticide residues is detrimental to offspring development through parental effects in grey partridge. *Environmental Pollution*, 312, 120005. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120005>

**Article III: Gaffard, A.**, Rodrigues, A., Bourillot, M., Millet, M., Pays, O., Monceau, K., Teixeira, M., Bichet, C., Bretagnolle, V., & Moreau, J. (2022). The Grey partridge (*Perdix perdix*) as a sentinel species of agroecosystem health? An experimental study linking multiple pesticides residues in blood and life-history traits. *Soumis dans Science of the Total Environment*

**Article IV: Gaffard, A.**, Harmange, C., Rodrigues, A., Millet, M., Teixeira, M., Monceau, K., Bretagnolle, V., Moreau, J., & Pays, O. (2022). Biomonitoring of GPS-tracked grey partridge in a French agroecosystem: home ranges, multiple pesticides residues in blood and life-history traits. *En preparation pour Agriculture, Ecosystems & Environment*

**Article V:** Moreau, J., Rabdeau, J., Badenhassser, I., Giraudeau, M., Sepp, T., Crépin, M., **Gaffard, A.**, Bretagnolle, V., & Monceau, K. (10/2022a). Pesticide impacts on avian species with special reference to farmland birds : A review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194(10), 790. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10394-0>

**Article VI:** Rodrigues, A., **Gaffard, A.**, Moreau, J., Monceau, K., Delhomme, O., & Millet, M. (2023). Analytical development for the assessment of pesticide contaminations in blood and plasma of wild birds : The case of grey partridges (*Perdix perdix*). *Journal of Chromatography A*, 1687, 463681. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463681>

**Article VII:** Fuentes, E., **Gaffard, A.**, Rodrigues, A., Millet, M., Bretagnolle, V., Moreau, J. & Monceau, K. (2022). Neonicotinoids: Still present despite their ban. *Soumis dans Science of the Total Environment*

### 1.2. Publications en collaboration dans des projets scientifiques annexes

Rabdeau J, Badenhausser I, **Gaffard A**, Mangelinck C, Moreau J, Bretagnolle V, Monceau K (2021) Assortative pairing for boldness and consequences for reproductive success in Montagu's harrier. *Biological Journal of the Linnean Society* 132(4):759–773, <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa233>

## 2. Participation à des colloques scientifiques

« Conservation de la perdrix grise : effets des pesticides et conséquences en termes de repeuplement » **Colloque de 2<sup>ème</sup> année de La Rochelle Université** – Septembre 2021, La Rochelle, France

« Sublethal and parental effects of pesticides on grey partridge's offspring quality » **Colloque d'Ecophysiologie Animale, 5<sup>ème</sup> édition** – CEPA5 – Octobre 2021, Montpellier, France

« The Grey partridge (*Perdix perdix*) as a biosentinel species of agroecosystem health? An experimental study linking multiple phyto-pharmaceuticals residues in blood and life-history traits » **SFE<sup>2</sup>-GfÖ-EEF joint meeting** – Novembre 2022, Metz, France

## 3. Vulgarisation grand public

« Effets des pesticides sur la reproduction de la perdrix grise » **37<sup>ème</sup> Festival International du Film Ornithologique 2021** – Octobre 2021, Ménégoût, France

« Déclin de la biodiversité aviaire en milieu rural » **Fête de la science** à Zoodyssée – Octobre 2021, Villiers-en-Bois, France

« Effets sublétaux des produits phytosanitaires sur les traits d'histoire de vie de la perdrix grise » **Ma Thèse en 180 secondes (MT180)** – Mars 2022, La Rochelle, France. **Présentation disponible sur ce lien :** <https://videos.univ-lr.fr/video/2320-ma-these-en-180-secondes-gaffard-agathe/>

#### 4. Tutorat

Encadrement stagiaire Master 2 (durée 6 mois)

Mars – Août 2020 : « Rôles des effets latents des produits phytosanitaires et de la souche d'élevage sur le comportement et l'écologie de la perdrix grise (*Perdix perdix*) » pzt Clotilde Loiseau

Mars – Août 2021 : « Effets sublétaux d'une ingestion chronique de pesticides à des concentrations environnementalement réalistes chez la Perdrix grise (*Perdix perdix*) » par Clémentine Piatti

Encadrement stagiaire Master 1 (durée 2 mois)

Avril – Juin 2022 : « Vivre en milieux agricoles : dosage des résidus de pesticides dans le sang et conséquences sur les traits d'histoire de vie de la perdrix grise (*Perdix perdix*) » par Marie Bourillot

Encadrement stage d'observation de 3ème (2020 et 2021)

#### 5. Enseignements

Travaux pratiques Master 1 Sciences pour l'environnement parcours Gestion de l'environnement et écologie littorale LRU « Mise en place d'un protocole expérimental et analyse de données sur une station de terrain » 10h TP – Septembre 2021, CEBC, France

Travaux pratiques de Licence 2 Sciences de la vie LRU « Biologie animale 2 : Outils pour l'étude et la compréhension du vivant »

Novembre 2021 : 18h TP

Avril 2022 : 18h TP

Octobre 2022 : 21h TP

## 6. Formations

Formation expérimentation faune sauvage : Formation à l'utilisation d'animaux de la faune sauvage non-hébergée a fins scientifiques. Dispensée par le Museum National d'Histoire Naturelle. Formation théorique au MNHN, formation pratique au CEBC sur grands oiseaux.

Formation intégrité scientifique dans les métiers de la recherche. Université de Bordeaux MOOC

Formation pratique pour le traitement des données en Ecologie : logiciel QGIS (Système d'Information Géographique)

Formation pratique pour le traitement des données en Ecologie : modélisation statistique avec le logiciel R (Système d'Information Géographique)

## 7. Préambule de la thèse

Cette thèse se base sur les quatre articles écrits en tant que première auteure (2 publiés, 1 soumis, 1 en préparation) mais fait aussi références à trois articles supplémentaires co-écrits pendant cette période (2 publiés et 1 soumis, disponibles en Annexes A, B et C). Elle se compose d'une « Introduction générale » présentant le contexte général des études réalisées et d'une partie « Méthodes générales » expliquant les approches expérimentales en conditions contrôlées et *in natura* effectuées pendant les trois années de thèse. Chaque chapitre est ensuite présenté sous forme d'article et organisé selon les différentes approches utilisées pour mettre en évidence les effets sublétaux des pesticides sur les traits d'histoire de vie de la perdrix grise.

- Chapitre I: Sublethal effects of pesticides residuals differ according to two strains of captive Grey partridge: consequences in terms of rearing condition (Article I ; publié).
- Chapitre II: Feeding on grains containing pesticide residues is detrimental to offspring development through parental effects in Grey partridge (Article II ; publié).
- Chapitre III: The Grey partridge (*Perdix perdix*) as a sentinel species of agroecosystem health? An experimental study linking multiple pesticides residues in blood and health status (Article III ; soumis).
- Chapitre IV: Biomonitoring of GPS-tracked grey partridge in a French agroecosystem: home ranges, multiple pesticides residues in blood and health status (Article IV ; en préparation).



Enfin, une dernière partie « Discussion » propose des axes de recherche connexes.

Les articles V (publié), VI (publié) et VII (soumis) sont disponibles à la fin du manuscrit en Annexe (A, B et C respectivement) et seront appelés dans le manuscrit sous cette forme en gras lorsque le texte y fera référence.

## **8. Terminologie**

### 8.1. Pesticides

La Directive 2009/128/CE définit le terme « Pesticide » de la manière suivante :

- D'une part les produits biocides au sens du règlement (CE) 528/2012.

Les produits biocides sont destinés à détruire, repousser ou rendre inoffensifs les organismes nuisibles, à en prévenir l'action ou à les combattre de toute autre manière par une action autre qu'une simple action physique ou mécanique. Ils sont nécessaires pour lutter contre les organismes nuisibles pour la santé humaine ou animale et les organismes qui endommagent les matériaux naturels ou manufacturés.

Exemples : désinfectants, produits de protection, produits de lutte, peintures antisalissure, etc.

- D'autre part les produits phytopharmaceutiques au sens du règlement (CE) n° 1107/2009

Les produits phytopharmaceutiques permettent de protéger les végétaux en détruisant ou éloignant les organismes nuisibles indésirables (y compris végétaux indésirables) ou en exerçant une action sur les processus vitaux des organismes ciblés (végétaux et animaux). Ils sont majoritairement utilisés en agriculture.

Exemples : insecticides, fongicides, herbicides, acaricides, molluscicides, corvicides, ...

Ainsi, les deux catégories de pesticides, biocides et produits phytopharmaceutiques, sont définies par leurs usages et non leurs formulations chimiques.

**Par mesure de simplicité, le terme « pesticide » sera utilisé tout au long du manuscrit, bien que la majeure partie des substances de synthèse considérées ici appartiennent à la catégorie des produits phytopharmaceutiques. De plus, seuls seront considérés ici les herbicides, fongicides et insecticides, les autres substances (rodenticides, molluscicides...) restant beaucoup plus rares sur notre zone d'étude.**

## 8.2. Traits d'histoire de vie

Les traits d'histoire de vie sont considérés dans ce manuscrit comme tous les traits déterminants la survie et/ou de la reproduction d'un animal (Stearns 1992). Ils comprennent ainsi (i) des paramètres morphologiques des individus telles que leur croissance osseuse et leur condition corporelle, (ii) des paramètres physiologiques représentatifs du stress physiologique, du système nerveux et du système immunitaire, (iii) des paramètres comportementaux et (iv) des paramètres reproducteurs tels que la coloration des caractères sexuels secondaires ou encore la taille de ponte. Pour chaque chapitre, une approche multi-trait a été systématiquement réalisée afin de pouvoir appréhender au mieux la complexité de l'impact des pesticides sur les traits d'histoire de vie des animaux.

## 9. Abbreviations

AChE: acetylcholine estérase

CB: pesticides carbamates

CE: Commission Européenne

DT50: urée de demi-vie d'une molécule dans le sol

EFSA: European Food Safety Authority / Autorité Européenne de Sécurité des Aliments

FAO: Food and Agriculture Organisation / Organisation pour l'Alimentation et l'Agriculture

FID: Flight Initiation Distance / Distance de Fuite

LC50: Lethal Concentration 50, désigne les concentrations du produit chimique dans l'air qui causent la mort de 50 % des animaux de laboratoire au cours de la période d'observation.

LD50 : Lethal Dose 50, quantité d'une matière, administrée en une seule fois, qui cause la mort de 50 % du groupe sur lequel la molécule est testée. La DL50 est une façon de mesurer le potentiel toxique à court terme (toxicité aiguë) d'une matière.

NOEC : No Observed Effect Concentration

N<sub>ppp</sub> : Nombre de pesticides détectés dans le sang

OC : pesticide organochlorés

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development / Organisation de Coopération et de Développement Economique (OCDE)

OP: pesticides organophosphorés

PFAs: Substances per- et polyfluoroalkylées

POPs: Persistent Organics Pollutants / Polluants Organiques Persistants

TU: Toxic Unit

IUCN: International Union for Conservation of Nature and Natural Resources / Union Internationale pour la Conservation de la Nature

WHO: World Health Organization / Organisation Mondiale pour la Santé (OMS)

WWF: organisation non gouvernementale internationale créée en 1961, vouée à la protection de l'environnement et au développement durable

# **INTRODUCTION GENERALE**



©Guillaume Calonego

Depuis un siècle, l'abondance des vertébrés a chuté de 58%, et près de 200 espèces ont disparu de la planète (Ceballos et al. 2015 ; WWF 2016). Actuellement, l'Union Internationale pour la Conservation de la Nature (UICN) répertorie en danger d'extinction près de 8700 espèces de vertébrés sur 50 000 évaluées et 5100 espèces d'invertébrés sur 22 000 évaluées (UICN 2019). Ces déclin et extinctions n'ont jamais été aussi rapides dans le passé puisque le taux d'extinction des espèces au cours du siècle dernier serait cent fois plus important que celui des cinq dernières extinctions de masse, conduisant à qualifier la période actuelle de sixième extinction (Ceballos et al. 2015). Or, contrairement aux autres grandes extinctions engendrées par des catastrophes naturelles, cette sixième extinction est liée à l'augmentation conjointe de la population humaine mondiale (8 milliards attendus pour Décembre 2022, United Nations 2022) et de ses activités (Chiron et al. 2014 ; Spooner et al. 2018), marquant le début d'une nouvelle ère : l'Anthropocène (Gibbon et al. 2000 ; Ceballos et al. 2015 ; Ripple et al. 2019). Ce terme signifie que les activités humaines sont devenues l'une des principales forces des changements globaux sur Terre, altérant le fonctionnement global des écosystèmes et invoquant de profondes modifications environnementales. De multiples facteurs de stress induits par les activités humaines sont à l'origine de cette crise, les deux premiers étant la surexploitation des ressources et l'intensification de l'agriculture (Maxwell et al. 2016).

## **1. Les agroécosystèmes contaminés par l'utilisation des pesticides**

Un des enjeux phare du XXI<sup>ème</sup> siècle repose sur le besoin de nourrir la population mondiale en éternelle croissance. Cet élément moteur des activités humaines a donc poussé à l'industrialisation massive du monde agricole. Elle implique, entre autres, la diminution des habitats naturels et semi-naturels, la simplification des configurations paysagères (disparition des haies, diminution du nombre de parcelles et augmentation de leur superficie), la réduction de la diversité de cultures, la mécanisation des activités agricoles et l'utilisation accrue de pesticides (Ghilain & Bélisle 2008 ; Geiger et al. 2010). Depuis plusieurs décennies, ces produits de synthèse sont suspectés d'être des contaminants environnementaux. En effet, l'agriculture intensive est responsable de la production et du relargage de ces nouvelles molécules de synthèse dans les différents compartiments environnementaux. Cette contamination ubiquitaire est suspectée de participer à la perte de biodiversité, car elle peut amener à des effets ponctuels ou chroniques sur les organismes qui y vivent tels que les animaux et les humains (Crump et al. 2002 ; Giaquinto et al. 2017 ; Tsui & Chu 2003). La prise de conscience générale de l'impact de ces produits sur la biodiversité et la santé humaine a été

rendue possible grâce aux travaux pionniers de nombreux scientifiques tels que Tyrone Hayes montrant les effets tératogènes (i.e., développement de malformations pendant la croissance de l'embryon) de l'atrazine sur les amphibiens (Hayes et al. 2006) ou encore Rachel Carson et son livre « Silent spring » (Carson et al. 2000). Le nombre de publications analysant les effets des pesticides sur les organismes vivants a d'ailleurs augmenté au cours des 30 dernières années, notamment en ce qui concerne la santé humaine, passant de 5% en 1989 à 35% en 2013 (Köhler & Triebkorn 2013). Récemment, les pesticides font même fait l'objet d'une attention croissante de la part de la santé publique, des politiciens et des mouvements écologistes comme le prouvent les débats autour de l'utilisation du glyphosate ou encore des insecticides néonicotinoïdes.

## 1.1. Utilisation des pesticides sur les espèces ciblées

### 1.1.1. Définition

Les pesticides sont des substances actives, phytoprotectrices ou synergistes utilisées pour contrôler ou éradiquer les nuisibles des cultures (Casida 2009). Ils constituent un groupe chimique très diversifié, avec 1472 molécules actives répertoriées dans la base de données Pesticides de la Commission européenne, bien que seules 452 soient actuellement autorisées (juillet 2022, base de données Pesticides de l'UE [https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides\\_fr](https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides_fr)). Les années 1930 et 1940 ont représenté les années les plus prolifiques en termes de création et d'utilisation de ces nouvelles substances, le but étant de maintenir l'efficacité et la sélectivité des pesticides pour un moindre coût (Casida 2009). Par exemple, les insecticides se doivent d'être toxiques pour les insectes ravageurs de cultures mais non toxiques pour les insectes qui bénéficient à la plante comme les pollinisateurs. Les herbicides, ont pour rôle de détruire les adventices qui sont en compétition avec les plantes pour les ressources mais ne doivent pas endommager les cultures. Enfin, les fongicides éradiquent les champignons qui induisent des maladies aux plantes sans interférer avec certains processus de fermentation comme dans l'industrie du vin. Ces mécanismes sélectifs des produits phytosanitaires reposent sur des modes d'action spécifique étudiés pour interagir sur un organisme d'un point de vue physiologique.

### 1.1.2. Modes d'action

Les modes d'action des pesticides modernes sont divers et dépendent des molécules impliquées et des voies physiologiques ciblées :

- (i) Les herbicides agissent principalement sur des voies spécifiques aux plantes en bloquant la photosynthèse, la synthèse des caroténoïdes ou la synthèse des acides aminés aromatiques et à chaîne ramifiée, essentiels chez les plantes mais pas chez d'autres organismes pour détruire les adventices en quelques jours (Monaco et al. 2002).
- (ii) Les fongicides agissent sur de nombreuses fonctions cellulaires importantes pour la croissance des extrémités des hyphes. De nombreux fongicides bloquent l'ergostérol (un stérol fongique), la biosynthèse de la tubuline ou la cytochrome c réductase, tandis que d'autres perturbent les fonctions cellulaires de base (Yang et al. 2011).
- (iii) Les insecticides actuels agissent principalement sur quatre cibles nerveuses, à savoir l'acétylcholinestérase, les canaux chlorés, le récepteur de l'acétylcholine et le récepteur de l'acide  $\gamma$ -aminobutyrique, systèmes présents chez les animaux mais pas chez les plantes (Ishaaya & Degheele 1998 ; Yu 2015).

Le mode d'action des molécules actives doit présenter une spécificité pour l'espèce ciblée, limiter l'émergence de résistances et garantir la sécurité des espèces non ciblées (Casida & Durkin 2017). Cependant, ce n'est pas toujours le cas. Par exemple, les insecticides organophosphorés (OP) et carbamates (CB) sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (AChE), une enzyme spécifique du tissu nerveux et de la jonction musculaire chez les insectes (Maroni et al. 2000; Casida & Durkin 2013). En raison de la nature commune de l'AChE à travers le règne animal, la toxicité de ces agents est problématique, y compris pour l'Homme (Ghasemi et al. 2015; Mostafalou & Abdollahi 2017). Depuis les années 1990, ils ont été progressivement remplacés par les néonicotinoïdes, qui ciblent toujours la fonction neuronale mais sont des agonistes compétitifs des récepteurs nicotiques de l'acétylcholine (nAChE), une stratégie censée augmenter la spécificité de la cible pour les insectes et non les vertébrés (Tomizawa & Casida 2003). Les néonicotinoïdes représentent désormais un tiers des insecticides utilisés dans le monde (Tomizawa & Casida 2005 ; Casida & Durkin 2013; Casida 2018 ; Gibbons et al. 2015), bien qu'il ait été démontré qu'ils avaient un impact sur les espèces non ciblées (Simon-Delso et al. 2015 ; Henry et al. 2015 ; Wood & Goulson 2017). Plus généralement, et bien que la toxicité des molécules de pesticides soit contrôlée dans le cadre d'essais expérimentaux standardisés avant approbation (EFSA 2009 ; OECD 2016), l'ensemble des effets néfastes sur la faune sauvage reste peu étudié (Köhler & Triebkorn 2013). Par conséquent, les effets différés sur la faune non-cible sont probablement sous-estimés par les organismes de réglementation (EFSA 2009 ; Mineau & Palmer 2013 ; Walker 2006).

## 1.2. Evaluation des risques pour les espèces non ciblées

Au-delà de la spécificité pour l'espèce ciblée, l'utilisation des pesticides se doit de garantir la sécurité des espèces non ciblées (Casida & Durkin 2017). Dans le cadre du processus d'approbation, les fabricants doivent donc tester l'innocuité de la molécule afin de garantir la sécurité tout au long de la chaîne trophique, y compris l'environnement et les espèces non ciblées, les produits alimentaires, les agriculteurs et les consommateurs (Casida & Durkin 2017). Pour cela, les évaluations du devenir des molécules dans l'environnement et des risques associés doivent inclure à la fois les données de toxicité relatives à la molécule en question mais aussi ses produits de dégradation et ses métabolites potentiels avant et après l'application (FAO & OMS 2013). Ces tests de toxicité sont effectués selon des protocoles standardisés produits par l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) et en accord avec l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA). Ils sont réalisés sur un spectre limité d'espèces animales dites indicatrices de leur taxon, comme le rat (*Rattus norvegicus*) pour les mammifères, la caille japonaise (*Coturnix c. japonica*) et le colin de Virginie (*Colinus virginianus*) pour les oiseaux ou encore le xénope (*Xenopus laevis*) pour les amphibiens. Brièvement, la première étape de ces tests vise à tester l'effet des molécules sur une de ces espèces dans les conditions d'exposition les plus extrêmes pour identifier les molécules à faible risque, c'est-à-dire celles qui ne produisent pas d'effets détectables dans ces conditions et qui ne seront pas prises en compte dans la suite du processus. Les molécules qui ont échoué à l'étape de sélection précédente sont alors testées dans des conditions d'exposition plus réalistes qui comprennent l'évaluation des risques aigus et des risques pour la reproduction. Si les résultats de l'évaluation de la seconde étape ne sont toujours pas conformes aux limites, une évaluation des risques plus poussée est nécessaire. Cette dernière étape suit une approche au cas par cas pour éliminer les effets « inacceptables », comme la mortalité ou encore les effets à long terme (EFSA 2009). Au cours des tests, différents seuils sont signifiés sur la base des observations comme l'estimation de la dose médiane létale (DL50) (Døving 1991 ; Hodson 1985). Le but est de calculer la dose qui cause 50% de mortalité sur les organismes testés. Les tests sont conduits sur des périodes de 96 h ou moins. Ce sont d'ailleurs ces valeurs qui sont utilisées par les instances gouvernementales pour déterminer des seuils maximums autorisés dans l'environnement (Kramer et al. 2009). Ces tests permettent aussi de déterminer la CL50 (c'est-à-dire la concentration qui tue la moitié de la population testée) sur laquelle les tests de toxicité pour la reproduction sont ensuite basés. Il existe aussi des tests d'exposition dite « chronique » mais qui ne sont pas réalisés sur toutes les substances actives disponibles sur le marché et dont



l'estimation est considérée comme peu fiable (voir **Article V** en Annexe A pour plus de détails). Au sein de l'Union Européenne, les fabricants soumettent les résultats de leurs évaluations à un membre rapporteur de l'EFSA, rapport qui est ensuite soumis à tous les états membres (EFSA 2018). La Commission européenne (CE), sur la base de la conclusion de l'EFSA, décide d'approuver ou non la nouvelle substance active. Après l'autorisation de la CE, chaque état membre peut (ou non) mettre en œuvre son propre processus d'approbation des produits commerciaux comprenant la molécule nouvellement autorisée. Les molécules sont initialement approuvées pour une durée maximale de 15 ans, en fonction du risque qu'elles peuvent comporter (le renouvellement de l'autorisation suit un processus similaire). En ce qui concerne le devenir et le comportement de la substance active dans l'environnement, le règlement (CE) 1107/2009 stipule clairement qu'elle ne peut pas être approuvée si elle est considérée comme un polluant organique persistant (POP), c'est-à-dire que : (i) la demi-vie de dissipation (DT50, c'est-à-dire le temps nécessaire à la dégradation de 50 % de la substance active appliquée dans le sol ou le système eau-sédiments, mesuré dans des conditions de laboratoire ou de terrain) est supérieure à 2 mois dans l'eau ou 6 mois dans le sol et les sédiments, (ii) la propagation de la molécule active est potentiellement élevée (c'est-à-dire détectée sur de longues distances) et (iii) le facteur de bioaccumulation et/ou la toxicité sont élevés pour les espèces non ciblées. Plusieurs scientifiques remettent en question ces processus d'évaluation et d'approbation car leur capacité à prédire les conséquences en conditions de terrain restent limitée (Gibbons et al. 2015 ; Köhler & Triebkorn 2013 ; Mineau 2005). Par exemple, plusieurs études récentes ont souligné la persistance des pesticides dans l'environnement, un large spectre de ces substances étant retrouvées dans les tissus biologiques de différents organismes invertébrés (Bertrand et al. 2018 ; Pelosi et al. 2021) et vertébrés (Kuzukiran et al. 2021 ; Brodeur et al. 2022 ; Fritsch et al. 2022). Cette contamination suppose l'existence de défauts dans les autorisations de mise sur le marché de ces produits mais aussi probablement dans leur utilisation. En effet, les tests de laboratoire étudient les effets d'une molécule isolée en condition contrôlées et sur un spectre restreint d'espèces. Or, dans l'environnement, les molécules peuvent i) interagir entre elles et ii) avec d'autres facteurs biotiques (e.g., bioaccumulation, biomagnification) et abiotiques (e.g., influence des paramètres météorologiques) que les études toxicologiques ne prennent pas en compte. En plus de la contamination environnementale, les résultats de ces tests pourraient sur- ou sous- estimer la toxicité des pesticides telle qu'elle existe dans l'environnement (Mineau 2005).

### 1.3. Contamination ubiquitaire des pesticides dans l'environnement

La contamination environnementale se fait par différentes voies et peut impliquer des niveaux élevés de pesticides (Galon et al. 2021 ; Giorio et al. 2021 ; Fig. 1). Par exemple, les pesticides peuvent contaminer l'air par leur dispersion lors de la pulvérisation, leur volatilisation après application ou leur distribution via les poussières générées lors du semis de graines enrobées (Socorro et al. 2016 ; Giorio et al. 2021 ; Fig. 1). Lorsque des pesticides sont pulvérisés, la fraction des pesticides appliqués qui est dispersée dans l'air est estimée à environ 15-40 % (Socorro et al. 2016). La contamination de l'air entraîne ensuite une pollution diffuse dans les sols, les eaux de surface et tous les types d'organismes à la suite du dépôt des pesticides (Fig. 1). Dans les champs traités, les pesticides s'accumulent dans les sols, puis pénètrent dans les cours d'eau par ruissellement (Fig. 1). De même, les pesticides peuvent contaminer à la fois les sols et l'eau après la mort et la décomposition des plantes (Bonmatin et al. 2015 ; Giorio et al. 2021 ; Fig. 1). Ce transfert horizontal des pesticides du site d'application vers les zones environnantes peut expliquer pourquoi les plantes sauvages et les haies sont contaminées par des substances telles que les néonicotinoïdes à proximité des cultures traitées par semences (Botías et al. 2016 ; Wood & Goulson 2017). En effet, on estime que seuls 2 à 20 % des néonicotinoïdes utilisés pour enrober les semences (i.e., recouvrement des semences par des pesticides au moment du semis de la graine) sont absorbés par les cultures ; ainsi, jusqu'à 95 % des molécules actives restent disponibles dans le sol et l'eau en moyenne (Hladik et al. 2018). La persistance des pesticides dans l'environnement dépend de la sorption de la molécule (c'est-à-dire le processus par lequel une substance devient attachée à une autre) sur les particules du sol ou des sédiments aquatiques, ce qui ralentit leur dissipation et leur dégradation. (Fenner et al. 2013 ; Fig. 1). La dégradation des pesticides fait intervenir des processus biotiques (médiés par l'action de micro-organismes ou de plantes) et des processus abiotiques (transformation photochimique et chimique) (Fenner et al. 2013 ; Fig. 1). La manière dont un pesticide peut être dégradé est déterminée par ses propriétés/formulation chimiques et les conditions environnementales auxquelles il est exposé. Par exemple, le glyphosate et son métabolite primaire, l'acide aminométhylphosphonique (AMPA), sont les résidus de pesticides les plus fréquemment trouvés dans les sols en Europe (Silva et al. 2019). En fonction des conditions sur le terrain, l'AMPA peut persister jusqu'à 21 fois plus longtemps que le glyphosate dans les sols (Bento et al. 2016). L'imidaclopride, l'un des insecticides les plus vendus, présente des valeurs de DT50 allant de 77 à 425 jours dans des conditions de laboratoire, mais dans des conditions réalistes, des preuves solides suggèrent que le DT50 peut atteindre 1250 jours (Goulson 2013 ;

Wood & Goulson 2017). Globalement, nos connaissances concernant les facteurs qui affectent la persistance des pesticides et de leurs métabolites identifiés (pour les néonicotinoïdes, voir Simon-Delso et al. 2015) dans la nature ainsi que leur persistance une fois absorbés par les plantes (Giorio et al. 2021) ou leurs consommateurs sont extrêmement limitées (Goulson 2013). En effet, les pesticides peuvent également être bioaccumulés (c'est-à-dire stockés dans l'organisme dans différents tissus) et/ou bioamplifiés (c'est-à-dire accumulés le long de la chaîne trophique) (Fig. 1). Ainsi, se poser la question des impacts des pesticides sur la biodiversité suppose que l'application des pesticides est connue et caractérisée, que la biodiversité y ait exposée et que les capacités de résilience de cette dernière sont connues. Or, la pression exercée par les pesticides est un phénomène dynamique qui dépend de la localisation et de la répétition des traitements, avec des pesticides identiques ou variés, des transferts des substances dans l'environnement et de leurs transformations. Elle est ainsi caractérisée par une dynamique spatiale et temporelle propre à chaque contexte. De même, la biodiversité constitue un ensemble en perpétuelle évolution sous l'effet d'une multitude de facteurs et de pressions biotiques et abiotiques dont les effets individuels sont difficiles à isoler. A l'échelle mondiale, l'IPBES a hiérarchisé globalement les différents facteurs du déclin de la nature. Les pollutions, qui incluent celles par les pesticides, y apparaissent suivant les milieux comme étant la troisième (en eau douce) ou la quatrième cause (en milieux terrestres et marins) des déclinés observés.

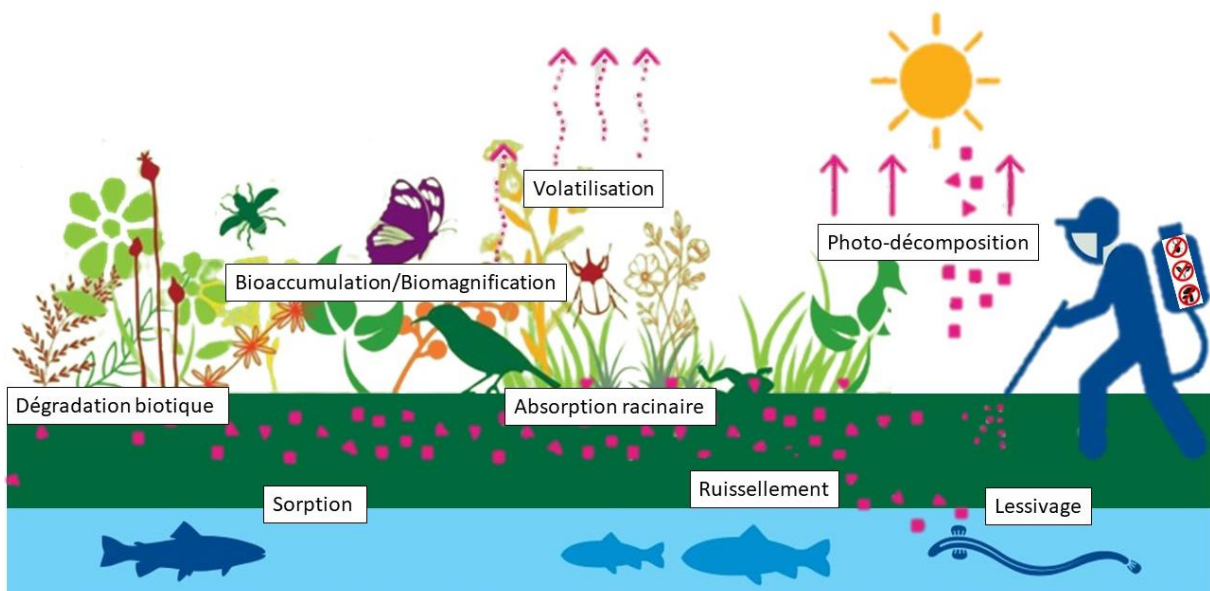


Fig. 1 Schéma de la contamination ubiquitaire des pesticides dans l'environnement et des différents processus de dégradation et de transformation des molécules. Réalisé et modifié à partir du Pesticide Atlas 2022

## 2. Impacts sur les espèces non-cibles : le cas de l'avifaune spécialiste du milieu agricole

62% des 8688 espèces menacées ou quasi-menacées d'extinction étudiées vivent en milieux agricoles et ont été affectées par l'expansion spatiale et les progrès techniques liés à l'intensification de l'agriculture (Maxwell et al. 2016). Dans ces milieux, les déclin d'espèces ont été documentés pour l'ensemble des taxons incluant les mammifères, les oiseaux, les amphibiens et les reptiles (Robinson & Sutherland 2002). Cependant, la situation des oiseaux a été identifiée comme particulièrement préoccupante et documentée à plusieurs reprises (Donald et al. 2001 ; Benton et al. 2003 ; Robinson & Sutherland 2002), leur abondance ayant chuté de 32%, entre 1990 et 2015 à l'échelle de l'Europe, et de 52% entre 1989 et 2017 à l'échelle de la France. Longtemps minimisée, la responsabilité des pesticides dans le déclin des oiseaux a été souligné dans de récents rapports (Leenhardt et al. 2022). Plusieurs études ont démontré en Europe une relation indirecte entre les usages de pesticides et le déclin des communautés d'insectes et des populations d'oiseaux (Brickle et al. 2000 ; Boatman et al. 2004 ; Hart et al. 2006). De plus, les réseaux de phytovigilance de différents pays européens (incluant par exemple la France, l'Angleterre et l'Espagne) révèlent de très nombreux cas d'empoisonnement d'oiseaux par les pesticides à proximité des agrosystèmes. En raison de leur toxicité et du manque général de spécificité, les pesticides peuvent aussi induire des effets directs chez les oiseaux spécialistes des milieux agricoles (Donald et al. 2001 ; Boatman et al. 2004 ; Martínez-López et al. 2007 ; Berny et al. 2010 ; Guitart et al. 2010a et b ; Mineau & Whiteside 2013 ; Vyas 2017).

### 2.1. Effets indirects des pesticides

Les effets indirects des pesticides sur les oiseaux spécialistes des milieux agricoles sont principalement liés à la déplétion des ressources alimentaires (e.g., insectes, graines) (Geiger et al. 2010 ; Smith et al. 2010 ; McKenzie et al. 2011 ; Girard et al. 2014). L'abondance de graines associée à la distribution des oiseaux granivores (Moorcroft et al. 2002), a considérablement diminué dans les milieux agricoles (-42% en richesse spécifique et -67% en densité d'adventices entre 1970 et 2005 en France dans Fried et al. 2009 ; voir aussi Robinson & Sutherland 2002). Cette diminution est préoccupante pour le maintien des populations d'oiseaux, tels que l'alouette des champs (*Alauda arvensis*) dont les besoins alimentaires quotidiens sont estimés à 8 grammes de graines (soit 4200 à 5600 graines) par individu et par jour (Eraud et al. 2015), ou encore la perdrix grise (*Perdix perdix*) qui se nourrit principalement de graines de l'été jusqu'à l'hiver (Bro 2016). L'abondance et la diversité d'insectes est également impactée par l'utilisation des pesticides (Sánchez-Bayo & Wyckhuys 2019) alors

que le succès reproducteur de plusieurs espèces d'oiseaux repose sur leur consommation. Chez la perdrix grise, les juvéniles sont strictement insectivores pendant les premiers jours suivant l'éclosion car physiologiquement incapables de digérer les graines (Green et al. 1987), rendant le succès reproducteur de cette espèce totalement dépendant de l'abondance d'insectes (Bro 2016). Chez le bruant proyer (*Miliaria calandra*) et le bruant jaune (*Emberiza citrinella*), les insecticides appliqués en période de reproduction ont diminué la ressource alimentaire en arthropodes et ont ainsi été identifiés comme un des facteurs détériorant l'état corporel des poussins et de leur succès d'envol (Brickle et al. 2000 ; Boatman et al. 2004 ; Hart et al. 2006). De même, l'application d'herbicides sur des cultures a pour effet direct de réduire les ressources végétales (adventices) et pour effets indirects la diminution des arthropodes du sol, avec des répercussions sur des populations de faisan et de perdrix grise (Taylor et al. 2006). Ces effets peuvent être encore plus délétères pour les espèces spécialistes que pour les généralistes en raison de leur plus grande sensibilité à la qualité de l'habitat (Chiron et al. 2014 ; Teillard et al. 2015).

## 2.2. Effets directs des pesticides

En plus de leurs effets indirects à travers la déplétion des ressources alimentaires, les pesticides peuvent directement altérer les traits d'histoires de vie des oiseaux. En effet, la contamination directe des individus peut arriver par ingestion, respiration ou encore par voie cutanée lors d'une exposition aiguë (ponctuelle) ou chronique (répétée dans le temps) aux pesticides (Fig. 2). En fonction de la dose, cela peut entraîner des effets toxiques à court terme (létaux ; Poliserpi et al. 2021) ou à long terme (sublétaux), qui sont moins visibles mais peuvent affecter la survie et/ou la reproduction des individus de manière chronique (Lopez-Antia et al. 2015a, 2018; Fig. 2).

### 2.2.1. Voies d'exposition

Les oiseaux peuvent être contaminés par les pesticides de différentes manières (Fig. 2). La première voie d'exposition est la respiration des composants chimiques lorsque l'application vient de se produire dans les cultures. Les oiseaux peuvent aussi se contaminer par voie cutanée, via les plumes ou encore par la peau des pattes. L'absorption cutanée est probablement un facteur non négligeable d'intoxication des oiseaux, certaines molécules étant plus toxiques par cette voie que par ingestion (e.g., Hudson et al. 1979 ; Driver et al. 1991). Cependant, cette voie est souvent ignorée dans les tests de toxicité, et les données existantes sont principalement issues d'espèces modèles mammifères (Mineau 2002, 2011 et 2012 ; Maul et al. 2018). En effet,

la majorité des études se sont concentrées sur la contamination via l'ingestion d'aliments/eau contaminés car elle est considérée comme le principal mode d'exposition des oiseaux aux pesticides (Lopez Antia et al. 2016 mais voir Driver et al. 1991 et Mineau 2011). Les oiseaux peuvent être exposés à une intoxication primaire et secondaire (Story & Cox 2001 ; Albert et al. 2010 ; Krone et al. 2017). La première concerne l'ingestion de graines enrobées ou d'eau contaminée par des pesticides (i.e., à des concentrations relativement élevées) tandis que la seconde consiste en l'ingestion d'organismes contaminés, tels que les plantes, les graines issues de ces plantes ou les insectes (i.e., à des concentrations considérées comme plus faibles; Berny & Gaillet 2008 ; Aktar et al. 2009 ; Millot et al. 2017). En fonction de leurs propriétés chimiques et de leurs affinités avec les tissus biologiques, les molécules de pesticides peuvent être bioaccumulées (i.e., stockées dans l'organisme dans différents tissus) et/ou bioamplifiées (i.e., accumulées le long de la chaîne trophique). Par exemple, en raison de leur haut niveau de lipophilie et de leur persistance dans l'environnement, les organochlorés (OC) sont connus pour s'accumuler dans les organismes, y compris les œufs, et à travers la chaîne trophique (van Drooge et al. 2008 ; Luzardo et al. 2014). A l'inverse, les fongicides, qui sont également assez courants pour le traitement des semences, ne semblent pas se bioaccumuler en raison de leur métabolisme et de leur excrétion rapides (Gross et al. 2020). C'est également le cas des néonicotinoïdes, qui sont censés avoir un faible impact toxicologique sur les oiseaux et être excrétés rapidement (Casida 2018). Les processus biologiques de dégradation ne sont pas suffisamment connus pour prédire le devenir de ces molécules, et donc, leur transfert à travers la chaîne trophique. De plus, même si les néonicotinoïdes et les fongicides, par exemple, sont rapidement excrétés des organismes, cela n'empêche pas les effets sublétaux et synergiques sur les organismes exposés, mais aussi sur leur descendance (Gross et al. 2020). En effet, les embryons peuvent être contaminés par le transfert maternel de pesticides lipophiles dans le vitellus, comme cela est documenté chez les volailles (Donoghue 2001 ; MacLachlan 2008 ; Guo et al. 2018). Les embryons peuvent aussi être contaminés à travers la coquille des œufs s'ils sont exposés à des pulvérisations de pesticides, à de la végétation contaminée ou même par les plumes contaminées des parents (Bro et al. 2015, 2016 ; Hussein et al. 2014 ; Ortiz-Santaliestra et al. 2020). Les effets directs des pesticides sur les individus dépendent donc du mode d'exposition, du mode d'action des molécules impliquées, de leur toxicité, de leur concentration, du stade d'exposition (embryon, poussin ou adulte), de la répétition de l'exposition (exposition aiguë versus chronique) et de la sensibilité des individus et des espèces (Grue & Shipley 1984 ; Patnode & White 1991 ; Peraica et al. 1993). L'exposition aux pesticides peut ainsi entraîner des dommages internes qui affectent la physiologie, le métabolisme et/ou

les stratégies d'histoire de vie des individus, conduisant soit à la mort (c'est-à-dire des effets létaux), soit à des effets sublétaux (différés).

### 2.2.2. Effets létaux

Les effets létaux des pesticides se caractérisent par la mort de l'individu peu après l'exposition et reflètent une toxicité aiguë. Selon la position trophique des individus, l'intoxication peut résulter d'un empoisonnement primaire (e.g., consommation de graines enrobées chez les oiseaux granivores) ou secondaire, notamment chez les rapaces (e.g., consommation de proies contaminées). De nombreuses études ont rapporté des décès importants d'oiseaux dans le monde entier causés par un empoisonnement aux pesticides. Un cas bien connu est celui de la mort d'une centaine de mouettes atricilles (*Leucophaeus atricilla*) après l'application de parathion dans un champ de coton où les oiseaux sont morts après avoir ingéré les insectes contaminés (White et al. 1983). L'ingestion de graines enrobées ou l'exposition à des insecticides qui altèrent la fonction nerveuse peuvent avoir des effets létaux sur les oiseaux (Addy-Orduna et al. 2019 ; Poliserpi et al. 2021). Cela a été rapporté, par exemple, chez les perdrix grises suite à l'ingestion de graines traitées à l'imidaclopride (néonicotinoïdes) (Millot et al. 2017). En Oregon, 160 bernaches du Canada (*Branta canadensis*) sont mortes après l'application de trois insecticides inhibiteurs de cholinestérase dans un champ adjacent à leur site de nidification. Les doses d'application pour chaque pesticide étaient inférieures aux doses recommandées, mais la combinaison des trois pesticides aurait causé la mort des oies (Cox 1991). L'empoisonnement mortel des oiseaux passe souvent inaperçu parce qu'ils peuvent s'éloigner du site d'empoisonnement avant de mourir, ou les carcasses peuvent être prélevées par des charognards. De plus, les oiseaux malades pourraient être plus difficiles à détecter, dû à leur plus faible mobilité. C'est pourquoi la mortalité causée par l'intoxication par des pesticides n'est souvent constatée qu'après des événements de décès massifs (Cox 1991; Mineau & Tucker 2002). Mise à part les carcasses d'oiseaux retrouvées à proximité de ressources alimentaires manifestement contaminées, il reste cependant difficile de déterminer si la mort d'un oiseau est due à des effets létaux directs ou à des effets sublétaux.

### 2.2.3. Effets sublétaux

Les effets sublétaux des pesticides sur les organismes non-cibles sont plus pernicious et peuvent entraîner des changements comportementaux, physiologiques et développementaux qui ne peuvent pas être estimés ou prédits de manière fiable à partir de tests de laboratoire classiques (Park et al. 2020). Ces effets peuvent avoir des conséquences à long-terme sur l'aptitude

phénotype des individus et avoir des conséquences à l'échelle populationnelle. Chez toutes les espèces, chaque produit a le potentiel d'être bénéfique ou délétère à la structure et la physiologie d'une cellule, d'un tissu, d'un organe ou au niveau de l'organisme dans son ensemble. Les substances chimiques peuvent augmenter, réduire ou interférer avec les fonctions essentielles à la digestion, la reproduction, la croissance, le système nerveux ou encore le métabolisme. Les effets sublétaux des pesticides. Ci-après sont présentés les effets sublétaux des pesticides sur différents paramètres liés à la survie et/ou à la reproduction des oiseaux résultant principalement d'expériences en conditions contrôlées (voir Fig. 2).

### Paramètres sanguins

Peu d'études ont porté sur les effets des pesticides sur les paramètres sanguins (e.g., électrolytes, lipides, protéines, glucose, enzymes), probablement parce que ces éléments sont liés à des fonctions majeures et ne sont donc pas directement analysés. Seul l'hématocrite (i.e., le rapport entre le volume des globules rouges et le volume total du sang) est un paramètre mesuré de manière récurrente dans les expériences d'exposition aux pesticides. Par exemple, le thirame, le lindane, le fipronil et l'imidaclopride diminuent l'hématocrite (Lopez-Antia et al. 2013, 2015b et 2015c). Cependant, divers processus peuvent conduire à une telle baisse, notamment (i) ceux directement liés aux globules rouges (c'est-à-dire l'hémolyse, l'hémorragie ou la réduction de l'érythropoïèse), (ii) la peroxydation lipidique (Lopez-Antia et al. 2015b) ou (iii) des effets indirects dus à la famine ou à la diminution d'autres composés plasmatiques (Lopez-Antia et al. 2015c). Les fongicides triazoles, par exemple, diminuent les niveaux de cholestérol et de triglycérides, probablement par le biais d'une perturbation endocrinienne (Lopez-Antia et al. 2018 ; Fernández-Vizcaíno et al. 2020). Ces altérations sont liées à d'autres troubles développés par la suite.

### Stress oxydatif et détoxification

Le stress oxydatif, qui induit la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), est connu pour être un médiateur dans la cascade conduisant à la fois à l'apoptose cellulaire et aux cancers (Franco et al. 2009). Le stress oxydatif a été principalement étudié dans le contexte de l'exposition des oiseaux aux néonicotinoïdes (Lopez-Antia et al. 2013, 2015a ; Hoshi et al. 2014 ; Ortiz-Santaliestra et al. 2015 ; Lv et al. 2020). Par exemple chez les cailles exposées aux néonicotinoïdes, le stress oxydatif induit par la contamination à l'imidaclopride a entraîné une inflammation et une fibrose hépatique (Lv et al. 2020). L'accumulation de ROS est normalement limitée par l'activité de détoxification du système antioxydant. Cependant, cette



fonction peut elle aussi être altérée par les pesticides (Hoshi et al. 2014 ; Khalil et al. 2017). Certaines études ont observé une augmentation des défenses antioxydantes, tels que les niveaux de vitamines et de caroténoïdes dans le plasma après une exposition au thirame ou à l'imidaclopride (Lopez-Antia et al. 2013, 2015a et 2015b). Les caroténoïdes sont des molécules clés puisqu'en plus de leurs propriétés biologiques, ils sont impliqués dans plusieurs fonctions comme l'immunocompétence, la synthèse de la vitamine A mais aussi la coloration des caractères sexuels secondaires chez les oiseaux (Møller et al. 2000 ; Broughton et al. 2017). Si les caroténoïdes sont simultanément requis pour plusieurs fonctions (Fitze et al. 2007) et parce qu'ils représentent une ressource limitée, il devrait y avoir un compromis dans leur allocation entre les fonctions de maintenance et d'ornementation sexuelle (Baeta et al. 2008). Par conséquent, lorsque la maintenance de l'individu est menacée par les pesticides, les caroténoïdes devraient être alloués aux fonctions cellulaires plutôt qu'à l'expression des caractères sexuels secondaires, avec des conséquences sur la sélection sexuelle et le choix du partenaire (voir ci-dessous).

#### Système immunitaire et résistances aux pathogènes

Les pesticides peuvent altérer le système immunitaire par plusieurs voies : (i) en supprimant ou en renforçant directement les processus cellulaires impliqués comme par exemple la réponse inflammatoire (Lopez-Antia et al. 2013, 2015a, 2015b et 2015c, voir Mitra et al. 2011 et Gibbons et al. 2015 pour une revue), (ii) en altérant les principaux organes responsables de la production des cellules impliquées dans la réponse immunitaire comme le thymus ou la rate (Lopez-Antia et al. 2013), (iii) ou encore en réponse à des troubles hormonaux induits par les pesticides ou à l'augmentation des niveaux de stress oxydatif. Ces conséquences négatives de l'exposition aux pesticides sur le système immunitaire pourraient fortement affecter la dynamique hôte-pathogène par une sensibilité accrue aux parasites (voir Moreau et al. 2021) et finalement la dynamique de la population hôte.

#### Altération du système nerveux

Par leur manque de spécificité sur le système nerveux des espèces cibles, plusieurs familles de pesticides, en particulier les insecticides, s'attaquent aussi à celui des espèces non ciblées via l'AChE, une enzyme majeure du système nerveux (Casida 2009, 2011 et 2018; Casida & Durkin 2013; Casida & Bryant 2017). L'AChE dégrade l'acétylcholine, un neurotransmetteur impliqué dans les systèmes nerveux sympathique et parasympathique via les synapses cholinergiques. Les CB et les OP phosphorylent l'AChE, la rendant inactive. Ainsi,

l'acétylcholine s'accumule et entraîne une hyperstimulation des récepteurs cholinergiques. Les néonicotinoïdes ciblent également cette fonction neuronale en tant qu'agonistes compétitifs du nAChE, bien que l'on suppose que leurs effets sont moindres chez les vertébrés en raison de la prévalence réduite de ce récepteur (Tomizawa & Casida 2003 et 2005 ; Casida 2018). Bien que les néonicotinoïdes n'agissent pas directement sur l'AChE, ils induisent une dégénérescence neuronale, qui peut à son tour affecter son activité et altérer le système nerveux (Abu Zeid et al. 2019; Rawi et al. 2019). Les symptômes associés à une altération du système nerveux se traduisent souvent par une diminution globale de l'activité de recherche de nourriture, entraînant une perte de poids (Grue & Shipley 1984 ; Eng et al. 2017 et 2019) mais aussi une vulnérabilité accrue aux prédateurs (Hunt et al. 1992), une diminution ou augmentation de la défense du territoire/du nid (McEwen & Brown 1966 ; Fox & Donald 1980) ou de l'agressivité (Farage-Elawar & Francis 1988), une diminution des soins parentaux (Grue et al. 1982 ; Bennett et al. 1991) mais aussi un retard de la migration (Eng et al. 2019).

#### Perturbations du système endocrinien

Certains pesticides sont considérés comme des perturbateurs endocriniens et peuvent agir par différentes voies associées à l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénalien (HPA). Premièrement, certains pesticides peuvent imiter les hormones sexuelles, entraînant une augmentation de leur concentration et conduisant à des phénomènes de féminisation ou masculinisation des embryons et/ou à une diminution de la fertilité des adultes (Lopez-Antia et al. 2015c ; Khalil et al. 2017). Deuxièmement, les pesticides peuvent altérer la synthèse et le métabolisme des hormones interférant avec des niveaux physiologiques plus élevés. Par exemple, des pesticides tels que les fongicides triazoles peuvent moduler le cytochrome P450 aromatase (CYP19) responsable de la conversion des androgènes en œstrogènes (Saxena et al. 2015) ce qui peut affecter le comportement sexuel des mâles (Ubuka & Tsutsui 2014 ; Balthazart 2017), la détermination du sexe (Major & Smith 2016) et la cognition (Bailey & Saldanha 2015). Une réduction de l'œstradiol plasmatique a été démontrée chez les perdrix rouges (*Alectoris rufa*) exposées au tébuconazole (Fernández-Vizcaíno et al. 2020). Troisièmement, les pesticides peuvent altérer les glandes endocrines et, par conséquent, les sécrétions hormonales comme la corticostérone (i.e., hormone du stress ; Monclús et al. 2018) perturbant l'homéostasie individuelle, le comportement et le développement des gonades (Pandey et al. 2017).

## Comportement

Le comportement d'un organisme est le résultat intégratif d'une série de processus biochimiques et physiologiques, considéré comme un indicateur de la santé individuelle, plus sensible au stress que d'autres mesures physiologiques (Hellou et al. 2011 ; Moreau et al. 2022). Par conséquent, la variation des différents paramètres présentés ci-dessus peut entraîner une altération du comportement des oiseaux telles que leur activité générale (Eng et al. 2017, 2019), leur prise de risque (Kobiela et al. 2015), leur vigilance (de Faria et al. 2018) ou encore leurs comportements de reproduction (Moreau et al. 2021) et avoir des effets positifs ou négatifs sur la survie (c'est-à-dire la recherche de nourriture, la reproduction, la prédation) en fonction du contexte environnemental (Smith et Blumstein 2008). Les perturbations comportementales peuvent se manifester en dessous des niveaux létaux et peuvent donc être considérées comme des indicateurs sensibles de réponse toxique (Hellou et al. 2011). Par exemple, chez les amphipodes d'eau douce (*Eohaustorius estuaries*), des altérations comportementales d'évitement sont observables à des doses 10-1000 fois inférieures à la LD50 de plusieurs pesticides (Hellou et al. 2008, 2009a). Ainsi, en plus d'être un indicateur de l'état de santé de l'individu, le comportement peut être considéré comme un signal d'"alerte précoce" pour évaluer la qualité de l'environnement, bien qu'il ait été peu utilisé par les écotoxicologues jusqu'ici (Dell'Omo 2002, Hellou et al. 2008). Par exemple, les traits comportementaux des passereaux ont été utilisés comme indicateur des niveaux de pollution en milieux urbanisés (Albayrak et al. 2011, Moreau et al. 2022). En outre, les tests comportementaux sont relativement rapides, et peuvent être réalisés sur le terrain comme une approche simple, non invasive et complémentaire aux mesures des paramètres physiologiques (Peakall 1985).

## Reproduction et conséquences à l'échelle populationnelle

L'exposition aux pesticides peut altérer plusieurs aspects de la reproduction, tels que la production d'ornements sexuels, le succès de l'accouplement, la qualité et le nombre de descendants, compromettant ainsi la production et la survie de la génération suivante. Dans un premier temps, ces effets peuvent être observés suite à des perturbations endocriniennes, affectant la mise en place des caractères sexuels secondaires et/ou la motivation à se reproduire. Par exemple, il a été démontré que les pesticides modifient les caractères sexuels secondaires à base de caroténoïdes impliqués dans la sélection sexuelle (LopezAntia et al. 2013, 2014, 2015a, b et c; Pandey et al. 2017; Moreau et al. 2021). Comme la coloration à base de caroténoïdes représente un signal honnête de la qualité individuelle en raison de l'implication de ces pigments dans les processus antioxydants et immunitaires (Møller et al. 2000), la diminution de la

coloration chez les mâles pourrait réduire leur attrait pour les femelles, comme cela a été observé chez le canard colvert (*Anas platyrhynchos*) (Rowe et al. 2011 ; Alonso-Alvarez et al. 2012). Cependant, les mâles de perdrix grise exposés aux pesticides et donc moins colorés ont montré une activité accrue pendant la saison de reproduction, suggérant une stratégie pour compenser le manque d'attrait des femelles (Moreau et al. 2021). Dans un second temps, les pesticides peuvent aussi affectés les organes impliqués dans la reproduction. Les mâles exposés à des pesticides, tels que les néonicotinoïdes, les OP, les CB ou le glyphosate, ont présenté une baisse de la fertilité due à des altérations des tissus testiculaires et/ou à l'apoptose des cellules germinales, ce qui suggère que la production de spermatozoïdes pourrait être compromise (Hoshi et al. 2014 ; Khalil et al. 2017 ; Mohanty et al. 2017). Cependant, si la densité des spermatozoïdes a diminué de moitié, la mobilité et le statut oxydatif des spermatozoïdes ne semblent pas être modifiés par l'exposition aux néonicotinoïdes (Humann-Guillemint et al. 2019b). De même, l'exposition au triazole a réduit le nombre de spermatides dans les testicules des cailles japonaises exposées mais sans conséquence sur leur fertilité (Grote et al. 2008). De nombreuses études ont aussi portées sur l'effets des pesticides sur la qualité et la quantité d'œufs et de descendants. Par exemple, chez les perdrix rouges (*Alectoris rufa*) exposée au thiram, l'épaisseur de la coquille diminuait chez les œufs fécondés (Lopez-Antia et al. 2015b). La robustesse de la coquille d'œuf est particulièrement importante puisqu'elle conditionne la survie de l'embryon et prévient l'échec du développement embryonnaire (Odsjöa & Sondell 2014). La forme (e.g., Lopez-Antia et al. 2015b) et le volume des œufs (e.g., Hernández et al. 2008 ; Moreau et al. 2021) pourraient également être affectés par l'exposition de la mère aux pesticides, avec des conséquences sur la quantité de ressources nutritives disponibles pour l'embryon au cours de son développement (Lopez-Antia et al. 2015b). Enfin, le transfert transgénérationnel de molécules toxiques de la femelle à l'embryon est également possible en raison de la nature lipophile de certains contaminants (Donoghue 2001 ; Bro et al. 2016). Plusieurs études ont détecté des molécules de pesticides à l'intérieur des œufs (Martínez-López et al. 2007 ; Jagannath et al. 2008 ; Corcellas et al. 2017 ; Hernández et al. 2018 ; Steyn et al. 2018), mais l'origine de la contamination n'est pas toujours connue, car l'exposition aux pesticides peut se produire pendant la formation de l'œuf et/ou lors que l'exposition de la ponte (Bro et al. 2015 et 2016). Quelle que soit l'origine de l'exposition, une l'altération de la reproduction et/ou de l'exposition précoce des embryons aux pesticides peut favoriser un développement anormal, l'échec de l'éclosion et/ou réduction du nombre de jeunes à l'envol (Hernández et al. 2008 ; Lopez-Antia et al. 2018 ; Ortiz-Santaliestra et al. 2020), affectant directement la dynamique des populations. Un exemple bien connu est celui du DDT et de son métabolite, le DDE, qui ont eu

un effet dévastateur sur de nombreuses espèces d'oiseaux des grands lacs d'Amérique du Nord en raison d'une réduction de 90 % de l'épaisseur des coquilles d'œufs (Colborn et al. 1993 ; Hamlin & Guillette 2010). Des effets similaires des organochlorés ont été détectés chez des canards et des hérons du delta de l'Ebre en Espagne (Mañosa et al. 2001). Il est communément admis que ces effets ont causé le déclin des populations d'oiseaux concernées. Cependant, la majorité des effets sublétaux développés ci-dessus ont été détectés chez des oiseaux en captivité après une exposition chronique à toutes les classes de pesticides neurotoxiques et n'ont pas encore été liés au déclin des populations (Walker 2003).

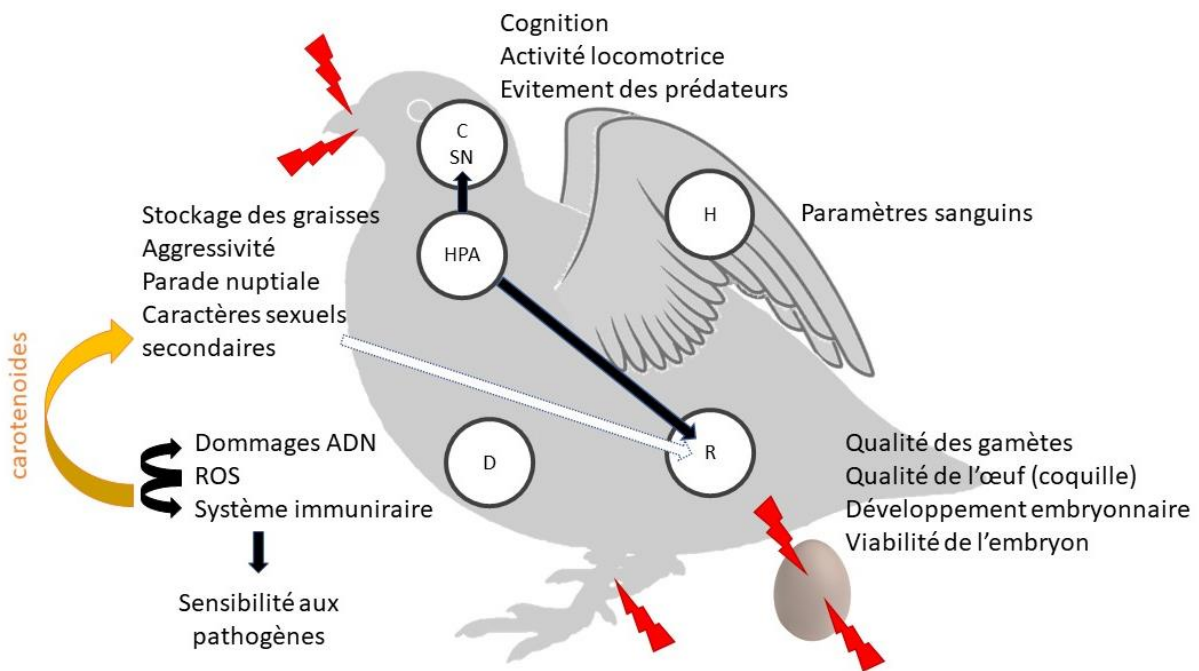


Fig. 2 Représentation schématique des effets sublétaux des pesticides sur les oiseaux. Les cercles représentent les principaux systèmes/fonctions physiologiques avec C pour le cerveau, SN pour le système nerveux, HPA pour l'axe hypothalamo-pituitaire-adrénal, H pour l'homéostasie, D pour la détoxification et R pour reproduction. Les flèches noires indiquent les effets directs d'une fonction sur une autre. La flèche blanche indique un lien indirect (par la voie comportementale). Les éclairs rouges indiquent le mode d'exposition (voir le texte pour plus de détails). Réalisé à partir de la Figure 2 de l'Article V disponible en Annexe A.

### **3. Front de science et axes de recherche de la thèse**

Dans la section précédente, nous avons détaillé comment les pesticides affectaient la physiologie, le comportement et les traits d'histoire de vie des oiseaux (Fig. 2), entraînant des altérations de la reproduction et de la survie qui sont les principales composantes de la dynamique des populations. Cependant, les études reliant ces effets observés individuellement aux conséquences au niveau de la population ou de la communauté restent rares. En effet, à l'échelle des populations, les études sont généralement corrélationnelles, reliant l'intensification des pratiques agricoles et/ou l'utilisation de pesticides aux tendances ou aux tailles des populations d'oiseaux (Chamberlain et al. 2000 ; Donald et al. 2001 ; Robinson & Sutherland 2002 ; Chiron et al. 2014 ; Teillard et al. 2015 ; Stanton et al. 2018 ; Li et al. 2020). La modélisation de la dynamique des populations a également été utilisée, mais ces études s'appuient généralement sur des données toxicologiques individuelles en laboratoire (Bennett et al. 2005 ; Bennett & Etterson 2006 et 2007 ; Etterson et al. 2017 ; Crocker & Lawrence 2018). Si ce dernier type d'étude peut mettre en garde contre les effets sublétaux de quelques molécules actives de pesticides testées individuellement, il ne permet pas de comprendre les processus qui conduisent au déclin des populations. En effet, la complexité des relations entre la contamination des différentes matrices de l'environnement par les pesticides, l'exposition des organismes et les effets qui en découlent dépendent de nombreux facteurs incluant, de manière non exhaustive, d'une part le type de substances, leur période d'application et leur devenir dans l'environnement et, d'autre part, le type d'organisme, leurs traits de vie, leur sensibilité aux pesticides, leur capacité d'adaptation et les interactions biotiques auxquelles ils sont confrontés. Ainsi, appréhender le rôle spécifique des pesticides dans le déclin de l'avifaune nécessite donc de prendre en considération la complexité de ce contexte environnemental, en incluant les effets des mélanges, la sensibilité des espèces et les conséquences à l'échelle des populations et des communautés (Brühl & Zaller 2019 ; Topping et al., 2020). Répondre à cet objectif ambitieux nécessite la mise en œuvre de meilleures synergies entre deux types d'approches complémentaires déjà utilisées à ce jour qui sont i) les approches en conditions contrôlées en laboratoire ou en conditions semi-expérimentales et ii) l'utilisation du biomonitoring et des espèces sentinelles (Fig. 3).

#### 3.1. Etudes expérimentales en conditions contrôlées : quelles améliorations apporter ?

“The dose makes the poison” (Paracelsus, XVI<sup>ème</sup> siècle), un des principes les plus reconnus de toxicologie ne s'applique pas dans tous les cas. Ce principe repose sur le fait qu'une concentration plus importante d'une molécule pourrait produire des effets plus néfastes à la

santé humaine ou environnementale. C'est sur ce principe que repose la plupart des expérimentations en laboratoires visant à déterminer les effets sublétaux des pesticides sur les espèces non-cibles vus dans la sous-section 2.2.3. Dans la majorité de ces tests, les individus sont mis en contact avec différentes concentrations d'un seul contaminant (par exemple, aucun et 5 concentrations selon les normes OCDE) pendant une période allant de quelques semaines à quelques mois en fonction de l'espérance de vie de l'espèce et de la demi-vie des molécules testées. Cependant, dans la plupart des cas, ces doses sont supérieures à celles retrouvées dans l'environnement (Annett et al. 2014 ; Hasenbein et al. 2017). Dans un tel contexte, les résultats issus de ces expériences présentent un intérêt limité car (i) ils sont généralement obtenus à partir d'un nombre limité d'individus appartenant à deux ou trois espèces modèles (e.g., caille japonaise, dimant mandarin, colin de virginie pour ce qui est des oiseaux), celles-ci ne reflétant pas nécessairement la diversité des traits écologiques et du cycle de vie au sein d'un même taxon; (ii) ils ne reflètent pas la complexité des interactions biotiques et abiotiques, y compris les effets cocktails imprévisibles ; et (iii) ils ne prennent pas en compte les effets transgénérationnels (voir Mineau 2005 ; Dalkvist et al 2009 ; Hilbers et al. 2018). Ainsi, la validité des conclusions issues de ces études reste limitée aux conditions et scénarios d'exposition choisis, qui peuvent différer des conditions réelles. En particulier, les échelles spatiales et temporelles considérées peuvent s'avérer être trop réduites pour certaines situations (ex. modification du paysage ou des usages des sols) et certains modèles biologiques. L'absence, dans la plupart des cas, de connectivité avec le milieu environnant est également un facteur limitant pour la compréhension des effets (voire de leur atténuation ou résilience) tels qu'ils se produisent dans l'environnement. Ainsi, les seuils d'effets des pesticides observés *in situ* sont dans certains cas largement plus bas que dans les études réalisées en microcosmes ou mésocosmes (Schäfer et al. 2012 ; Liess et al. 2021). Cependant, les approches en conditions contrôlées au laboratoire ou en conditions semi-expérimentales restent un complément essentiel aux études en milieu naturel pour mieux identifier et caractériser les relations de cause à effet entre l'exposition aux pesticides et les réponses biologiques observées. Les lignes directrices de l'EFSA ainsi que les éléments présentés ci-dessus plaident pour améliorer les protocoles expérimentaux afin de mieux considérer les effets sublétaux des pesticides, en particulier les interactions entre les molécules (i.e., effets cocktails) mais aussi leur interconnexion avec les processus physiologiques et les traits d'histoire de vie qui, en fin de compte, déterminent la dynamique des populations (EFSA 2009).

### 3.1.1. Limites des espèces modèles élevées en captivité

Les études de toxicité concernant les effets des pesticides sur les oiseaux sont communément effectuées sur des organismes modèles tels que le diamant mandarin (*Taeniopygia guttata*) le canard colvert, la caille japonaise et le colin de virginie. Une espèce devient un modèle en science lorsqu'elle combine des propriétés pratiques qui facilitent son maintien en captivité, son élevage et sa manipulation avec des caractéristiques qui la rendent apte à répondre à des questions de recherche particulières (Dietrich et al. 2020 ; Matthews & Vosshall 2020). Les organismes modèles sont irremplaçables pour l'étude des aspects fondamentaux de la biologie, mais leur capacité à aborder les spécificités biologiques de leur taxon sous l'effet de leur environnement naturel complexe est insuffisante. Par exemple, en prenant l'exemple du diamant mandarin très largement utilisé comme organisme modèle, les effets combinés des périodes de reproduction non dépendantes de la saison, du caractère particulier écologique et climatique de la zone aride australienne dont il est originaire rend cette espèce particulière parmi les oiseaux. Les stratégies évolutives associées à un large niveau de tolérance aux variations environnementales peuvent avoir déterminé leur succès en tant que modèles de laboratoire, mais peuvent également faire du diamant mandarin une espèce à part parmi les oiseaux. On peut observer que les réponses des diamants mandarins dans le cadre d'études portant sur leur physiologie, leur comportement et leur histoire de vie peuvent différer de la réponse de la plupart des autres espèces aviaires (Griffith et al. 2021). De plus, la sélection dans l'environnement simplifié des conditions de captivité au laboratoire peut canaliser l'expression de phénotypes qui sont normalement sélectionnés dans des environnements complexes. En effet, une fois qu'une espèce est sélectionnée comme modèle, sa biologie change (Bolker 2019). Les traits développés par une espèce dans la nature ne seront pas les mêmes que ceux des organismes modèles qui ont subi une forte sélection dans l'environnement d'un laboratoire de recherche. Finlay (2019) résume cette « laboratorisation » (concept de Robinson 1965) comme suit : « selection on little but breeding and surviving in a sterile and changeless environment ». En prenant l'organisme modèle de référence, la souris de laboratoire, la divergence évolutive rapide s'expliquent par des tailles de populations faibles, consanguines et soumises à une sélection stricte. Les souris de laboratoire montrent des modifications de comportement (Blanchard et al. 2013 ; Chalfin et al. 2014), de génétiques de populations (Yang et al. 2011), de la fonction immunitaire (Beura et al. 2016 ; Reese et al. 2016), du métabolisme, de la physiologie (Martin 1987 ; Zolfaghari et al. 2013). Ces observations s'appliquent à la plupart des autres espèces modèles. En effet, la captivité accroît les effets de dérive génétique et de



consanguinité, modifiant ainsi la sensibilité de l'espèce aux pesticides. Les lignées génétiques d'oiseaux utilisés pour ce type d'expérimentation sont par conséquent susceptibles de répondre de manière biaisée à l'exposition aux pesticides. L'utilisation d'espèces sauvages, indicatrices et sentinelles de leur environnement sur le terrain, peut être largement plus représentative des effets des pesticides rencontrés par les espèces dans leur milieu (Hopkins 2007 ; Segner & Baumann 2016).

### 3.1.2. Etudier les effets transgénérationnels

Un autre aspect important qui doit être exploré sont les effets transgénérationnels des pesticides. Alors que certaines molécules sont connues pour être transmises via la ponte, les effets de ce transfert sur les poussins (dispersion, survie, etc.) sont mal connus (voir la sous-partie « reproduction » de la section 2.2.3). Chez la caille japonaise, les pesticides perturbateurs endocriniens comme le métoxychlore, peuvent affecter les parents et leur progéniture en modifiant la sécrétion d'hormones et le comportement sexuel, ce qui peut être renforcé par une exposition continue, exacerbant ainsi le déclin des populations (Ottinger et al. 2005). Une telle démonstration des effets transgénérationnels et/ou épigénétiques des pesticides n'existe pas chez les oiseaux, alors que ces effets ont été déjà démontrés dans d'autres modèles biologiques. Chez les invertébrés, l'exposition transgénérationnelle aux pesticides altère le système immunitaire de la progéniture, impactant potentiellement leur survie (Heine-Fuster et al. 2017). Chez le poisson zèbre (*Danio rerio*), le transfert maternel de fipronil entraîne une exposition élevée à son métabolite (le sulfone), altérant les sécrétions d'hormones thyroïdiennes chez la progéniture et induisant des malformations (Xu et al. 2019). Les effets transgénérationnels épigénétiques (c'est-à-dire les modifications héréditaires de la régulation des gènes sans modification de l'ADN; Vandegehuchte & Janssen 2011) peuvent également contribuer au maintien d'une faible fertilité chez les populations aviaires exposées aux perturbateurs endocriniens; cependant, ces effets ont surtout été étudiés dans des modèles animaux tels que les rats (voir Warner et al. 2020 pour une review) mais font défaut chez les oiseaux.

### 3.1.3. Prendre en compte les effets cocktails

Lorsque plusieurs pesticides sont présents simultanément dans l'environnement, ils peuvent, lorsque les concentrations sont suffisantes, provoquer des effets « cocktails » (Cedergreen 2014). Les effets cocktails apparaissent lorsque des composés exercent conjointement un effet différent sur les espèces exposées, que lorsqu'ils sont seuls (Cedergreen 2014). Trois principaux

scénarios concernant ces effets ont été définis (Hernandez et al. 2017): (i) les molécules n'interagissent pas et présentent donc des effets additifs ou des effets indépendants si elles agissent sur la même cible; (ii) les molécules interagissent et fonctionnent de manière synergique (c'est-à-dire que les effets seront supérieurs aux effets additifs des molécules considérées séparément); et (iii) les molécules interagissent et fonctionnent de manière antagoniste (c'est-à-dire que les effets seront réduits par rapport aux effets additifs des molécules considérées séparément). La question des effets cocktails a été majoritairement abordée à partir de travaux considérant une exposition simultanée à différents pesticides. Les résultats qui en découlent sont très variables et parfois contradictoires, selon les combinaisons testées, les types d'organismes étudiés ou encore les protocoles expérimentaux mis en œuvre, rendant difficile l'identification de tendances robustes. La majorité des travaux décrit une augmentation des impacts des pesticides lorsque les organismes sont exposés à des mélanges, certains exemples montrant toutefois des effets synergiques allant au-delà de l'addition des effets de chaque substance. Par exemple, certaines familles de pesticides comme les OP, les CB, les insecticides pyréthroïdes, les fongicides azolés et les herbicides triaziniques, sont souvent impliquées dans des effets synergiques (Cedergreen 2014 ; Rizzati et al. 2016). De tels effets synergiques ont été observés, par exemple, chez des abeilles exposées à un mélange de deltaméthrine (insecticide pyréthroïde) et de prochloraze (fongicide imidazole) (Colin & Belzunces 1992 ; Chalvet-Monfray et al. 1996 ; Meled et al. 1998). Une étude récente évaluant la génotoxicité sur l'oignon dans un bioessai de germination montre qu'à de faibles concentrations auxquelles elle ne produit pas d'effet seule, la mésotrione associée à l'atrazine présente un effet génotoxique (Felisbino et al., 2018). La question des effets des mélanges de pesticides reste sous-étudiée à ce jour, les plans d'expérience mis en œuvre ne permettant en outre pas toujours de démontrer une réelle interaction entre les pesticides, au-delà d'un simple effet additif (Jonker et al. 2005). La difficulté à aborder la question des effets des mélanges dans les études expérimentales s'explique en partie par le fait que la communauté scientifique se heurte toujours à des limites conceptuelles et méthodologiques pour faire face à la multiplicité des scénarios possibles. Bien que l'effet létal d'un seul pesticide puisse être testé efficacement dans des conditions de laboratoire (Mineau 2002), une extrapolation des effets sublétaux correspondant à la complexité d'une exposition environnementale réaliste est difficile à produire. Ceci peut expliquer pourquoi les prédictions faites à partir d'études expérimentales et les effets mesurés en conditions sauvages sont souvent mal corrélés (Shore & Douben 1994 ; Story & Cox 2001). Il semble inconcevable d'étudier les effets de chaque molécule de pesticides existantes avec toutes les possibilités d'interactions qu'il pourrait avoir entre elles,

les études expérimentales étant longues et coûteuses, et l'expérimentation animale devant être évitée un maximum. Outre l'utilisation de la modélisation, un plan expérimental intéressant dans le cas de l'étude des effets cocktails consisterait à privilégier des descripteurs d'effets basés sur les traits d'histoire de vie et le comportement des organismes exposés à des mélanges observés *in natura*. Par exemple, étudier les effets de deux sources alimentaires de valeurs nutritionnelles équivalentes mais soit issues de l'agriculture conventionnelle soit de l'agriculture biologique pourrait permettre une estimation plus fiable des effets sublétaux issus d'un cocktail de pesticides (Moreau et al. 2021).

### 3.2. Nécessité du biomonitoring sur les espèces sauvages sentinelles

Une espèce sentinelle est un organisme (bactérie, plante ou animal) qui répond aux changements globaux et reflète ainsi les conditions de l'environnement dans lequel il vit. Ces organismes sont généralement les premiers de leur écosystème à être affectés par un changement environnemental particulier, tel que le changement climatique ou encore la contamination par les pesticides (Woodruff 2011). Ainsi, le suivi de ces espèces *in natura* sur des sites contaminés ou non permet d'observer l'état d'une population soumise à plusieurs stress environnementaux et peut donc fournir des évaluations qualitatives et quantitatives de la qualité des écosystèmes concernés (Woodruff 2011 ; Siddig et al. 2016 ; Fig. 3). Quelques groupes de vertébrés dominent la littérature sur le biomonitoring des contaminants, notamment les poissons et les oiseaux dont les rapaces et les oiseaux marins restent les plus suivis (Burger 1993 ; Gómez-Ramírez et al. 2014). Les oiseaux spécialistes des milieux agricoles sont eux aussi des candidats précieux comme sentinelles des agroécosystèmes en raison de leur sensibilité aux pesticides. De plus, ils sont particulièrement bien surveillés dans le monde entier, étant impliqués dans des programmes de baguage à long terme sur des décennies ou plus, ce qui a permis de mettre en évidence leur déclin (par exemple, France, Suède, Royaume-Uni, États-Unis, Europe, Amérique du Nord; Wretenberg et al. 2006 ; Comolet-Tirman et al. 2015 ; Stanton et al. 2018 ; Rosenberg et al. 2019 ; Li et al. 2020 ; Burns et al. 2021; DEFRA 2021). Ainsi, la détection et l'analyse des pesticides dans les tissus internes d'oiseaux vivant en plaine agricole peuvent fournir une multitude d'informations sur l'évaluation des risques liés aux pesticides (Espín et al. 2016 ; Pacyna-Kuchta et al. 2022). À ce jour, les programmes de surveillance des oiseaux des champs reposent essentiellement sur les nécropsies d'animaux trouvés morts sur le terrain (e.g., Berny 2008). Un enjeu majeur est donc de développer des protocoles de surveillance d'alerte précoce pour anticiper ces décès à travers le prélèvement de matrices biologiques non-létales telles que le sang, les plumes, les fécès ou encore les œufs

(Espín et al. 2016 ; Pacyna-Kuchta et al. 2022). Dans le cas des néonicotinoïdes qui font l'objet d'un suivi attentif en terme de biomonitoring, des molécules ont été trouvés dans le sang d'oiseaux insectivores comme la bondrée apivore (*Pernis apivorus*), la chouette effraie (*Tyto alba*) et le martinet alpin (*Tachymarptis melba*) (Byholm et al. 2018 ; Humann-Guilleminot et al. 2021), mais aussi chez des oiseaux granivores comme le moineau domestique (*Passer domesticus*) (Humann-Guilleminot et al. 2019a ; voir aussi **Article VII** disponible en Annexe C). Cependant, bien que les prélèvements sanguins représentent le moyen le plus prometteur pour révéler une exposition sublétales potentielle, la plupart des études ayant dosé des pesticides dans le sang d'oiseaux sauvages n'ont pas corrélé la contamination aux traits d'histoire de vie. Ce fossé repose probablement sur des difficultés méthodologiques car il faut à la fois avoir (i) accès à un suivi de faune sauvage, (ii) avoir les autorisations pour capturer les individus et effectuer une prise de sang, (iii) avoir accès aux détails des pratiques agricoles autour du site de capture, et enfin (iii) avoir la possibilité d'effectuer des dosages de pesticides dans des matrices biologiques (Stephen et al. 2018 ; Valverde et al. 2022). Pour réaliser un suivi à long terme sur une ou plusieurs espèces d'oiseaux des champs, obtenir un large éventail de leurs traits d'histoire de vie (physiologiques, comportementaux, reproduction) et pouvoir quantifier leur contamination (soit directement via une prise de sang soit indirectement via la qualité de leur domaine vital) nécessitent une collaboration étroite entre scientifiques et acteurs du territoire. Cela a permis, par exemple, de montrer des différences de comportement en matière de vigueur entre des passereaux capturés dans des haies entourées d'une grande proportion de cultures biologiques ou conventionnelles traitées (Moreau et al. 2022). Les plateformes de recherche socio-économique à long terme (LTSER) permettent ce type d'approches transdisciplinaires (Bretagnolle et al. 2018 ; Mirtl et al. 2018 ; Angelstam et al. 2019). Ces vastes programmes de surveillance permettent de quantifier directement *in natura* l'impact des pesticides sur les populations et les communautés d'oiseaux en facilitant la surveillance d'espèces biosentinelles dans différents contextes de pratiques agricoles (e.g., Bertrand et al. 2018 ; Pelosi et al. 2021 ; Fritsch et al. 2022 ; Fig. 2). Une connaissance détaillée du paysage, de l'occupation du sol et des pratiques agricoles sur plusieurs décennies est aussi un atout essentiel pour réaliser des plans d'échantillonnage spatialement explicite et minimiser certains biais (Bretagnolle et al. 2018).

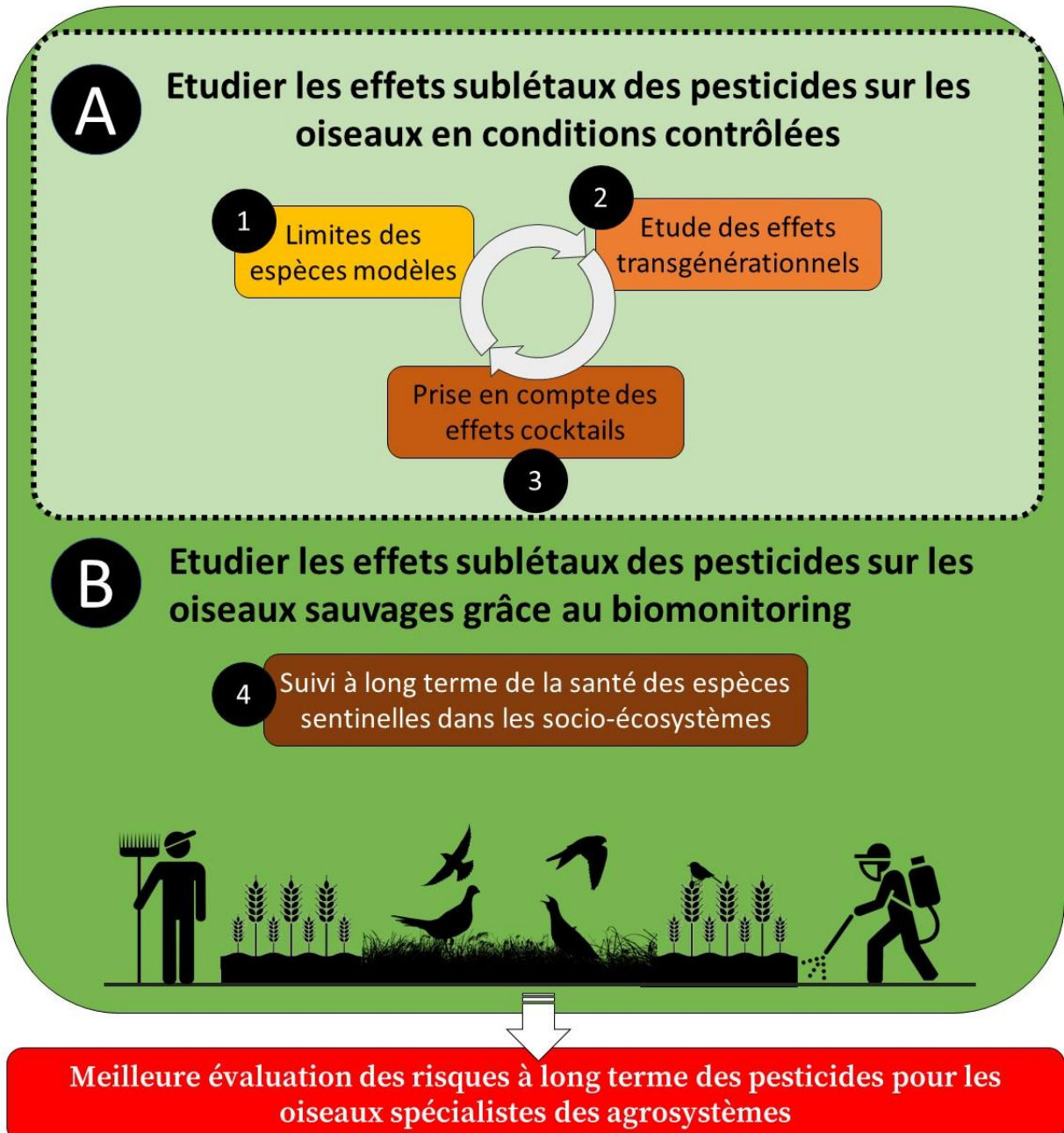


Fig. 3 Schéma résumant les différents axes de recherche de la thèse abordés dans la partie 3 de l'introduction pour une meilleure évaluation des risques à long terme des pesticides pour les oiseaux spécialistes des milieux agricoles. Réalisé à partir de la Figure 6 de l'Article V disponible en Annexe A

## 4. Objectifs et organisation de la thèse

### 4.1. Problématique

Depuis des décennies, nous observons une crise majeure de la biodiversité qui touche tous les taxons. L'un des cas les plus documenté est celui touchant les oiseaux spécialistes des milieux agricoles, mais la contribution des pesticides dans ce déclin reste encore controversée. En effet, la plupart des études portant sur les effets des pesticides sur les oiseaux se limitent à leur évaluation dans des conditions de laboratoire contrôlées, utilisant des espèces d'oiseaux dites « modèles » et exposées généralement à des doses non représentatives de celles retrouvées dans l'environnement. Plus important encore, ces tests négligent les multiples voies d'exposition auxquelles les individus sont soumis sur le terrain (effets cocktails) et l'impact de ces effets à des échelles populationnelles.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse visent à enrichir le front de science concernant les effets sublétaux des pesticides sur les oiseaux spécialistes des milieux agricoles (Fig. 3). Pour cela, la perdrix grise (*Perdix perdix*), une espèce emblématique des plaines agricoles européennes en fort déclin, a été choisie comme modèle d'étude. L'intérêt de cette espèce repose notamment sur son écologie, puisqu'elle est intimement liée à la contamination des agroécosystèmes par les pesticides, mais aussi sur sa capacité à s'adapter à l'élevage en captivité. En effet, le fort intérêt cynégétique qui repose sur cette espèce gibier a entraîné un grand nombre de recherche sur le maintien de ses populations dans toute l'Europe (Sotherton et al. 2014 pour le Royaume-Uni, Bro 2016 pour la France). L'enjeu principal de mon étude est d'intégrer les différentes lacunes soulignées dans cette introduction dans l'étude des effets sublétaux des pesticides sur les traits d'histoires de vie de la perdrix grise. En combinant une approche expérimentale en conditions contrôlées avec le biomonitoring de perdrix sauvages, le but est d'exposer les oiseaux à des mélanges de pesticides réalistes, en (i) prenant en compte l'importance de la lignée génétique de l'oiseau (i.e., lignées captives et sauvages) ; en (ii) intégrant les effets transgénérationnels et en (iii) abordant la problématique des effets cocktails tout ceci permettant d'explorer (iv) les capacités de la perdrix grise comme espèce sentinelle des agrosystèmes (Fig. 3).

### 4.2. Axes de recherche

La première partie de mes travaux de thèse s'est portée sur des expérimentations en captivité pour étudier les effets sublétaux des pesticides sur les traits d'histoire de vie de la perdrix grise en conditions contrôlées (Fig. 3). Un design expérimental innovant et commun sur les trois

années de thèse a été mis en place afin d'exposer les oiseaux à (i) des doses environnementales et (ii) un potentiel effet cocktail, tout cela dans des conditions se rapprochant au mieux des conditions de vie naturelle de la perdrix (i.e., faible densité d'individus dans les volières). Dans ce cadre expérimental, la première hypothèse que j'ai souhaité tester était de savoir si les effets sublétaux des pesticides sur les traits d'histoire de vie des individus pouvaient varier en fonction de la lignée génétique de la perdrix, c'est-à-dire issue de souche d'élevage ou de souche sauvage (Chapitre I, Fig. 3). L'élevage en captivité entraînant généralement une maladaptation, les perdrix issues de souche d'élevage pourrait être plus sensibles à la contamination aux pesticides par rapport aux perdrix de souche sauvage ayant gardées leur plasticité. La seconde hypothèse à laquelle je me suis intéressée portait sur les effets transgénérationnels en cherchant à savoir s'il existait des effets parentaux de la contamination aux pesticides sur les traits d'histoire de vie de la génération suivante (Chapitre II, Fig. 3). Une des voies connues de détoxification chez les oiseaux est le dépôt des molécules exogènes dans les œufs. Ainsi, les parents exposés à l'ingestion de pesticides pourraient transférer les molécules à leur progéniture, ce qui pourrait affecter leurs traits d'histoire de vie à l'éclosion. Enfin, la troisième question à laquelle je me suis intéressée dans ce cadre était de savoir si la perdrix grise pouvait être utilisée comme espèce sentinelle des agrosystèmes. Pour cela, j'ai cherché à savoir s'il était possible de doser les pesticides dans le sang de perdrix captives, de quantifier leur état de contamination et de le corréliser à leurs traits d'histoire de vie (Chapitre III, Fig. 3). Les perdrix exposées à un cocktail de pesticides devraient être plus contaminées en comparaison avec des perdrix non exposées. Cette contamination devrait entraîner l'altération des traits d'histoire de vie des perdrix.

La seconde partie de mes travaux de thèse s'est portée sur un suivi GPS *in natura* de perdrix sauvages capturées sur la Zone Atelier Plaine et Val de Sèvre (ZAPVS), une plateforme de recherche socio-économique à long terme me permettant d'obtenir une connaissance détaillée de l'occupation du sol et des pratiques agricoles où vivent les perdrix équipées. L'objectif de ce suivi était de mettre en pratique les résultats obtenus en captivité à l'issue du Chapitre III et donc d'utiliser la perdrix grise comme espèce sentinelle des plaines agricoles (Chapitre IV, Fig. 3). Les perdrix exposées à une plus grande surface d'agriculture conventionnelle dans leur domaine vital devraient être plus contaminées par rapport à des perdrix où les surfaces cultivées en agriculture conventionnelle sont moins importantes. Les perdrix les plus contaminées devraient montrer des paramètres de santé altérés.

Chaque chapitre est présenté sous forme d'article dans la suite du manuscrit. La majorité de la méthodologie étant commune à l'ensemble des chapitres, une section sur les méthodes

générales est présentée. Les autres méthodes spécifiques aux questions sont décrites au sein de chaque chapitre.



# METHODES GENERALES



## 1. Modèle d'étude : la perdrix grise (*Perdix perdix*)

### 1.1. Description de l'espèce

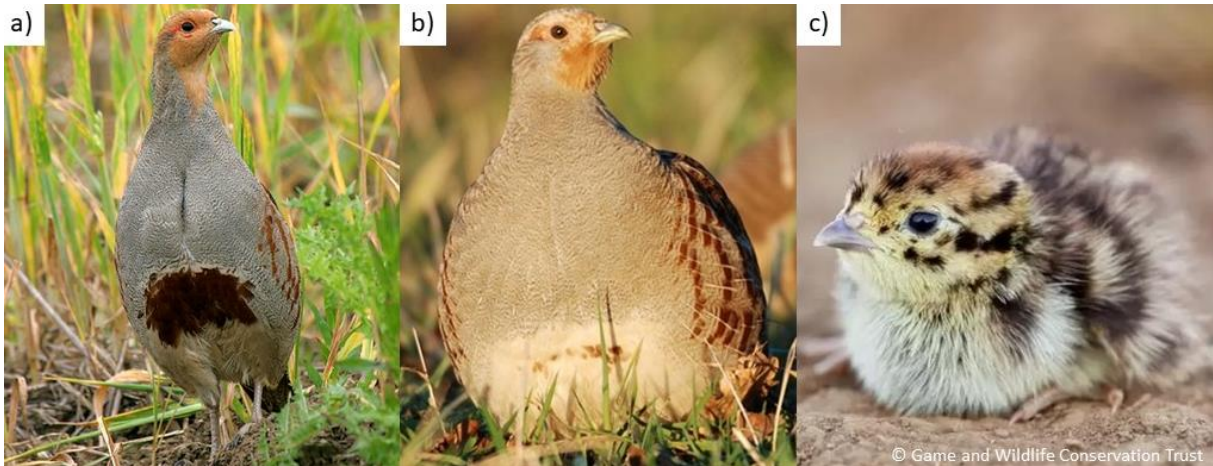


Fig. 4 Photographies de a) mâle b) femelle et c) poussin de perdrix grise (*Perdix perdix*)

La perdrix grise *Perdix perdix* L. 1758 (Galliformes, Phasianidae) est une espèce d'oiseau patrimoniale des milieux agricoles. Sa silhouette est de taille moyenne, i.e., 29-31 cm pour une envergure allant de 45 à 48 cm. Le mâle est légèrement plus grand que la femelle, mais celle-ci est plus lourde, la masse corporelle des adultes variant de 300 à 500g selon le genre de l'oiseau, son âge et la saison (Bro 2016). Les mâles se différencient par leur plumage coloré, avec les plumes de la tête prenant une teinte orangée et le « fer à cheval » brun dessiné sur le poitrail (Fig. 4). Le plumage des poussins de perdrix grise, lui, est brun-jaune tacheté et rayé de noir sur la tête (Fig. 4). La perdrix grise étant une espèce nidifuge, les jeunes à l'éclosion deviennent rapidement autonomes mais ne sont pas capables de thermoréguler avant 15 jours et sont strictement insectivores pendant les premières semaines de vie (Bro 2016, Fig. 5). L'élevage des jeunes se fait par les deux parents et dure quelques semaines. Un couple pond en moyenne une quinzaine d'œufs mais seulement trois à six poussins arrivent en moyenne à l'envol (Bro 2016). A la fin de l'été, les familles vivant à proximité les unes des autres se regroupent en compagnie composée en moyenne de 8 à 15 individus (Bro 2016, Fig. 5). Durant cette période, les perdrix se nourrissent majoritairement de graines. A la fin du mois de janvier, les compagnies éclatent et l'appariement des couples commencent. Les oiseaux se mettent alors à consommer des plantes puis des insectes lorsque le printemps arrive, et ce afin d'avoir un apport protéique suffisant pour la reproduction (Bro 2016, Fig. 5). La ponte a lieu courant avril, les éclosions peuvent commencer à partir de début mai et durer jusqu'à fin juin en cas de seconde ponte (Fig. 5).

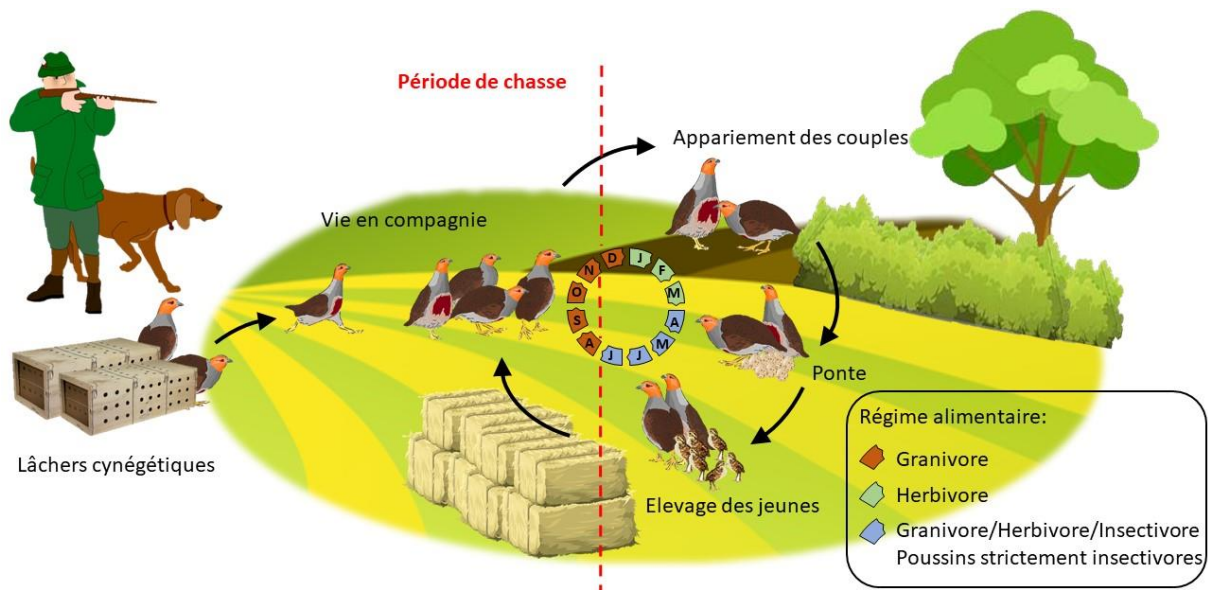


Fig. 5 Cycle de vie et régime alimentaire de la perdrix grise

## 1.2. Une espèce en fort déclin depuis 1950

### 1.2.1. Historique et situation actuelle en Europe

En Europe, les populations de Perdrix grise sont en déclin depuis la fin des années 1950 (Aebischer & Potts 1994 ; Aebischer & Kavanagh 1997 ; Kuijper et al. 2009 ; Bro 2016). La Perdrix grise tend vers l'extinction en Irlande et en Suisse, et a disparu en Norvège, au Portugal, au nord-ouest de l'Espagne, au sud de l'Italie et au sud de la Grèce (Aebischer & Potts 1994 ; Aebischer & Kavanagh 1997 ; Sotherton et al. 2010). Au Royaume-Uni, où les évolutions temporelles des effectifs des populations sont particulièrement bien suivies (prélèvements de chasse recensés depuis 1793 ; Potts & Aebischer 1995), un déclin marqué de 92% en abondance a été observé entre 1970 et 2015 (Hayhow et al. 2017). En France, le déclin est moins flagrant avec une diminution de 23% en abondance entre 1989 et 2015 (Vigie-Nature 2018). Aujourd'hui, la perdrix grise bénéficie d'un « statut de conservation défavorable », considérée comme vulnérable à l'échelle de l'Europe (Tucker & Heath 1994 ; Hagemeyer & Blair 1997) et est intégrée dans les 19 espèces constituant le « Farmland Bird Indicator », parmi lesquelles elle représente l'espèce la plus étudiée (Aebischer et al. 2004). Cet indice mesure l'abondance des espèces d'oiseaux communes sur des sites sélectionnés et est conçu comme un substitut pour évaluer l'état de la biodiversité des paysages agricoles en Europe (base de données BirdLife). La population française de Perdrix grise a été classée en « Préoccupation Mineure » (« Least Concern » ; UICN France, MNHN, LPO, SEOF & ONCFS 2016) car son abondance

reste la plus importante d'Europe de l'Ouest (elle représente à elle seule 47% des effectifs européens; Bro 2016). Cette population a été identifiée comme essentielle et centrale dans la conservation et le futur de l'espèce en Europe (Bro & Crosnier 2012 ; Bro et al. 2005).

1.2.2. La responsabilité des pesticides dans ce déclin : une question en suspens

Le déclin des perdrix grises en Europe est multifactoriel (Fig. 6). Bien que la contribution de la chasse soit relativement peu documentée et considérée comme mineure dans la première phase du déclin de cette espèce gibier, les prélèvements cynégétiques auraient contribué au déclin des populations (Kuijper et al. 2009 ; Fig. 6). Cependant, outre l'influence du climat sur la dynamique des populations, les fluctuations démographiques observées depuis 1950 seraient majoritairement dues à l'intensification de l'agriculture via la modification des paysages et l'utilisation massive des pesticides (Kuijper et al. 2009 ; Potts 1980 ; Potts & Aebischer 1991 ; Fig. 6).

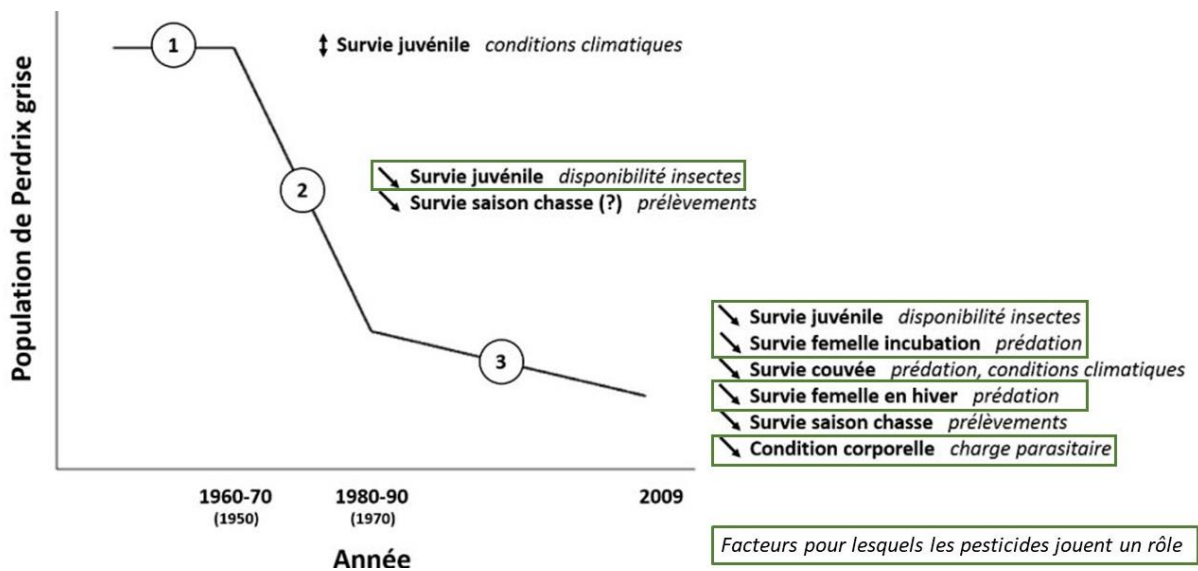


Fig. 6 Schéma représentant les trois phases du déclin de la Perdrix grise en Europe, les paramètres démographiques limitants (en gras), leur tendance ( $\updownarrow$  : fluctuation,  $\searrow$  : diminution), et les facteurs principaux qui les affectent (en italique). Les dates correspondent aux périodes de déclin observées en Europe continentale, les dates entre parenthèses correspondent aux périodes de déclin observées au Royaume-Uni. Modifié à partir de la thèse de Clément Harmange (2019).

La perdrix grise est une espèce particulièrement exposée aux pesticides de par son cycle de vie (i.e., sa propension à nidifier dans les cultures et son régime alimentaire). Ainsi, depuis 1986, un réseau de surveillance et de vigilance de la contamination des cadavres issus de la chasse,

appelé SAGIR, a été mis en place (Bro 2016). Diverses molécules ont été détectées dans ces cadavres : herbicides, fongicides insecticides, anti-limaces, corvicides et rodenticides. Dans certains cas, une intoxication aigüe a été diagnostiquée avec certitude et des contaminations par des substances interdites d'usage depuis 10 à 20 ans sont encore mises en évidence (réseau SAGIR ; Bro 2016). Cependant, l'incidence des effets létaux sur la dynamique des populations des perdrix grises est supposée relativement limitée, car seules 2% des 150 substances actives épandues pendant la période de reproduction de ces oiseaux présenteraient une toxicité aigüe. En revanche, l'impact des effets sublétaux des pesticides dans la dynamique des populations de perdrix grises en France n'est encore que trop peu pris en compte (Fig. 6). Les enjeux de conservation autour de cette espèce sont donc multiples, à la fois socio-économique par rapport à son importance patrimoniale et aux activités cynégétiques, mais aussi sanitaire, car elle est indicatrice de la contamination des agroécosystèmes (Aebischer et al. 2003 ; Bro 2016).

### 1.3. Lâchers cynégétiques

Les populations de Perdrix grise sont aujourd'hui maintenues par des lâchers cynégétiques d'oiseaux d'élevage sur une grande partie du territoire français (Bro & Crosnier 2012 ; Fig. 5). La pratique des lâchers s'est développée pour suppléer la quasi-disparition de l'espèce et ainsi maintenir la chasse de cet oiseau tout en préservant les populations sauvages relictuelles. Le nombre de Perdrix grises d'élevage lâchées annuellement est estimé à 2 millions en moyenne chaque année en France (Bro 2016). Cependant, cette pratique semble inefficace pour recouvrer ou maintenir des niveaux de populations viables car les prélèvements s'exercent aussi bien sur des individus issus d'élevage que des individus sauvages (Bro et al. 2006 ; Ponce-Boutin et al. 2006). Ainsi, les lâchers cynégétiques pourraient, à terme, mener à une disparition des populations sauvages et à un remplacement par des populations constituées essentiellement d'oiseaux d'élevage (Bro et al. 2006 ; ONCFS 2014 ; Ponce-Boutin et al. 2006). En effet, bien que majoritairement bénéfiques à court terme (augmentation des effectifs dans 90% des cas ; Bro 2016), ces opérations se sont révélées moins efficaces sur le long terme notamment à cause du fort taux de mortalité des oiseaux d'élevage quelques semaines après le lâcher (60 à 80% ; dans Bro 2016 ; 82% dans Parish & Sotherton 2007 ; 77% dans Rymesova et al. 2013). L'élevage en captivité engendre une perte de variabilité génétique (Ewen et al. 2012 ; Keller et al. 2012), entraînant une diminution de la diversité des types comportementaux exprimés dans les populations renforcées et une augmentation de leur vulnérabilité face aux pathogènes (Dingemanse et al. 2002 ; van Oers et al. 2004). Cette perte de plasticité pourrait altérer les capacités d'ajustement et d'adaptation rapide de ces oiseaux aux changements

environnementaux (introduction de prédateur, maladies, changements abiotiques ; Ewen et al. 2012 ; Keller et al. 2012 ; Watters & Meehan 2007). En raison de ce manque d'acclimatation, les individus utiliseraient des habitats associés à un fort risque de prédation et souffriraient d'une mortalité accrue (Rantanen et al. 2010a, b). Des différences morphologiques par rapport aux perdrix sauvages (longueur de l'aile plus courte, condition corporelle plus élevée ; Rymesova et al. 2013), pourraient également altérer leurs compétences de vol et les rendre plus vulnérables face à la prédation (Putala & Hissa 1998 ; Rymesova et al. 2012).

## 2. Approche expérimentale en conditions contrôlées

L'étude des effets sublétaux des pesticides sur les traits d'histoire de vie de la perdrix grise s'est tout d'abord fait à travers une approche expérimentale en conditions contrôlées. Un design expérimental innovant et commun sur les trois années de thèse a été mis en place pour répondre aux questions des chapitres I, II et III. Le but premier était de se rapprocher le plus possible des conditions de vie naturelle de la perdrix. Ainsi, les oiseaux ont été exposés oralement à des doses de pesticides qu'ils pourraient rencontrer *in natura* pour en étudier les conséquences sur leurs traits d'histoire de vie. Pour cela, les perdrix ont été nourries pendant plusieurs mois avec un mélange de grains issus soit de l'agriculture conventionnelle (i.e., supposés avec des résidus de pesticides) soit issus de l'agriculture biologique (i.e., supposés sans résidus de pesticides) avant de mesurer différents traits d'histoire de vie (voir section « 4. Traits d'histoire de vie mesurés » pour plus de détails sur les paramètres de santé étudiés). Pour le Chapitre III, un dosage des pesticides dans le sang des perdrix a aussi été réalisé après les cinq mois d'exposition.

### 2.1. Maintien des oiseaux en captivité

Toutes les expérimentations réalisées en conditions contrôlées durant ma thèse se sont déroulées chez Mr Julien BLANDIN, éleveur de gibier à Cours (79220, Deux-Sèvres, France). Nous avons à disposition :

- (i) Plusieurs grandes volières de 100 mètres de long, 10 mètres de large et 4 mètres de haut. Ces volières étaient toutes identiques, avec une végétation hétérogène composée d'herbes, de cultures à gibier (maïs et céréales d'hiver), d'abris en taule, d'abreuvoirs et d'agrains. Elles ont été utilisées pour les expérimentations sur les perdrix adultes hors période de reproduction (i.e., Chapitre I et III). La densité d'oiseau par volière était

d'un oiseau pour 50 m<sup>2</sup> pour le Chapitre I et un oiseau pour 25 m<sup>2</sup> pour le Chapitre III (Fig. 7)

- (ii) Un petit bâtiment jouxtant les volières (5 m x 5 m x 2 m) pour réaliser des tests de comportement en open-field. De même, ce bâtiment a été utilisé pour les expérimentations sur les perdrix adultes hors période de reproduction (i.e., Chapitre I et III ; Fig. 7)
- (iii) Des cages de reproduction (1 m x 0.5 m x 0.5 m) pour les couples, un bâtiment avec une couveuse et un éclosoir pour les œufs et un bâtiment chauffé et divisé en petits compartiments pour abriter les poussins les semaines après l'éclosion jusqu'à ce qu'ils soient en âge de sortir dans les volières. Ces infrastructures ont été utilisées pour le Chapitre II où les expérimentations ont été réalisées avant et pendant la période de reproduction de la perdrix grise (i.e., hiver, printemps et été, Chapitre II ; Fig. 7).

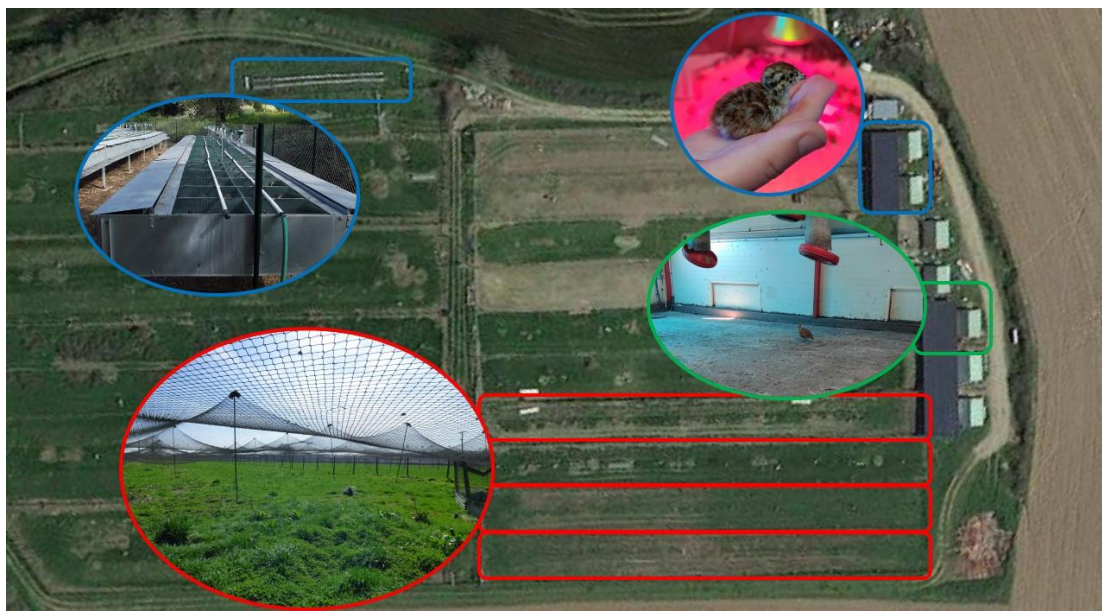


Fig. 7 Photographie aérienne de l'élevage où se sont déroulés les expérimentations en captivité avec en rouge les volières pour adultes hors période de reproduction et en vert le bâtiment utilisé pour les mesures de comportements (Chapitres I et III). En bleu (i) les cages de reproduction pour les couples et (ii) le bâtiment chauffé où ont été effectuées les mesures sur les poussins (Chapitre II).

## 2.2. Design expérimental

Pour chaque chapitre, les oiseaux ont été sélectionnés aléatoirement, identifiés et sexés. Le même design a été utilisé sur un échantillon allant de 60 (Chapitre II) à 80 (Chapitre I et III) oiseaux, afin d'avoir des effectifs suffisants pour les analyses.

### 2.2.1. Lignées de perdrix grises

La première question de ma thèse portait sur l'importance de la lignée génétique des oiseaux dans la prise en compte des effets sublétaux des pesticides (Chapitre I). Pour cela, j'ai réalisé ma première expérience sur deux lignées génétiques différentes de perdrix grises. La première lignée est celle classiquement reproduite dans les élevages cynégétiques (i.e., 60 générations de captivité). La seconde lignée est considérée comme une lignée sauvage (i.e., 2 générations de captivité). A la suite des résultats de cette première expérimentation, toutes les autres expériences ont été réalisées sur des perdrix grises de lignée sauvage (Chapitre II et III).

### 2.2.2. Exposition aux pesticides par voie orale

L'exposition des perdrix aux pesticides s'est faite par voie orale, à travers l'ingestion d'un mélange de céréales et légumineuses issus soit de l'agriculture conventionnelle soit de l'agriculture biologique pendant cinq mois. Un des objectifs de ma thèse étant de me rapprocher au mieux des conditions environnementales, j'ai choisi d'exposer les perdrix grises à la nourriture qu'elles rencontreraient dans la nature. Pour cela, la nourriture des perdrix a été achetée directement dans une exploitation agricole conventionnelle (i.e., utilisant des pesticides ; Doeuil-sur-le-Mignon, 17330 Charente-Maritime, France) et dans une exploitation agricole biologique (i.e., n'utilisant pas de pesticides, Marigny, 79360 Deux-Sèvres, France). Pour le premier chapitre, les perdrix ont été nourries *ad libitum* avec un mélange de 50% de blé et 50% de maïs, soit issues de l'agriculture biologique soit de l'agriculture conventionnel. Ce sont les graines les plus consommées par les perdrix grises en période automne-hiver (Bro 2016). A la suite de cette première expérimentation, du pois et de la fèverole ont été ajoutés au mélange afin d'enrichir l'apport protéique des perdrix (Chapitre II et III). En effet, il était important que l'apport protéique soit suffisant pour les perdrix grises lors de l'expérimentation réalisée pour le Chapitre II afin que la reproduction puisse se dérouler correctement. Par ailleurs, et uniquement pour le Chapitre II, toutes les perdrix grises ont été nourries avec des granulés biologiques à partir du mois de février afin de supporter l'effort de ponte (voir détail dans le Chapitre II). Pour chaque type de graines conventionnelles achetées durant les trois années de thèse, l'agriculteur a fourni l'historique des traitements phytosanitaires appliqués sur la culture, de la semence jusqu'aux traitements post-récoltes. Enfin, pour les Chapitres I, II et III, un échantillon des graines produites dans l'exploitation agricole conventionnelle (i.e., maïs et blé pour le Chapitre I, maïs, blé, pois et fèveroles pour les Chapitres II et III) a été envoyé dans un laboratoire d'analyses de contaminants (GIRPA, Beaucouzé, 49070 Maine-et-Loire,



France) afin d'obtenir la liste des résidus de pesticides retrouvés dans les graines (listes disponibles en Annexe D).

### 3. Approche expérimentale *in natura*

L'étude des effets sublétaux des pesticides sur les traits d'histoire de vie de la perdrix grise s'est aussi fait à l'aide d'un suivi GPS de perdrix sauvages sur le territoire de la Zone Atelier Plaine et Val de Sèvre. Cette approche avait pour but d'utiliser ces oiseaux comme espèce sentinelle de leur territoire en (i) réalisant des dosages de pesticides dans leur sang dans le but de quantifier leur contamination et (ii) en mettant en lien cette contamination avec leur exposition dans leur domaine vital et leurs traits d'histoire de vie (Chapitre IV). La méthodologie utilisée pour cette approche est détaillée ci-après.

#### 3.1. Site d'étude : La Zone Atelier Plaine et Val de Sèvre (ZAPVS)

La ZAPVS est une plaine céréalière intensive située dans le sud du département des Deux-Sèvres entre la ville de Niort à la limite nord et la forêt domaniale de Chizé au sud (46° 110 N, 0° 280 W ; Fig. 8). Depuis la création du site d'étude en 1994 et sa désignation comme « Zone Atelier » en 2008, la ZAPVS s'est progressivement agrandie pour atteindre aujourd'hui une superficie de 435km<sup>2</sup> (Bretagnolle et al. 2018). Depuis 2003, plus de la moitié de sa superficie bénéficie du statut de Zone de Protection Spéciale (ZPS, site NATURA 2000 désigné pour la biodiversité remarquable des espèces de la Directive Oiseaux ; Bretagnolle et al. 2018). Suite à l'intensification des pratiques agricoles, la topographie de cette plaine historiquement dominée par la polyculture et l'élevage a considérablement changé. Depuis sa création, le mode d'occupation des sols de chaque parcelle de la ZAPVS est renseigné chaque année et géoréférencé, constituant une importante base de données spatialisées (Système d'Informations Géographiques) (Bretagnolle et al. 2018). Les modes d'occupation des sols sont notés selon plus de 30 catégories : les différentes cultures (ex : blé d'hiver, orge, tournesol, colza, maïs, luzerne), les bois, les bâtis (ex : village, bâtiment agricole et industriel), les axes routiers (dont une autoroute qui traverse la ZAPVS) et les chemins. Sur la période 2009-2016, la ZAPVS est dominée par les grandes cultures : le blé (33,8 %), le tournesol (10,4 %), le maïs (9,6 %), le colza (8,3 %) et les prairies (toutes catégories confondues : 13,5 %). Les zones en bâti y représentent 9,8 % de la surface. Les pratiques agricoles concernant l'utilisation des pesticides sont aussi renseignées (agriculture biologique versus agriculture conventionnelle). La zone atelier présente une diversité assez élevée de systèmes agricoles, avec une quinzaine de fermes

gérées selon des pratiques d'agriculture de conservation, une soixantaine de fermes utilisant des méthodes biologiques et 350 utilisant des méthodes conventionnelles, dont environ 50% sont des fermes mixtes laitières/céréalières. En 2021, 16.87% des terres arables de la ZAPVS étaient cultivées en agriculture biologique. En moyenne, les agriculteurs conventionnels utilisent 5 à 10 molécules de pesticides différentes sur leurs champs (dans environ 4 à 8 applications par an ; données non publiées de Bretagnolle et Gaba), tandis que les agriculteurs biologiques n'en utilisent aucune.

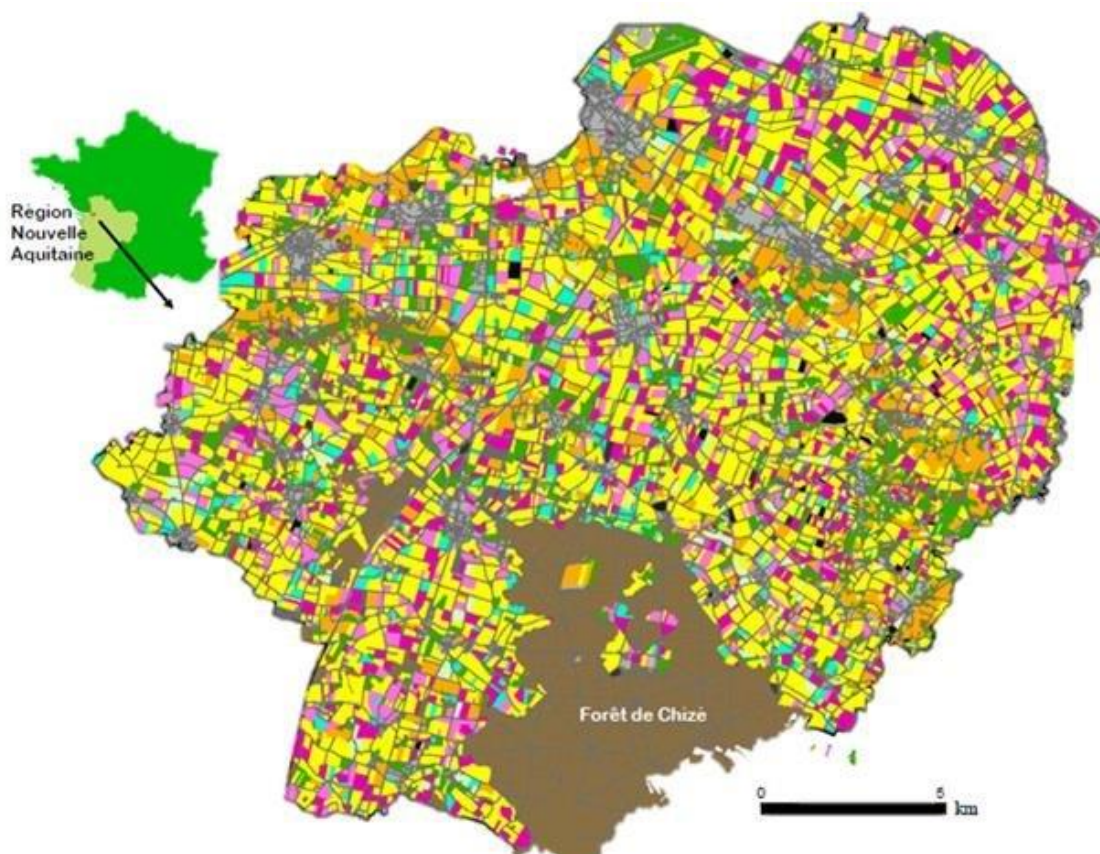


Fig. 8 Structure paysagère de la Zone Atelier Plaine et Val de Sèvre localisée dans la Région Nouvelle Aquitaine. Chaque polygone représente une parcelle agricole avec les modes d'occupation du sol symbolisés par des couleurs différentes dans la base de données géoréférencées.

Plusieurs études de biomonitoring des pesticides sur la ZAPVS ont été mises en places depuis plusieurs années à travers le suivi de la contamination chez différents invertébrés (carabes : Bertrand et al. 2018 ; lombrics : Pelosi et al. 2021) et vertébrés grâce aux prélèvement de poils de micromammifères (genres *Apodemus* et *Crocidura* ; Fritsch et al. 2022) et de sang chez la perdrix grise pour cette thèse, mais aussi chez plusieurs espèces de passereaux, chez le merle

noir (*Turdus merula*) et les poussins de busards cendrés (*Circus pygargus* ; analyses en cours mais voir déjà **Article VII** pour les néonicotinoïdes). Enfin, plusieurs études ont déjà été menées sur la perdrix grise au sein de la ZAPVS notamment pendant les travaux de thèse de Clément Harmange (2016-2019). Les principaux résultats de ses recherches ont démontré (i) un changement des préférences d'habitat des perdrix sur la période 1997-2017, suggérant un évitement moins prononcé des zones où la pression de prédation est élevée (boisements, zones bâties) et une sélectivité croissante des infrastructures humaines (routes et chemins) (Harmange et al. 2019) et (ii) une compétition intraspécifique asymétrique entre la perdrix rouge (*Alectoris rufa*) et la perdrix grise (Rinaud et al. 2020). Les suivis GPS des perdrix grises durant ses travaux de thèse ont aussi permis de mettre en évidence des changements de rythmes d'activité, de sélection de l'habitat et d'utilisation de l'espace au cours du cycle circadien, suggérant une réponse comportementale des oiseaux aux perturbations environnementales. La survie des individus dépendrait notamment des patrons de sélection de l'habitat et d'utilisation de l'espace (relations positives entre survie et (i) distance aux routes, (ii) distances aux haies la journée et (iii) diffusion à partir du point de lâcher ; Harmange et al. 2021a). Enfin, il a aussi été montré que la capacité d'ajustement comportemental (variation de la distance aux éléments paysagers associés à un risque élevé de prédation au cours du cycle circadien) des oiseaux était affectée par certains de leurs traits d'histoire de vie (relation positive avec la témérité et négative avec la réponse immunitaire ; Harmange et al. 2021b).

### 3.2. Design expérimental

Les captures de perdrix grises se sont déroulées sur la ZAPVS pendant deux hivers consécutifs après la fermeture de la chasse au petit gibier, c'est à dire de novembre 2020 à février 2021 et de janvier 2022 à mars 2022. Un premier recensement des compagnies présentes sur la ZAPVS a été fait durant les deux automnes 2020 et 2021. Puis, pour chaque nuit où la météo était propice à la capture (couverture nuageuse importante, pas de lune, pas de pluie), une compagnie était ciblée pour la capture. Au crépuscule, la compagnie était localisée grâce à de la repasse audio puis maintenues en vue avec des jumelles thermiques jusqu'à ce que les perdrix s'établissent dans une parcelle pour dormir (Fig. 9). Une fois la nuit tombée et les oiseaux inactifs, la capture se mettait en place. L'approche commençait avec un expérimentateur maintenant un phare pour éblouir et ainsi immobiliser les perdrix tandis qu'un second expérimentateur tenant une large époussette (Fig. 9). Lorsque les perdrix étaient à distance de l'époussette, le second expérimentateur baissait celle-ci pour capturer les oiseaux (Fig. 9).

L'expérimentateur tenant le phare courrait ensuite pour récupérer les perdrix et les glisser dans des pochons en coton.

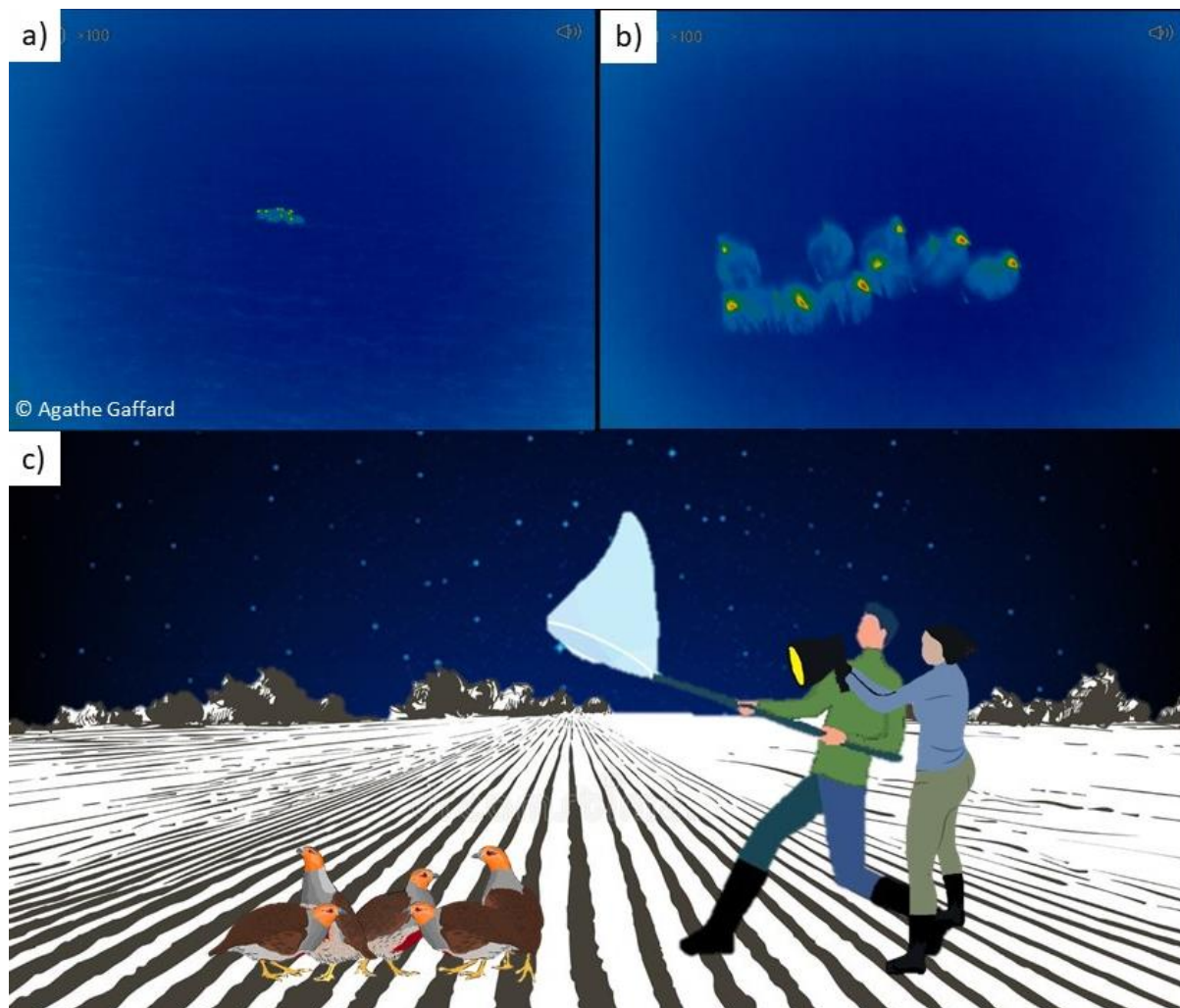


Fig. 9 : Photographies par jumelle thermique d'un groupe de huit perdrix grises à a) 20 mètres et b) 2 mètres de distance des expérimentateurs, juste avant la capture schématisée en c).

Les perdrix capturées étaient ensuite placées ensemble dans une caisse de transport et ramenées au laboratoire pour passer la nuit avec de l'eau et un mélange de blé et de maïs biologiques à volonté. Le lendemain matin, les perdrix étaient baguées et sexées, puis des tests de comportement et une prise de sang ont été réalisés (voir section « 4. Traits d'histoire de vie mesurés » pour le détail des paramètres étudiés). Enfin, les perdrix ont été équipées avec des GPS à transmission de données Ornitela® modèles OrniTrack 10g ou 15g avec panneaux solaires surélevés ou non en fonction du modèle (Fig. 10). Ces GPS ont été programmés pour prendre un point GPS toutes les heures, jour et nuit compris. Ils ont été fixés sur les oiseaux en sac-à-dos à l'aide de ruban de satin. Les données GPS étaient ensuite transmises directement par satellite toutes les 24h et disponibles sur l'interface de contrôle des GPS en ligne. Une fois chaque oiseau

équipé, les perdrix étaient ramenées au point de capture de la veille et relâchées toutes ensembles.



Fig. 10 : Photographies d'une perdrix sauvage équipée d'un GPS a) juste après manipulation et b) observée en nature sur la ZAPVS.

#### 4. Traits d'histoire de vie mesurés

Différentes mesures morphologiques, physiologiques et comportementales ont été réalisées sur les perdrix adultes captives (Chapitre I, II et III), sauvages (Chapitre IV) mais aussi sur les juvéniles (Chapitre II ; voir Tableau 1 en fin de section page 57 pour un résumé). Les méthodes employées pour mesurer chaque paramètre sont détaillées ci-après.

##### 4.1. Paramètres morphologiques

Pour tous les individus, les tarses droits et gauches ont été mesurés avec un pied à coulisse (précision :  $\pm 0,1\text{mm}$ ) et la masse corporelle a été évaluée à l'aide d'une balance à ressort (Pesola® 500g, précision :  $\pm 5\text{g}$ ). Ces mesures ont permis d'établir la condition corporelle (Peig & Green 2009) des perdrix adultes et juvéniles comme proxy du capital énergétique accumulé par l'alimentation, qui détermine la corpulence des individus en fonction de leur poids et la taille du tarse (Peig et Green 2009). Les longueurs des ailes droites et gauches et les longueurs tête-bec ont aussi été mesurées chez les poussins (Chapitre II, Fig. 11) et les perdrix sauvages (Chapitre IV) avec, respectivement, un réglet (précision :  $\pm 1\text{mm}$ ) et un pied à coulisse (précision :  $\pm 0,1\text{mm}$ ). Pour les poussins (Chapitre II), ces mesures morphologiques ont été répétées toutes les semaines pendant quatre semaines pour suivre leur croissance squelettique (Fig. 11).



Fig. 11 Photographies des mesures a) tête-bec, b) masse et c) longueur de l'aile chez des poussins de perdrix grises âgées de 7 jours (Chapitre II)

#### 4.2. Paramètres physiologiques

Différentes mesures physiologiques ont été effectuées à partir des échantillons sanguins obtenus après prises de sang sur les adultes et les juvéniles. Ces mesures permettaient d'estimer leur stress physiologique (hématocrite), la qualité de leur système immunitaire (concentration en caroténoïdes et en haptoglobine) et de leur influx nerveux (concentration en AChE). Les dosages de concentrations de caroténoïdes, d'haptoglobine et d'AChE ont été réalisés au laboratoire d'analyses biologiques de Biogéosciences à l'Université de Bourgogne Franche-Comté.

- (i) L'hématocrite reflète l'état nutritionnel de l'individu et est connu pour diminuer sous stress physiologique (Ots et al. 1998). Les échantillons sanguins contenus dans les micro-capillaires (10 $\mu$ L) ont été centrifugés après leur prélèvement (8 min à 9000 tours par min) afin de séparer précisément les couches de plasma et de globules rouges. Les épaisseurs des couches de globules rouges et de sang total (couches de plasma et de globules rouges) présentes dans le micro-capillaire ont été mesurées au pied à coulisse (précision :  $\pm 0,1$ mm). L'hématocrite a été calculée par le ratio des épaisseurs des couches de globules rouges et de sang total.
- (ii) Les caroténoïdes sont des pigments obtenus lors de la consommation de plantes ou d'insectes et qui sont connus non seulement pour éliminer les radicaux libres et renforcer les réponses du système immunitaire mais aussi pour déterminer la coloration des caractères sexuels secondaires (Blount et al. 2003 ; McGraw & Ardia 2003 ; Baeta et al. 2008). Chez la perdrix grise, la coloration rouge de la caroncule de l'œil est déterminée par la quantité de caroténoïdes stockée par l'individu (Fig. 12). Ainsi, de faibles concentrations plasmatiques de caroténoïdes circulant et une

faible intensité de rouge de la caroncule peuvent être le signal d'un processus de détoxification de l'organisme (Moreau et al. 2021). Le dosage des concentrations plasmatiques en caroténoïdes a été réalisé en suivant le protocole décrit par Biard et al. (2010). Les échantillons de plasma (20  $\mu$ L) ont été dilués dans 180  $\mu$ L d'éthanol absolu, puis agités au vortex et centrifugés (10 min à 1500 tours par min). Les concentrations en caroténoïdes (ng/ $\mu$ L) ont été mesurées à partir d'une gamme étalon de lutéine par spectrophotométrie à 450 nm. En parallèle, l'intensité de la couleur rouge de la caroncule a été analysée à l'aide des photographies prises sans flash ni zoom deux fois de chaque côté de la tête des individus dans des conditions standardisées (même lumière, même appareil photo, même position spatiale entre l'appareil photo et les oiseaux ; Fig. 12). Une charte de gris a été placée près de la tête pour contrôler toute variation subtile d'illumination entre les images (Fig. 12). Pour chaque image, l'intensité de la couleur rouge (rougeur) a été calculée comme étant R (rouge) divisé par la moyenne de R (rouge), G (vert), et B (bleu) (voir la procédure dans Lopez-Antia et al. 2013). Les concentrations plasmatiques de caroténoïdes étaient particulièrement faibles – voire inexistantes – pour les perdrix maintenues en captivité (probablement dû à l'absence des pigments dans leur régime alimentaire). Seules les mesures d'intensité de rouge ont donc été utilisées pour les perdrix captives (Chapitre III). Les concentrations de caroténoïdes ont été analysées pour les perdrix sauvages (Chapitre IV).



Fig. 12 Photographie de la caroncule de l'œil d'un mâle de perdrix grise avec son numéro de bague, la date et la charte de gris

- (iii) L'haptoglobine est une protéine de phase aiguë qui peut augmenter rapidement en réponse à une infection ou une inflammation (c'est-à-dire un stress oxydatif ; Bichet et al. 2021). L'haptoglobine a été quantifiée dans des échantillons de plasma de 7,5 µl à l'aide d'un test disponible dans le commerce (Tridelta PHASE Haptoglobin Assay Cat. No. TP-801, Co. Kildare, Ireland), qui mesure par colorimétrie la capacité de liaison à l'hème du plasma. La densité optique des échantillons a été calculée par un spectrophotomètre à 620 nm (SpectraMax iD3, Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, USA) à température. La concentration en haptoglobine a ensuite été déterminée à l'aide d'une gamme standard réalisée à partir des produits fournis dans le kit (voir Bichet et al. 2021 pour l'ensemble de la procédure). Les résultats sont donnés en mg/mL.
- (iv) L'AChE est l'enzyme qui hydrolyse l'acétylcholine (ACh), un neurotransmetteur important dans le système nerveux central et périphérique. L'activité AChE a été déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre en utilisant une technique colorimétrique dérivée de la méthode d'Ellman (1961). Cinq microlitres de sang ont été dilués dans 100 µL d'une solution de Triton X-100 à 1%, qui a hémolysé les cellules, agités pendant 30 min et centrifugés à 14000 rpm pendant 5 min à 4°C. Dix microlitres de sang hémolysé ont ensuite été ajoutés à une solution diluée de 4-PDS et à une solution de substrat qui a déclenché l'activité enzymatique de l'AChE. Cette activité a été mesurée en milliunités par minute (mU/min) et calculée à partir de l'absorbance à 324 nm et 37°C par un spectrophotomètre (SpectraMax iD3, Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, USA).

#### 4.3. Paramètres comportementaux

Différents comportements ont été mesurés pendant la thèse en fonction des Chapitres (voir tableau 1) et des infrastructures à disposition. Les paramètres de comportements choisis sont des traits comportementaux facilement mesurables tels que la distance de fuite (Chapitres I, III et IV), le comportement de fuite (Chapitres I, III et IV), l'activité (Chapitres I, II et III) et l'exploration (Chapitres I, II et III). Le déroulement et l'enchaînement des mesures de comportements sont propres à chaque chapitre mais le design expérimental reste le même et est détaillé ci-après.

- (i) La distance et la stratégie de fuite (i.e., course ou vol chez les perdrix) sont considérés comme des réponses anti-prédateurs à travers la prise de risque. Ces comportements ont été évalués par la distance d'initiation de vol (« Flight Initiation



Distance », FID ci-après), qui correspond à la distance à laquelle l'individu commence à fuir lorsqu'un danger s'approche (Frid & Dill 2002 ; voir aussi Rabreau et al. 2021). La stratégie de fuite correspond, elle, à la stratégie que l'individu va initier pour fuir, c'est-à-dire fuir en courant ou fuir en volant. La distance et la stratégie de fuite sont des réponses comportementales décisives pour un oiseau-proie telle que la perdrix. Fuir rapidement (i.e., grande distance de fuite) et en volant face à une situation dangereuse augmenterait les chances de survie de l'oiseau (Sih et al. 2004 ; Smith & Blumstein 2008 ; Homberger et al. 2013). Pour mesurer ces deux comportements, les perdrix ont été placées par un opérateur dans une cage carrée et grillagée (46 cm x 32 cm x 36 cm) dans un champ labouré à proximité des volières (Chapitres I et III) ou à proximité du laboratoire (Chapitre IV). L'opérateur allait ensuite se cacher derrière une haie, à 100 m de la cage, puis observait le comportement des perdrix avec des jumelles. Après 5 minutes d'acclimatation, l'opérateur caché s'approchait des oiseaux, à vitesse constante et toujours habillé de la même façon. La FID a été estimée comme la distance à laquelle l'oiseau réagissait (essayait de courir ou de voler à l'intérieur de la cage) à l'approche en ligne droite de l'opérateur (Fig. 13).



Fig. 13 Schématisation de la mesure de la distance de fuite et du comportement de fuite (Chapitres I, III et IV)

- (ii) Pour mesurer l'activité et l'exploration des individus, des tests en openfield ont été réalisés, soit dans un bâtiment pour les adultes, soit dans une boîte en bois d'un mètre carré pour les poussins. Une grille a été dessinée sur le sol du bâtiment (Fig.

14a) ou de la boîte (Fig. 14b), comprenant 100 carrés numérotés. Chaque oiseau a bénéficié de 3 minutes pour s'acclimater à l'environnement du test. Le comportement d'exploration de la perdrix a été évalué en comptant le nombre de carrés différents visités pendant 5 minutes (Fig. 14). L'activité de la perdrix a été évaluée en chronométrant tout type d'activité permettant de considérer l'oiseau comme actif (c'est-à-dire toutes les activités sauf le repos; Fig. 14). Pour les adultes (Chapitre I et III), l'évaluation des comportements s'est faite en direct par le biais d'un expérimentateur caché dans un coin de la pièce derrière un drap et observant le test (Fig. 14a). Pour les poussins (Chapitre II), l'évaluation des comportements s'est faite *a posteriori* en analysant les tests filmés (caméras Muvi Serie VCC-007-K2PRO 4 K placées perpendiculairement 180 cm au-dessus de la boîte en bois, Fig. 14b).

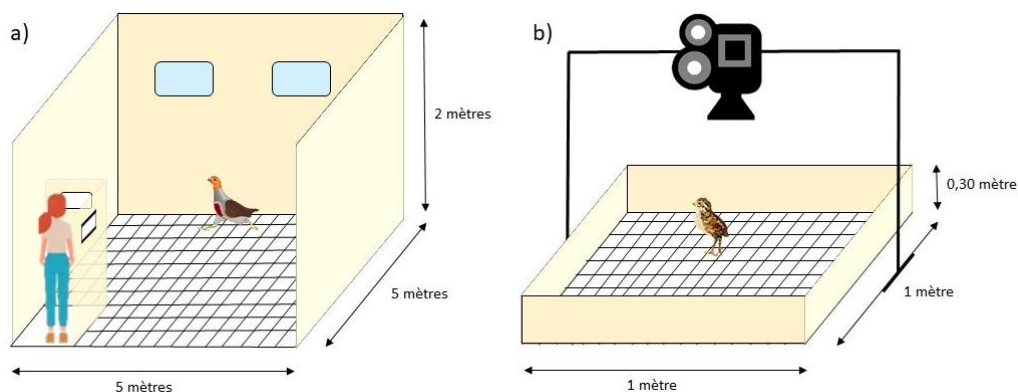


Fig. 14 Schématisation du design expérimental des tests en openfield pour mesurer l'activité et l'exploration des perdrix a) adultes (Chapitre I et III) et b) juvéniles (Chapitre II).

#### 4.4. Dosages des pesticides dans le sang et proxy de la contamination

##### 4.4.1. Extraction et analyses des échantillons par l'ICPEES

Pour les chapitres III et IV, un dosage de pesticides dans le sang des perdrix a été réalisé en partenariat avec le laboratoire ICPEES (Institut de Chimie et Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé) de l'Université de Strasbourg. La méthode développée pour ce dosage est présentée en détail dans l'**Article VI** disponible en Annexe B). Brièvement, 120 molécules de pesticides les plus utilisées en Europe ont été recherchées dans le sang des individus. Après extraction des molécules (Fig. 15) les échantillons ont été concentrés puis injectés simultanément en chromatographie liquide (LC-MS/MS) ou en chromatographie gazeuse (GC-MS/MS) pour la quantification. La chromatographie liquide a été choisie pour séparer les

composés non volatils ou thermolabiles comme les néonicotinoïdes. La chromatographie en phase gazeuse a été choisie pour analyser les composés non thermolabiles et volatils - ou les composés semi-volatils avec une étape de dérivation préalable (modification de la structure chimique de la molécule pour améliorer les capacités de détection). Les analyses LC-MS/MS ont été réalisées en mode MRM (Multiple Reaction Monitoring) avec 2 transitions de masse pour chaque composé, une pour la quantification et une pour la qualification. Les analyses GC-MS/MS ont été précédé d'une étape de désorption thermique. Le mode MRM a également été utilisé pour la détection et la quantification. La concentration de chaque pesticide trouvé dans le sang des individus a été obtenu en  $\text{pg.mg}^{-1}$ .

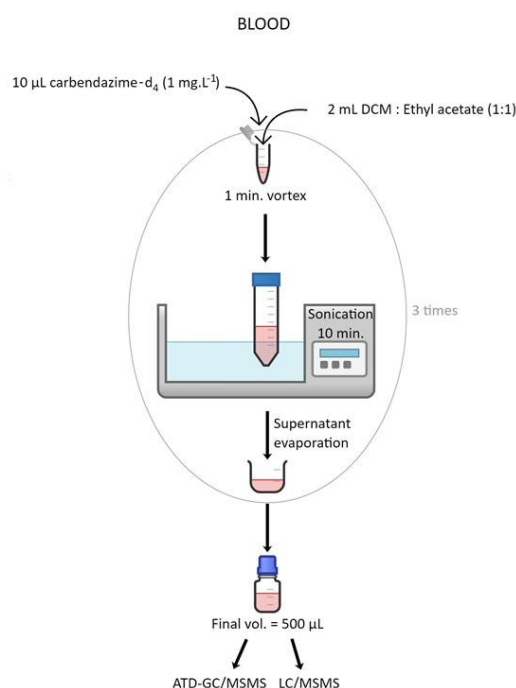


Fig. 15 Description de la méthode employée pour l'extraction liquide-liquide du sang et la concentration avant injection en ATD-GC/MSMS et LC/MSMS (Figure modifiée à partir de l'Article VI disponible en Annexe B)

#### 4.4.2. Evaluation de la charge en pesticides des perdrix

Pour évaluer la charge en PPP des perdrix, une approche à travers des modèles de concentration-addition ("CA" ci-après) a été réalisée. Le principe sous-jacent des modèles CA implique que les composants individuels du mélange contribuent à la toxicité du mélange en proportion de leur concentration et de leur toxicité individuelles (Kortenkamp et al. 2009). Comme il n'existe pour l'instant aucun modèle permettant d'évaluer le potentiel de synergie ou d'antagonisme dans les mélanges de pesticides (Cedergreen et al. 2014 ; Hladik et al. 2016 ; Larras et al. 2022), les

modèles CA sont souvent suggérés comme modèle par défaut pour l'évaluation des risques des mélanges chimiques (Panizzi et al. 2017 ; Schell et al. 2018 ; Brodeur et al. 2022 ; Larras et al. 2022). Tout d'abord, le nombre de pesticides détectés dans le sang de chaque oiseau a été comptabilisé. Bien que cette approche ne tienne pas compte de la toxicité des composés, elle reste une métrique simple pour représenter le risque lié aux effets potentiels d'additivité et/ou de synergie dans le mélange de pesticides (i.e., un nombre croissant de pesticides entraîne un risque accru d'interactions entre les molécules et donc de toxicité ; Zaller et al. 2022). Ensuite, l'unité toxique par oiseau a été calculée ("TU<sub>tot</sub>" ci-après). Elle est définie par plusieurs comités comme le rapport entre la concentration d'un composant du mélange et son critère toxicologique aigu (par exemple, la DL50) ou chronique (par exemple, la concentration sans effet observé à long terme NOEC) (SCHER/SCENIHR/SCCS 2012). Fondamentalement, ce concept peut être utilisé pour quantifier la toxicité d'un mélange sur la base de sa composition, en partant du principe des modèles CA (EFSA 2018 ; Hladik et al. 2016 ; Panizzi et al. 2017). Ici, TU<sub>tot</sub> correspond à la somme de chaque unité toxique de pesticide ("TU" ci-après), c'est-à-dire le rapport entre la concentration de PPP et sa DL50 correspondante.

$$TU_{tot} = \sum_{i=1}^n TU, \text{ avec } TU = \frac{\text{Concentration du pesticide (pg.mg}^{-1}\text{)}}{\text{DL50 du pesticide (mg.kg}^{-1}\text{)}}$$

Les calculs de TU ont été réalisés à l'aide de la base de données PPDB (Pesticides Properties Data Base ; Lewis et al. 2016) où les DL50 de chaque pesticide sont renseignées. Bien que tous les pesticides n'agissent pas selon le même mode d'action et que la toxicité ne soit pas nécessairement additive, cette approche permet de quantifier la contamination de chaque perdrix et ainsi de la mettre en lien avec ses traits d'histoire de vie et son exposition en conditions contrôlées (Chapitre III) ou *in natura* (Chapitre IV) (voir Brodeur et al. 2022 pour une approche similaire).

|   |  | Chapitre I                                      | Chapitre II                      |                                   | Chapitre III                     | Chapitre IV      |
|---|--|---|----------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|------------------|
|   |  | Adultes captifs (lignées domestique et sauvage) | Adultes captifs (lignée sauvage) | Poussins captifs (lignée sauvage) | Adultes captifs (lignée sauvage) | Adultes sauvages |
| <b>Paramètres morphologiques</b>          |  |   |                                  |                                   |                                  |                  |
| <i>Condition corporelle</i>               | <i>Longueur des targes</i>             | ✓   | ✓                                | ✓                                 | ✓                                | ✓                |
|   | <i>Masse corporelle</i>                | ✓   | ✓                                | ✓                                 | ✓                                | ✓                |
| <i>Longueur tête-bec</i>                  |  |   |                                  | ✓                                 |                                  |                  |
| <i>Longueur des ailes</i>                 |  |   |                                  | ✓                                 |                                  |                  |
| <b>Paramètres physiologiques</b>          |  |   |                                  |                                   |                                  |                  |
| <i>Hématocrite</i>                        |  | ✓   | ✓                                | ✓                                 | ✓                                |                  |
| <i>Caroténoïde</i>                        | <i>Concentration plasmatique</i>       |   |                                  |                                   |                                  | ✓                |
|   | <i>Intensité rouge de la caroncule</i> |   |                                  |                                   | ✓                                |                  |
| <i>Haptoglobine</i>                       |  |   |                                  |                                   | ✓                                | ✓                |
| <i>AChE</i>                               |  |   | ✓                                | ✓                                 | ✓                                |                  |
| <i>Dosage des pesticides dans le sang</i> |  |   |                                  |                                   | ✓                                | ✓                |
| <b>Paramètres comportementaux</b>         |  |   |                                  |                                   |                                  |                  |
| <i>Distance de fuite</i>                  |  | ✓   |                                  |                                   | ✓                                | ✓                |
| <i>Comportement de fuite</i>              |  | ✓   |                                  | ✓                                 | ✓                                |                  |
| <i>Activité</i>                           |  | ✓   |                                  | ✓                                 | ✓                                |                  |
| <i>Exploration</i>                        |  | ✓   |                                  | ✓                                 |                                  |                  |

Tableau 1 représentant les différents paramètres morphologiques, physiologiques et comportementaux des individus mesurés en fonction du chapitre. Les cases vertes signifient que le paramètre a été mesuré, le symbole de coche signifie que le paramètre a été analysé et utilisé dans la publication.

# CHAPITRE I

## **Sublethal effects of pesticides residuals differ according to two strains of captive Grey partridge: consequences in terms of rearing condition**

Publié dans *Applied Animal Behaviour Science*

(DOI : <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2022.105791>)



©Agathe Gaffard

## Avant-propos et résumé du Chapitre I

Au cours des 50 dernières années, les populations d'oiseaux spécialistes des milieux agricoles ont fortement diminué en Europe et en Amérique du Nord. La réintroduction ou le renforcement de populations incapables de s'auto-entretenir à l'aide d'oiseaux élevés en captivité puis relâchés sont donc devenus des outils de gestion populaires pour surmonter le risque d'extinction. Cependant, ces oiseaux relâchés ont tendance à avoir des taux de survie plus faibles que leurs congénères sauvages. En effet, la captivité nuit à la diversité génétique et favorise certaines adaptations qui peuvent s'avérer délétères lorsque ces individus sont relâchés dans la nature. De nombreuses études ont par exemple signalé des déficiences comportementales chez les oiseaux de lignée d'élevage qui nuisent à leur survie *in natura* telles que l'audace excessive face à un prédateur et la diminution de la vigilance. De plus, l'alimentation utilisée en captivité est en général différente de celle disponible en nature en terme de qualité (i.e., aliments transformés et présence de pesticides) et de quantité (i.e., à volonté en élevage). Par conséquent, le métabolisme des oiseaux, mais aussi leurs comportements s'acclimatent à des conditions très différentes de celles qui les attendent dans la nature. Dans cette étude, nous nous sommes intéressés aux différences de traits morphologiques, physiologiques et comportementaux déterminants pour la survie entre deux lignées génétiques de perdrix grises soumises à un changement de régime alimentaire. Pour cela, nous avons cherché à mimer la transition alimentaire à laquelle la perdrix grise est confrontée une fois relâchée (transition d'une nourriture pour volailles en volière à des céréales contaminées ou non par les pesticides dans la nature). Nous avons ensuite comparé (i) les différences de réponses à cette transition selon la lignée génétique (sauvage ou d'élevage) et (ii) les conséquences de l'ingestion de céréales issues de l'agriculture biologique ou conventionnelle sur la masse, l'hématocrite, la réponse anti-prédateur, l'activité et l'exploration des oiseaux. Notre hypothèse était que la sélection de lignée d'élevage et l'alimentation conventionnelle pendant l'élevage pourraient être des facteurs impactant la condition et le comportement des oiseaux de façon négative lorsque ceux-ci seraient relâchés *in natura*. Notre procédure expérimentale impliquait 40 perdrix de lignée d'élevage (i.e., en captivité depuis 60 générations) et 40 perdrix de lignée sauvage (i.e., génération F3 d'individus sauvages) nourries d'abord avec des granulés pour volailles au début de leur vie, puis avec du blé et du maïs pendant trois mois, provenant soit de l'agriculture biologique (i.e., supposés sans résidus de pesticides), soit de l'agriculture conventionnelle (i.e., avec résidus de pesticides). Une prise de sang et les mesures morphologiques ont été réalisées sur toutes les perdrix avant et après le changement de régime alimentaire. Les tests

comportementaux ont été effectués uniquement à la fin de l'expérience. Les résultats ont montré que l'hématocrite et la masse corporelle des perdrix de lignée d'élevage avaient diminué à la fin de l'expérience, suggérant une faible capacité d'adaptation face à la transition alimentaire comparé aux perdrix issues de lignée sauvage. De plus, ces oiseaux nourris avec des céréales conventionnelles présentaient une distance de fuite et une durée de vol plus faibles, et étaient plus susceptibles de se déplacer en courant plutôt qu'en volant. Ces résultats montrent que les oiseaux de lignée d'élevage sont plus sensibles à l'exposition aux pesticides par rapport aux oiseaux de lignée sauvage, suggérant une différence de capacité de détoxification de l'organisme. Actuellement, la plupart des élevages de gibier élèvent des perdrix grises issues de lignées d'élevage et les nourrissent avec des aliments commerciaux pour volailles. Nos résultats suggèrent que les élevages de gibier produisent des oiseaux qui manquent de capacité d'adaptation lorsqu'ils sont relâchés dans la nature par rapport aux souches sauvages et sont donc moins susceptibles de survivre et/ou de se reproduire. Ce phénomène est aggravé par le type d'alimentation (e.g., lorsqu'ils sont nourris avec des céréales conventionnelles plutôt que biologiques). Nos résultats suggèrent donc que nourrir les oiseaux captifs avec des céréales pourrait mieux préparer les oiseaux à l'alimentation qu'ils vont rencontrer en nature une fois relâchés. De plus, utiliser des céréales produites en agriculture biologique pourrait, dans une certaine mesure, limiter les déficiences comportementales et ainsi aider à améliorer les taux de survie des oiseaux relâchés.























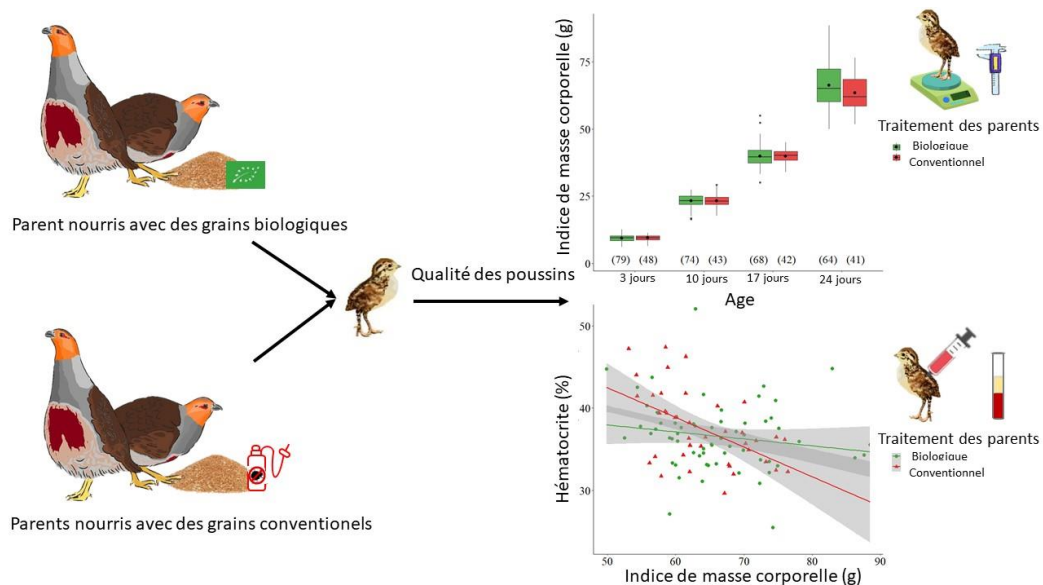


# CHAPITRE II

## Feeding on grains containing pesticide residues is detrimental to offspring development through parental effects in Grey partridge

Publié dans *Environmental Pollution*

(DOI: <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120005>)



## Avant-propos et résumé du Chapitre II

De nombreuses études toxicologiques ont montré que l'ingestion de pesticides peut induire un stress physiologique chez les oiseaux en reproduction, avec des conséquences néfastes sur les paramètres de ponte et la qualité de la progéniture par le biais des effets parentaux. Cependant, ces résultats sont issus d'expériences où les doses de pesticides sont supérieures à celles rencontrées par les oiseaux dans la nature. De plus, les effets des molécules de pesticides sont testés individuellement, ne prenant ainsi pas en compte les effets cocktail potentiels des pesticides tels qu'ils se produisent dans la nature. En effet, plusieurs pesticides sont appliqués sur les terres arables, en fonction de la culture, de la saison et de la cible visée (i.e., pesticide avec une action herbicide, insecticide ou encore fongicide). Les oiseaux spécialistes des milieux agricoles sont donc exposés et contaminés par plusieurs molécules différentes qui peuvent interagir entre elles de manière additive, synergique ou antagoniste. Jusqu'à présent, le risque d'une exposition chronique à un cocktail de pesticides a été très peu examiné chez les oiseaux. Ainsi, nos connaissances sur les conséquences de l'exposition des parents à des cocktails de pesticides sur leur reproduction et la santé de leur progéniture sont limitées. Dans cette étude, nous avons donc cherché à savoir si les paramètres de reproduction de la perdrix grise pouvaient être affectés suite à l'ingestion chronique d'un cocktail de pesticides et à évaluer les conséquences sur la condition de la progéniture. Pour atteindre ces objectifs, 24 couples reproducteurs de perdrix grises ont été nourris pendant quatre mois avec un mélange de graines soit issues de cultures conventionnelles soit issues de l'agriculture biologique comme témoin. Des mesures morphologiques et une prise de sang ont été réalisées sur les couples reproducteurs avant le début de l'expérience et une fois que chaque couple avait pondus 20 œufs. Ainsi, la condition corporelle, l'hématocrite et l'activité AChE (i.e., acetylcholine estérase, une enzyme impliquée dans l'influx nerveux) des adultes ont été comparés avant et après l'exposition aux pesticides. Les œufs ont été ramassés tous les jours, pesés, mesurés puis mis en incubation jusqu'à ce que chaque couple ait pondus 20 œufs. Les poussins éclos ont ensuite tous été nourris de la même façon avec des granulés spéciaux. La prise de masse et la croissance osseuse des poussins ont été suivies chaque semaine à partir de l'éclosion. A l'âge de 28 jours, une prise de sang et des tests de comportements ont été réalisés sur les poussins pour mesurer leur activité AChE, leur hématocrite, leur activité, leur capacité d'exploration d'un nouvel environnement et leur stratégie de fuite face à un prédateur. Les résultats ont montré que l'ingestion d'un cocktail de pesticides par les parents pendant quatre mois avait des conséquences sur leur reproduction et sur la qualité de leur progéniture sans modifier leurs traits d'histoire de vie ni

la mortalité de leurs poussins. Les couples nourris avec des graines conventionnelles ont produit des poussins plus petits à l'éclosion, et moins lourds à l'âge de 28 jours par rapport aux poussins produits par les couples nourris avec des grains biologiques. De plus, ces poussins présentaient un hémocrite plus faible lorsque leur indice de masse corporelle était plus élevé, soulignant un compromis d'allocation des ressources entre stockage des graisses et le nombre de globules rouges. Par conséquent, l'ingestion de graines conventionnelles par les couples a eu des conséquences néfastes sur la condition de leurs poussins sans pour autant impacter les parents, suggérant un effet subléthal des résidus de pesticides par le biais des effets parentaux. Bien qu'aucun effet sur le comportement ou l'activité AChE n'ait été observé, les poussins issus des couples nourris avec des grains conventionnels semblent faire face au principe de « croissance compensatoire », i.e., un compromis d'allocation de l'énergie durant la croissance, induisant un stress physiologique probablement délétère sur le long terme. Nos résultats démontrent ainsi les conséquences d'une exposition parentale à un cocktail réaliste de pesticides sur la génération suivante. Cette étude soulève notamment des questions pour la conservation et la démographie des populations de perdrix grises sauvages si les techniques agricoles actuelles sont poursuivies.























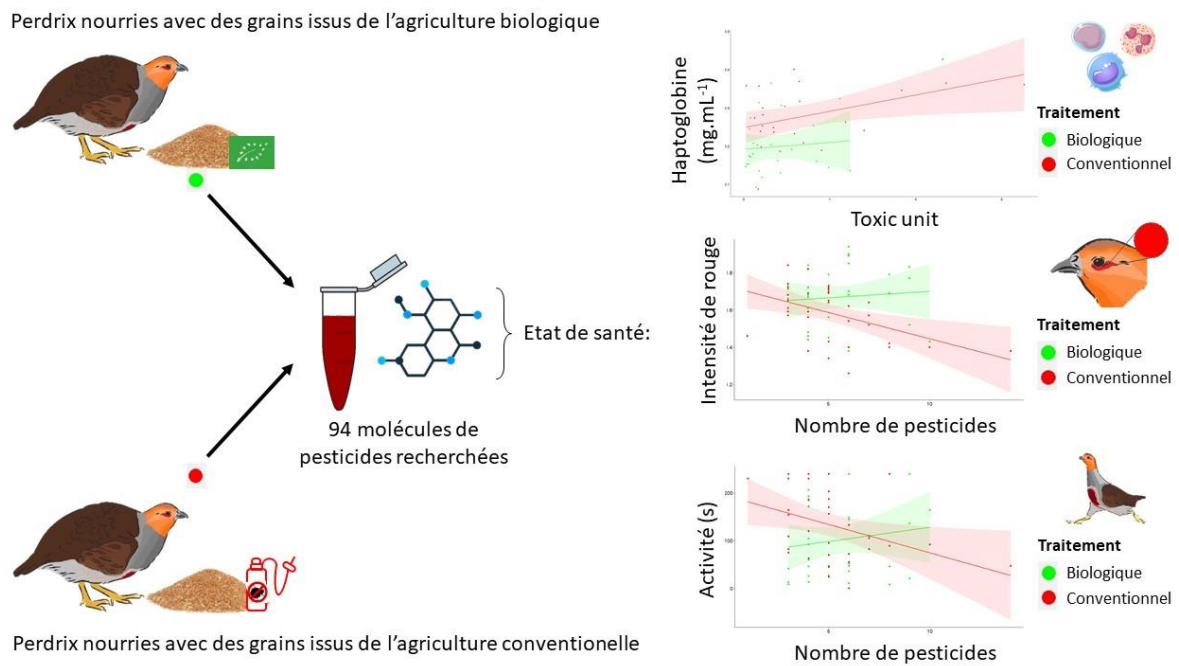




# CHAPITRE III

## Detrimental effects of pesticide cocktails on captive grey partridges' health status: an experimental study using multiple pesticides residues analyses in blood

Soumis dans *Science of the Total Environment*



### Avant-propos et résumé du Chapitre III

Les pesticides sont principalement utilisés pour lutter contre les parasites tels que les champignons, les insectes ou d'autres agents pathogènes. Cependant, par leur manque de spécificité et leur persistance dans l'environnement, les pesticides se retrouvent dans tous les compartiments environnementaux des agroécosystèmes. Cette contamination ubiquitaire peut avoir des effets involontaires et imprévisibles sur les organismes non ciblés, car des interactions additives, synergiques ou antagonistes entre les molécules sont susceptibles de se produire. Le biomonitoring d'oiseaux spécialistes des milieux agricoles, qui réagissent de manière observable à la contamination par les pesticides, pourraient fournir une vision réaliste (i) de la manière dont les organismes non ciblés peuvent être contaminés par les cocktails de pesticides mais aussi (ii) de la manière dont ils peuvent menacer leur santé. Dans cette étude, nous avons cherché à savoir s'il était possible de doser un large spectre de pesticides dans le sang de perdrix grises captive et de corrélérer la charge en pesticides aux traits d'histoire de vie des individus. Pour cela, 40 perdrix grises ont été nourries pendant cinq mois avec des céréales et légumineuses (blé, maïs, pois et féveroles) biologiques, et 40 perdrix avec le même mélange issu de l'agriculture conventionnelle. A la fin de l'expérience, une prise de sang ainsi que des mesures morphologiques et comportementales ont été réalisées. Une partie du sang prélevé a permis de rechercher les résidus de 94 pesticides de différentes familles selon un protocole mis au point pendant cette thèse en collaboration avec le laboratoire ICPEES de Strasbourg (**Article VI** en Annexe B) L'autre partie du sang a été utilisée pour doser (i) l'activité de l'AChE comme proxy de l'influx nerveux, la concentration en haptoglobine dans le plasma comme indice de la réponse immunitaire. La condition corporelle des oiseaux ainsi que l'intensité du rouge de la caroncule de l'œil ont aussi été quantifiées, cette dernière étant une mesure représentative du stock de caroténoïdes disponibles pour l'oiseau. Enfin, les tests comportementaux en open-field ont permis d'évaluer la distance de fuite et l'activité des individus. La détection et la quantification des pesticides dans le sang des perdrix ont permis de calculer deux variables représentatives de la charge en pesticides des oiseaux : la nombre de pesticides dans le sang ( $N_{ppp}$ ) et la toxic unit ( $TU_{tot}$  ; une unité corrigeant la concentration d'une molécule par sa LD50). Ces deux variables ont ensuite été utilisées pour établir une corrélation entre la charge en pesticides et les paramètres de santé des oiseaux. Une grande quantité et diversité de pesticides ont été retrouvées dans le sang des perdrix, quel que soit leur traitement alimentaire (i.e., biologique ou conventionnel). Bien que la charge en pesticides ( $N_{ppp}$  et  $TU_{tot}$ ) ne diffèrait pas significativement entre les deux groupes, les  $TU_{tot}$  les plus élevées ont été retrouvées chez les

perdrix nourries avec du grain conventionnel. D'ailleurs, la charge en pesticides des perdrix nourries avec des grains conventionnels a entraîné l'altération de plusieurs traits d'histoire de vie, alors que ceux des perdrix nourries avec des grains biologiques n'étaient pas impactées. En effet, une  $TU_{tot}$  plus élevée était corrélée à une concentration d'haptoglobine et à un hémocrite plus élevés, mais à une activité AChE plus faible. Ces résultats suggèrent que les cocktails de pesticides des perdrix nourries avec des grains conventionnels ont entraîné respectivement une réaction du système immunitaire probablement due à la mise en place d'un processus de détoxification mais aussi une altération du système nerveux. L'intensité du rouge de la caroncule, l'activité et l'hémocrite étaient corrélés négativement à un nombre élevé de pesticides dans le sang ( $N_{ppp}$ ). La diminution de l'intensité du rouge de la caroncule observée lorsque le  $N_{ppp}$  augmente souligne une potentielle allocation des caroténoïdes dans le processus de détoxification plutôt que dans l'ornementation. Les diminutions de l'activité et de l'hémocrite suggèrent une altération de l'état de santé général des individus. Ces résultats ont montré l'ubiquité de la contamination du sang des perdrix par les pesticides, quel que soit le traitement alimentaire et bien que l'expérience se soit déroulées dans des conditions contrôlées. Cette contamination soulève plusieurs questions, la première étant celle des voies d'exposition des perdrix et la seconde sur la potentielle contamination des grains biologiques. Cependant, seuls les traits d'histoire de vie des perdrix nourries avec des céréales conventionnelles était altéré. Les cocktails de pesticides de ces perdrix ont entraîné une diminution de l'état de santé général avec une altération du système nerveux et une réaction du système immunitaire au détriment de l'ornementation, suggérant au moins des effets additifs des pesticides. Plus généralement, de tels résultats observés en captivité laissent sous-entendre que les perdrix vivant en milieu naturel pourraient être d'autant plus contaminées car d'autant plus exposées, avec des conséquences délétères sur leurs traits d'histoire de vie.

**Detrimental effects of pesticide cocktails on captive grey partridges' health status: an experimental study using multiple pesticides residues analyses in blood**

**Agathe Gaffard<sup>a</sup>**, Anaïs Rodrigues<sup>b</sup>, Marie Bourillot<sup>a</sup>, Maurice Millet<sup>b</sup>, Coraline Bichet<sup>a</sup> Maria Teixeira<sup>c</sup>, Vincent Bretagnolle<sup>a,d</sup>, Karine Monceau<sup>a</sup>, Olivier Pays<sup>e</sup>, Jérôme Moreau<sup>d</sup>

<sup>a</sup>Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, UMR 7372, CNRS & La Rochelle Université, 79360 Villiers-en-bois, France

<sup>b</sup>Université de Strasbourg, CNRS-UMR 7515, ICPEES, 67087 Strasbourg cedex 2, France

<sup>c</sup>UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université Bourgogne Franche-Comté, 6 Boulevard 7 Gabriel, 21000 Dijon, France

<sup>d</sup>LTSER “Zone Atelier Plaine & Val de Sèvre”, Villiers-en-Bois, 79360, France

<sup>e</sup>Univ Angers, BIODIVAG, 49000 Angers, France

REHABS International Research Laboratory, CNRS-Université Lyon 1-Nelson Mandela University, George Campus, Madiba Drive 6531 George, South Africa.

**\*Correspondence:** A. Gaffard, Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, UMR 7372, CNRS & La Rochelle Université, 79360 Villiers-en-Bois, France. E-mail address: [agathe.gaffard@cebc.cnrs.fr](mailto:agathe.gaffard@cebc.cnrs.fr)

## ABSTRACT

Phyto-pharmaceutical products (PPP) are mainly used to control pests such as fungi, insects or other pathogens. However, by their lack of specificity and their persistence in the environment, PPP end up in all environmental compartments of agroecosystems. This ubiquitous contamination may cause unintentional and unpredictable effects on non-target organisms as synergetic or antagonistic interactions among molecules are likely to occur. Biomonitoring studies using farmland birds that respond in observable ways to PPP contamination could provide a realistic view of (i) how non-target organisms may be contaminated by PPP cocktail but also (ii) how it may threaten their health. The current study aimed to measuring captive partridge's PPP load in blood after a long-term exposure to a cocktail of PPPs and linking it with health status. The experimental procedure involved 80 captive grey partridges (*Perdix perdix*) fed for 5 months either with organic or conventional grains (i.e., with PPP residues). For the very first time, a multiple analysis of PPP residues in blood (i.e., 94 PPPs sought from different pesticide families) was used to correlate blood PPP load and multiple health parameters. A large quantity and diversity of PPP were found in partridges' blood, whatever their food treatment. Moreover, the cocktail of PPP present in the blood of partridges fed with conventional grains appeared more toxic as several health parameters were impeded. Higher toxic unit was correlated to higher haptoglobin concentration and haematocrit but lower AChE activity. Lower eye ring redness, activity and also haematocrit were correlated with a high number of PPP in blood. These results showed the ubiquity of PPP contamination even under controlled conditions and whatever the food treatment. Most importantly, health status of partridges fed with conventional grain was impeded while this was not the case for partridges fed with organic grains.

**Key-words:** pesticide cocktails, toxic unit, physiology, behaviour, biomonitoring, *Perdix perdix*,

## 1. INTRODUCTION

Phyto-pharmaceutical products (“PPP” hereafter) are mainly used to control pests such as fungi, insects or other pathogens (European Commission 2009). However, by their lack of specificity and their persistence in the environment (Giorio et al. 2017; Mitchell et al. 2017), PPP and their conversion products end up in the different environmental compartments, such as soil, groundwater or rain (Gilliom 2007; Silva et al. 2019). Thus, wildlife fauna is exposed and contaminated by cocktails of PPP (e.g., Pelosi et al. 2021; Brodeur et al. 2022; Fritsch et al. 2022; Larras et al. 2022), throughout ingestion, respiration and/or dermal exposition (Boatman et al. 2004, Wood and Goulson 2017, Stanton et al. 2018). Depending on their chemicals properties, PPP can be bioaccumulated (i.e., stored within the organism in different tissues) and/or biomagnified (i.e., accumulated along the trophic chain). Many toxicological experimentations have studied the adverse effects of PPP on non-target organisms, such as vertebrates, in controlled conditions (Gibbons et al. 2015; Richardson et al. 2019). However, the additive, synergistic, and/or antagonistic interactions between molecules that could occur raise the probability to PPP of impacting non-target organisms in ways that cannot be predicted by laboratory studies (Mineau and Palmer 2013; Moreau et al. 2022).

Indeed, the absorption of pesticides leads to the initiation of an energy-intensive detoxification process through the biotransformation and/or the excretion of the compounds and their metabolites to reduce their toxicity (Katagi and Fujisawa 2021). In the case of a chronic ingestion of several pesticides, these processes can be saturated and the toxicity of the molecules can adversely affect health and behaviour of individuals. Many species of birds have been found to be sensitive to PPP (Mitra et al. 2011; Pandey et al. 2017; Moreau et al. 2022), e.g., by directly enhancing their inflammatory response (Mitra et al. 2011; Gibbons et al. 2015). They are also known to induce neuronal degeneration and alter the nervous system through acetylcholine esterase activity disturbance (e.g., neonicotinoids; Zeid et al. 2019; Rawi et al. 2019). Symptoms associated with an altered nervous system often result in an overall decrease in foraging activity, leading to weight loss (Eng et al. 2017, 2019) but also increased vulnerability to predators (Hunt et al. 1992). However, all of these results came from experiments where the effects of a single PPP of interest (e.g., glyphosate: Oliveira et al. 2007; Hussain et al. 2019) or PPP families of interest (e.g., neonicotinoids: Rawi et al. 2019) were tested, thus without considering cocktail effects. As a complement to laboratory investigations, biomonitoring of free-living sentinel species can provide a more realistic view of (i) how non-target organisms may be contaminated by PPP cocktails but also (2) how it may threaten their health (Woodruff 2011, Gómez-Ramírez et al. 2014; Siddig et al. 2016, Brodeur et al. 2022).

Studies using sentinel species that respond in observable ways to anthropogenic disturbances can provide either qualitative or quantitative assessments of agroecosystem's quality and threats (Woodruff 2011). Until now, PPP exposure of birds is often determined after death by analyzing specific organs, which does not allow to follow in real time the contamination of environments nor to connect it with individual health (Pacyna-Kuchta et al. 2022). Thus, blood and plasma of wild birds seem to be good candidates because it is easy to collect once the bird is trapped and can represent a recent PPP contamination. Until now, most studies using multiple PPP analysis in birds' blood or plasma have only focused on environmental contamination monitoring through single family of PPP, such as organochlorines (Rivera-Rodriguez et al. 2007; Tiyawattanoj et al. 2021) or neonicotinoids (Taliensky-Chamudis et al. 2017; Humann-Guillemot et al. 2019) and thus assess PPP ecotoxicological risk through modelling approaches. According to our knowledge, no study have used multiple PPP analysis in birds' blood to link it with their health status.

The grey partridge (*Perdix perdix*) is a farmland bird that shows a major decline since 1950 in Europe, although much conservation efforts have been made to reverse this trend (Kuijper et al. 2009; Sotherton et al. 2014; Bro 2016). The management of this game species benefitted from a large amount of research throughout Europe (e.g., review of Sotherton et al. 2014 for UK; Bro 2016 for France), including *in natura* ecotoxicological studies to investigate the link between decline of birds and their exposure to PPP. Partridges are sedentary and therefore exposed to PPP throughout their lives. They live in crops and feed with seeds and insects from cultivated fields (Potts and Aebischer 1991). PPP have already been found in unhatched eggs found in treated fields (Bro et al. 2016) but also in the liver of wild grey partridges cadavers, collected either after hunting (Lennon et al. 2020) or poisoning due to coated seeds ingestion (Ljubojević et al. 2016; Millot et al. 2016). Experimental studies with captive grey partridges highlighted sublethal effects on their physiology and behaviour after ingestion of conventional grains with PPP residues (Moreau et al. 2021; Gaffard et al. 2022).

The current study aimed to i) measure captive partridge's PPP load in blood after a long-term exposure to a cocktail of PPPs and ii) explore its potential effect on health status, in order to investigate the ability of the grey partridge to be a sentinel species. Our experimental procedure involved 80 seven-month-old captive grey partridges fed with natural grains during five months. Half of the birds were fed with organic grains ("PPP -" hereafter) while the other half received grains purchased from producers that grew crops under conventional agriculture with various PPP applications during cropping ("PPP +" hereafter), thus mimicking the pesticide exposure of wild birds through feeding during the winter. For the first time, a multiple

analysis of PPP residues in blood (i.e., 94 PPPs sought from different pesticide families) was used to link PPP load (using proxies of their toxicity, see material and methods) and multiple health parameters (i.e., body condition, eye ring redness, haematocrit, acetylcholinesterase activity, haptoglobin concentration, activity and risk-taking behaviour). These parameters are known to respond significantly to the ingestion of PPP in partridges (Lopez-Antia et al. 2013, 2014, 2015; Moreau et al. 2021, Gaffard et al. 2022; see Moreau et al. 2022 for a review). We predicted a higher PPP number and concentration (i.e., higher PPP load) would be found in the blood of partridges fed on PPP + grains than those fed on PPP - grains. In addition, we hypothesised a correlation between PPP load in blood and health parameters; a higher load would be related to lower body condition, haematocrit and acetylcholine esterase activity and thus higher risk-taking and lower activity. On the contrary, the higher the PPP load in blood the higher the haptoglobin concentration should be, as these are molecules involved in the immune response.

## 2. MATERIAL AND METHODS

All experiments complied with French laws on animal experimentation, and all experimental protocols were approved by the Committee of Animal Experimentations of the Deux-Sèvres French Department (APA FIS#9465-201703101551625).

### 2.1. Experimental design

The study took place in a commercial game farm in south-western France using a wild genetic strain (the F3 generation of wild trapped birds) on 7-month-old captive-born birds (n = 80) and lasted 5 months, from the 30<sup>th</sup> of November 2020 to the 24<sup>th</sup> of March 2021. Before experimentation, all birds lived in the same pen and were fed on commercial poultry food (STARGIB entretien, see ESM 1 for its composition).

On the 30<sup>th</sup> of November, each partridge was sexed (according to the presence of secondary sexual characters), fitted with an alphanumeric metal ring and randomly divided in two large pens (100 m x 10 m x 4 m) equipped with feeders, drinkers and metal sheet for shelter. Each pen corresponds to one experimental food treatment (i.e., PPP - or PPP +). In the first treatment, individuals were fed *ad libitum* on grains harvested from certified organic crops (i.e., purchased from organic producers), composed of 25% wheat, corn, pea and faba bean (PPP-). In the second treatment (PPP+), birds were fed *ad libitum* on the same mixture of grains purchased from producers using conventional agriculture in which various PPP were applied during the cropping season.



Birds were under constant surveillance, water and food provided each day by the farmer and kept under a natural light cycle. During winter, 10 partridges inadvertently died (5 fed PPP- and 5 fed PPP+) which is commonly observed in breeding farm.

## 2.2. Monitored parameters

All partridges were captured after 5 months of food treatment (i.e., PPP + or PPP -) to assess (i) their PPP load in blood (i.e. the number of PPPs detected and the toxic unit, see below) and (ii) their health status through physiological traits and behaviour. From the 18<sup>th</sup> to the 19<sup>th</sup> of March 2021, risk-taking and activity behaviours were assessed. Then, the 24<sup>th</sup> of March 2021, physiological traits were measured including birds' body condition, haematocrit, eye ring redness, acetylcholine esterase (AChE hereafter) activity and blood haptoglobin concentration. All these monitored parameters were chosen as they are easily measurable, minimally invasive (a single blood sample allowed the analysis of several physiological parameters), and their responses to PPPs have already been reported in numerous toxicological studies (see Moreau et al. 2022 for a review). In total, less than 200  $\mu\text{L}$  of blood were collected from the partridges (i.e., 50  $\mu\text{L}$  for multiple PPP residues analysis, 50  $\mu\text{L}$  for AChE, 50  $\mu\text{L}$  for haptoglobin and 10  $\mu\text{L}$  for haematocrit).

### 2.2.1. Analytics for residues of PPP in blood

To assess multiple PPP residues analyses in partridges' blood, 50  $\mu\text{L}$  of blood was taken from the brachial vein using a sterile needle ( $\varnothing$  0,06 mm) and heparinised micro-capillary tubes. Blood was then stored in Eppendorf tubes at  $-80^{\circ}\text{C}$  until multiple PPP residues analyses.

#### 2.2.1.1. Blood sample extraction and analysis

Blood samples were analysed by the Institut de Chimie et Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé (ICPEES, UMR 7515) of the University of Strasbourg (France). 94 molecules were monitored for each individual. Various liquid-liquid extraction methods found in the literature were compared, adapted and optimized according to the protocol of Goutner et al. (2011) for blood extraction and Hao et al. (2018) for the extraction of PPP from plasma. For non-volatile compounds, LC-MS/MS analyses were performed using the MRM mode with 2 mass transitions for each PPP, one for quantification and one for qualification. For volatile compounds, GC-MS/MS was used. Analyses were preceded with a thermal desorption step and MRM mode was also used for detection and quantification. Both analytical methods were developed and validated according to the protocol described by Rodrigues et al. (2022,

submitted). The concentration of each PPP found for each individual was obtained in  $\text{pg.mg}^{-1}$  (see Table 1 for details).

#### 2.2.1.2. Partridges' PPP load

To assess PPP load of partridges, we first calculated the number of PPP (“NPPP” hereafter) detected in the blood of each bird. Although this approach does not take into account the toxicity of the compounds, it remains a simple metric to represent the risk related to potential additive and/or synergism effects in PPP mixture (i.e., an increasing number of PPP leads to an increased risk of interactions among molecules and thus toxicity; Zaller et al. 2022). Then, we calculated a second variable representative of the mixture toxicity using concentration addition methods. Their underlying principle implies that individual components of the mixture contribute to mixture toxicity in proportion to their individual concentration and toxicity (Kortenkamp et al. 2009). As there is no existing models to assess potential synergism or antagonism in PPP mixtures (Cedergreen et al. 2014; Hladik et al. 2016; Brodeur et al. 2022; Larras et al. 2022), concentration addition models are often suggested as a default model for risk assessment of chemical mixtures (Panizzi et al. 2017; Schell et al. 2018; Larras et al. 2022). Thus, we calculated the toxic unit per bird (“TU<sub>tot</sub>” hereafter) defined by several committees (SCHER/SCENIHR/SCCS 2012) as the ratio between the concentration of a mixture component and its toxicological acute (e.g. LD50) or chronic (e.g. long-term No-Observed Effect Concentration NOEC) endpoint. Basically, this concept can be used to quantify the toxicity of a mixture based on its composition, assuming the CA principle (EFSA 2012; Hladik et al. 2016; Panizzi et al. 2017). Here, TU<sub>tot</sub> corresponds to the sum of each PPP toxic unit (“TU” hereafter), i.e., the ratio between PPP concentration and the corresponding LD50.

$$\text{TU}_{\text{tot}} = \sum_{i=1}^n \text{TU}, \text{ with } \text{TU} = \frac{\text{PPP concentration (pg.mg}^{-1}\text{)}}{\text{PPP LD50 (mg.kg}^{-1}\text{)}}$$

TU calculations are based upon LD50 data for each substance from the Pesticide Properties Database accessed in 2022 (Lewis et al. 2016). When the reported available LD50 values exceeded a certain value (e.g.,  $>2000 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), the minimum value (here,  $2000 \text{ mg.kg}^{-1}$ ) was used. Although not all PPP operate via the same mode of action, and toxicity may not be additive, this approach allowed a first step in assessing potential acute toxicity of the mixture of PPP observed in partridges' blood (Hladik et al. 2016; Panizzi et al. 2017, Brodeur et al. 2022).

### 2.2.2. Partridges' health status

#### 2.2.2.1. Body condition

Body condition determines the corpulence of individuals according to their weight and tarsus size as a proxy of energy capital accumulated by feeding (Peig and Green 2009) and can greatly vary under PPP-induced stress (e.g., Lopez-Antia et al. 2013; Bellot et al. 2022). Right and left tarsus lengths were measured twice with a calliper (accuracy of 0.1 mm) and body mass using a spring scale to the nearest 1 g (Pesola 500 g). From body mass and mean tarsus length (right and left), we evaluated the body condition with the scaled mass index (Peig and Green 2009).

#### 2.2.2.2. Eye ring redness

In the Grey partridge, the red patch just behind the eye acts as a secondary carotenoid sexual trait, involved in mate choice (Svobodová et al. 2013). High-resolution digital images were taken without flash or zoom twice on each side of the head using the same digital camera (Olympus, Stylus TG-2) under standardized conditions (same light, same spatial position between camera and birds) to measure the intensity of the red colour of the eye ring. A standard grey strip was placed close to the head to control for any subtle variation in illumination between images. For each image, the intensity of red redness (redness) was calculated as R (red) divided by the average of R (red), G (green), and B (blue) (see procedure in Lopez-Antia et al. 2013).

#### 2.2.2.3. Haematocrit

Haematocrit reflects nutritional state of individual and is known to decrease under physiological stress (Ots et al. 1998). To assess haematocrit, a blood sample was taken from the brachial vein using a sterile needle ( $\emptyset$  0.06 mm) and heparinised micro-capillary tubes. Capillary tubes were then centrifuged at 5000 rpm for 5 minutes immediately afterwards to determine haematocrit levels – proportion of the tube filled with red blood cells divided by the total sample volume in the capillary tube, as a ratio of respective tube length (Biard et al. 2015). Length was measured with an electronic calliper to the nearest 0.1 mm. The remaining blood was stored in Eppendorf tubes at  $-80^{\circ}\text{C}$  until AChE and haptoglobin concentration.

#### 2.2.2.4. Acetylcholine esterase activity (AChE)

AChE is the enzyme which hydrolyses the acetylcholine (ACh), an important neurotransmitter in the central and peripheral nervous system. Several PPPs affect AChE activity (e.g.,

organophosphates and carbamates) which lead to behavioural alteration and body condition degradation (Mitra et al. 2011; Moreau et al. 2022). AChE activity was determined with a spectrophotometer using a colorimetric technique derived from the Ellman (1961) method. Five microliters of blood were diluted in 100  $\mu$ L of 1% Triton X-100 solution, which haemolysed the cells, shaken for 30 min at 4°C and then centrifuged at 14000 rpm for 5 min at 4°C to pellet blood cell debris. Ten microliters of haemolysed blood supernatant was then added to 285  $\mu$ L of a 0,25 mM solution of Aldrithiol™-4 (Sigma Aldrich) in phosphate buffer and 5  $\mu$ L of a 120 mM propionylthiocholine iodide (Sigma Aldrich) solution as AchE substrate. Absorbance was read at 324 nm every minute for 40 min at 37°C using a SpectraMax iD3 (Molecular Devices, San Jose, CA, United States) microplate reader. AChE activity was calculated with SoftMax Pro7 software as the rate of change of absorbance per minute (mU/min) during the linear portion of the kinetics.

#### 2.2.2.5. Haptoglobin concentration

Haptoglobin is multifunctional an acute phase protein that can increase rapidly in response to infection or inflammation (Matson et al. 2012; Quaye 2008). This protein is responsible for binding free haemoglobin in order to limit damages caused by reactive oxygen components released during inflammation (Quaye 2008). Thus, in the context of the study, haptoglobin concentration may increase to mitigate reactive oxygen species (ROS) damages under PPP-induced oxidative stress. Haptoglobin was quantified in 7.5  $\mu$ l plasma samples using a commercially available assay (TP-801, Tri-Delta Diagnostics, Ireland), which colorimetrically measures the heme-binding capacity of the plasma. We followed the instructions provided by the manufacturer with slight modifications, according to Matson et al. (2012). The standards ranged from 2.5 to 0.039 mg/ml were included in duplicate in each plate, as well as a negative control. The samples were randomly distributed across the two plates. The absorbance of the samples was measured by a spectrophotometer at 620 nm (SpectraMax iD3, Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, USA) both before and after the addition of the final reagent inducing the colorimetric reaction. These two measures allowed to control for among-sample differences in colour and cloudiness (Matson et al 2012). Results are given in mg/mL. Using the standards, we calculated the intra- (3.06%) and inter-plate (3.14%) CVs.

#### 2.2.2.6. Partridges' risk-taking and activity behaviours

Risk-taking and activity are both behaviour sensitive to PPP exposition, either being inhibited (e.g., due to AChE inhibition; Mineau and Palmer 2013) or exacerbated (e.g., to compensate

for physiological processes impairment; Moreau et al. 2022). Risk-taking and activity of each partridge were assessed with an open field test from the 18<sup>th</sup> and the 19<sup>th</sup> of March 2021. Partridges from the two food treatments were randomly caught during the evening of the 17<sup>th</sup> and 18<sup>th</sup> of March and kept in cardboard boxes overnight (5 birds by boxes, 66 cm x 38 cm x 17.5 cm) 7–11°C) for acclimatization. Thirty five birds were tested the first day and 34 the second day. The following day, each bird experienced the same sequence of tests, which consisted in measuring (i) risk-taking test in a cage outside, and (ii) activity test in an open-field test (see below). The behaviour of each bird was recorded by the same observers. After the full series of measurements, birds were released into their pens. First, risk-taking behaviour was assessed through Flight Initiation Distance (FID hereafter), which corresponds to the distance at which the individual begins to fly when a danger approaches (Frid and Dill 2002; e.g., Rabdeau et al. 2021). Partridges were placed by one operator in a squared, wired cage (46 cm x 32 cm x 36 cm) in a plough field. Another operator was hidden behind a hedge, 100 m from the cage, and watched partridges' behaviour with binoculars. After 3 minutes of acclimatization, the hidden operator approached the birds. The FID was estimated as the distance at which the bird reacted (tried to run or fly inside the cage) to the straight-line approach of the operator. After the test, birds were caught by the first operator, put in a cardboard box (66 cm x 38 cm x 17.5 cm) and brought directly to the open-field test in a nearby building. Open-field test was conducted in a building (5 m x 5.5 m x 1.50 m, 7–11°C, 30.5 lux) next to the pens. Partridges were individually brought in a cardboard box and given 3 minutes for acclimatization into the box. Then, the operator – hidden in a corner behind a sheet – opened the cardboard box to let the partridge out for 4 minutes. The activity behaviour of the partridge was assessed by the time the bird spent moving. Once the tests were completed, the partridges were released into their pens.

## 2.3. Statistical analyses

### 2.3.1. Description and distribution of detected PPPs according to the food treatment

When a pesticide was detected at a level below the limit of quantification (“LOQ” hereafter) but above the limit of detection (“LOD” hereafter), the LOQ/2 value was attributed (Tekindal et al. 2015). When a pesticide was not detected in the partridges' blood (<LOD), the concentration value was set at the (1/3 LOQ) /2 except for the heatmap where 0 was attributed (Tekindal et al. 2015). For each detected sample (> LOD), a Chi-squared test, or a Fisher exact

test when there were less than 5 detected sample in one food treatment, were used to assess the differences in the number of detected samples between the partridges' food treatments (PPP + or PPP -). For each quantified sample ( $>$  LOQ), a Wilcoxon test was used to assess the differences in the mean concentration of each PPP between partridges' food treatment (PPP + or PPP -) when the sample size of one food treatment was superior at 5.

### 2.3.2. Partridges' PPP load, food treatment and health status relationships

First, the effect of food treatment (i.e., PPP + and PPP -) on partridges' PPP load (i.e.,  $N_{PPP}$  and  $TU_{tot}$ ) was assessed using a Wilcoxon test. Then, relationships between partridges' PPP load (i.e.,  $N_{PPP}$  and  $TU_{tot}$ ), and variables indicating health status (i.e., body condition, haematocrit, eye ring redness, AChE activity, haptoglobin concentration, risk-taking and activity behaviour) were assessed using multiple linear regressions ("MLR" hereafter). Statistical assumptions to run linear models were checked. For each food treatment group (i.e., models were run separately), the effects of partridges' PPP load on the variables describing health status were tested by MLR with  $F$ -ratio statistics first with i)  $N_{PPP}$ , body condition and their two-way interaction, then with ii)  $TU_{tot}$ , body condition and their two-way interaction.

For all tests,  $P$  values are given at a 5% significance level. All statistical analyses were performed with RStudio software (version 4.0.4, R Core Team 2022) implemented with the 'smatr' package for the calculation of body mass index (Peig and Green 2009).

## 3. RESULTS

### 3.1. Description and distribution of detected PPPs with food treatment

Among the 94 searched PPPs in the partridge blood, 33 were detected at least in one blood sample and included 13 herbicides, 15 fungicides and 5 insecticides (Table 1). Therefore, only molecules detected in at least one partridge blood sample were further considered for analysis. Four PPPs were found in the blood of more than half of the individuals (Table 1): Bifenox was detected in 66 individuals, Diphenylamine in 56 individuals, Nitenpyram in 49 individuals and Tolyfluanid in 39 individuals. Some molecules were more likely to be detected in the PPP + partridges' blood such as Nitenpyram which was detected in 31 PPP + partridges against 18 in PPP - (Chi-squared test:  $\chi^2_2$  13.24,  $P < 0.01$ ; Table 2). Conversely, Epoxyconazole and Propiconazole were detected in 9 PPP - partridges against respectively one (Fisher exact test:  $P = 0.02$ , Table 2) and none PPP + partridges (Fisher exact test:  $P < 0.01$ ; Table 2). Concerning

pesticide concentrations, Bifenox was significantly higher in PPP + partridges ( $1.64 \pm 1.67$  mg.kg<sup>-1</sup>) in comparison to the PPP – partridges ( $0.82 \pm 0.8$  mg.kg<sup>-1</sup>, Wilcoxon test:  $W = 172$ ,  $P = 0.02$ ; Table 2). Concentrations of Dimethenamid P were higher in PPP – partridges ( $0.19 \times 10^{-3} \pm 0.15 \times 10^{-3}$  mg.kg<sup>-1</sup>) in comparison to PPP + partridges ( $0.03 \times 10^{-3} \pm 0.02 \times 10^{-3}$  mg.kg<sup>-1</sup>; Wilcoxon test:  $W = 41$ ,  $P = 0.04$ ; Table 2).

### 3.2. Partridges' health status, food treatment and PPP load relationships

Partridges'  $N_{PPP}$  varied from 1 to 14 molecules detected per blood sample, with a mean ( $\pm$  SE) of  $5 \pm 2$  molecules (Fig.1). PPP TUs ranged from 0.00007 to 3.19 with the higher PPP TUs found in the PPP + partridges' blood (Fig.1). Partridges  $TU_{tot}$  was calculated from the 33 PPP TUs and ranged from 0.007 to 3.26 with a mean ( $\pm$  SE) of  $0.56 \pm 0.64$ . We did not detect any significant effect of food treatment on  $TU_{tot}$  (Wilcoxon test:  $W = 465$ ,  $P = 0.12$ ) and  $N_{PPP}$  (Wilcoxon test:  $W = 670.5$ ,  $P = 0.36$ ). Similarly, we did not detect any significant effect of PPP load (i.e.,  $N_{PPP}$  and  $TU_{tot}$ ) on body condition and FID for both food treatments (see Table 3.a and 3.b). Finally, we did not detect any significant effect of  $N_{PPP}$  and  $TU_{tot}$  on partridges fed on PPP – health status (Table 3.a and 3.b). However, partridges fed on PPP + with higher TU had higher haptoglobin concentration (MLR,  $F_{1,21} = 4.88$ ,  $P = 0.03$ ; Fig. 2.a, Table 3.a), higher haematocrit (MLR,  $F_{1,31} = 4.28$ ,  $P = 0.04$ ; Fig. 2.c, Table 3.a) and lower AChE activity (MLR,  $F_{1,31} = 4.33$ ,  $P = 0.04$ ; Fig. 2.b, Table 3.a). Concerning  $N_{PPP}$  in blood samples, the higher the  $N_{PPP}$  was, the more partridges fed PPP + had lower haematocrit (MLR,  $F_{1,31} = 4.59$ ,  $P = 0.04$ ; Fig. 3.a, Table 3.b), lower eye ring redness (MLR,  $F_{1,31} = 9.89$ ,  $P < 0.01$ ; Fig. 3.b., Table 4.b) and lower activity (MLR,  $F_{1,31} = 5.03$ ,  $P = 0.03$ ; Fig. 3.c, Table 4.b).

## 4. DISCUSSION

This study aimed to i) measure captive partridge's PPP load in blood after a five months of exposure to a cocktail of PPPs and ii) correlate it with health status. The most surprising result of our study was undoubtedly the large quantity and diversity of PPP measured in partridges' blood, whatever their food treatment. Partridges fed on PPP – were as much contaminated as the partridges fed on PPP +, both for PPP number ( $N_{PPP}$ ) and toxic unit ( $TU_{tot}$ ) and even though they were under controlled conditions. However, despite a general contamination, partridges fed on PPP + seemed to be more sensitive to the cocktail of PPP they absorbed as several of their health parameters were related to  $TU_{tot}$  and  $N_{PPP}$ , while none of them were affected for partridges fed on PPP –. Indeed, the higher the  $TU_{tot}$ , the higher the haptoglobin concentration and the haematocrit were and the lower the AChE activity was. Eye

ring redness, activity and also haematocrit were related to  $N_{PPP}$  as they decreased with increasing  $N_{PPP}$ . These results showed the ubiquity of PPP contamination even under controlled conditions and whatever the food treatment. Most importantly, partridge's health status was impeded by the PPP + cocktail.

This contamination by several PPP in yearling partridges that have always lived in captivity in a farm, raises many questions about the source of contamination. Before the beginning of the experiment, all birds were fed with ground feed mixture for game birds since their birth. This poultry food is mainly made from imported conventional soya bean, maize, wheat and sunflower, likely containing pesticide residues (Klüche et al., 2020). Even if the blood is supposed to reflect a recent contamination, it cannot be excluded that some persistent molecules could still be detected after several months. Another explanation that could explain this widespread contamination is based on the environment of the pens, surrounded by treated fields. When PPP are sprayed, the fraction of the applied PPP that is dispersed in the air is estimated to be ca. 15–40% (Soccoro et al. 2016). PPP transport may occur over short or long distances up to thousand kilometres in the atmosphere (Shen et al. 2005), resulting in PPP deposition in soils, surface waters and enter waterways via runoff (Quaglia et al. 2019). For example, Diphenylamine (i.e., the second most frequently detected PPP in our partridges whatever their food treatment) is one of the most used PPP worldwide and consequently often found as residues in soils (EFSA 2012). It is also estimated that only 2-20 % of the neonicotinoids used to coated seeds are absorbed by crops, leaving 80-98% of the active molecule available in soil and water (Hladik et al. 2018). Besides, several PPP are also known to be highly persistent in water, e.g. Tolyfluanid and Carbendazim which are banned and/or disapproved by EC regulation 1107/2009 since many years (Singer et al. 2010; Reemtsma et al. 2013). This could explain their presence in partridge's blood, although analyses of the water supplied to the partridges could not have been done. In this context of global PPP exposure, contamination could also occur via the respiratory pathway, during preening or through dermal exposition if individuals have been in contact with contaminated plants, soil or water (Mineau 2011; Sánchez-Bayo 2011), with some molecules being more toxic via this pathway than through ingestion (e.g., Hudson et al. 1979 and Driver et al. 1991).

Although these different hypotheses could justify the contamination of all birds, half of the partridges were fed with certified organic grains, i.e., assumed without PPP residues. Yet, some PPPs were found in their blood and not in the partridges fed on PPP +. Indeed, Epoxiconazole



and Propiconazole have been solely found in the partridges fed on PPP –. One hypothesis is that either the organic grains, or the pen where the partridges fed on PPP –, were contaminated with these two triazoles. Similarly, partridges fed on PPP – were characterized by the occurrence of Nitempyram and higher concentration of Bifenox. These differences between the two food treatments showed that even under experimental conditions, the PPP contamination is ubiquitous and complex to control when dealing with the issue of PPP cocktails. However, since we were interested in cocktail effects on health status, we thus investigated the relationship between PPP load and health status for each food treatment separately.

Indeed, the variability in the number and the toxicity of the PPPs (i.e.,  $N_{PPP}$  and  $TU_{tot}$ ) present in partridges' blood highlighted different gradient of PPP load between food treatment groups. Partridges fed on PPP – seemed to better cope with their PPP cocktail as any of their health parameters was affected by their food treatment. However, haptoglobin concentration, AChE activity, haematocrit, eye ring redness and activity were affected by the PPP + cocktail. The positive relation between haptoglobin concentration and  $TU_{tot}$  could reflect that PPPs are able to trigger the immune system. Indeed, haptoglobin intervenes during an inflammatory reaction or oxidative stress. Studies have shown that several PPPs may enhance oxidative stress which led to the abnormal destruction of red blood cells (see Moreau et al. 2022 for a recent review), and thus to an increase in heme-binding proteins (such as haptoglobin) and antioxidants components, in the blood. In line with our predictions, AChE activity was lower when  $TU_{tot}$  was higher. Indeed, several families of pesticides, specifically insecticides, can alter birds' nervous system (Casida 2009, 2011, 2018; Casida and Durkin 2013; Casida and Bryant 2017). For example, neonicotinoids (e.g., Nitempyram and Thiametoxam found in partridge's blood) target neural function as competitive agonists of nAChE, although their effects are assumed to be lessened in vertebrates due to the reduced prevalence of this receptor (Casida 2018; Tomizawa and Casida 2003, 2005). Contrary to our predictions, haematocrit (i.e., a reflection of the proportion of red blood cells circulating in the blood) of partridges fed PPP + was positively correlated with the  $TU_{tot}$ . This may reflect dehydration of birds (Fair et al. 2007), as partridges with highest haematocrit are also the ones with the higher haptoglobin concentration, the lower AChE activity and thus the higher  $TU_{tot}$ . Altogether, our results seem to indicate that these birds probably experience a significant physiological stress due to the PPP + cocktail absorption, as their immune system, their nervous system and their haematopoiesis seemed to be altered.

The number of compounds had also several effects on health parameters of the partridges fed on PPP +. For example, decrease in eye-ring redness in partridges with higher  $N_{PPP}$  may also express birds' physiological stress. Indeed, redness of eye ring depend on carotenoids plasma concentration, this molecule being involved both in immunocompetence and in sexual selection (Svobodová et al. 2016). Carotenoids allocation is a well-known trade-off between self-maintenance and sexual ornamentation (Fitze et al. 2007; Baeta et al. 2008). We can thus assume that under physiological stress induced by PPP absorption, carotenoids were involved in cellular functions such as immune defence rather than in eye ring redness. This result was enhanced by the decrease in haematocrit when the number of compounds ( $N_{PPP}$ ) increased for partridges fed on PPP +. Under oxidative stress, erythrocytes are degraded, being indicative of anaemia and thus affecting the health of individuals (Fair et al. 2007). Decreased erythrocyte production in response to PPP exposition has already been reported with exposure to neonicotinoids (Lopez-Antia et al. 2013; Singla and Sandhu 2015) or after ingestion of conventional grains (Moreau et al. 2021). Decrease in sexual ornamentation may alter courtship behaviour, leading to an increase in general activity to compensate decrease attractiveness (Moreau et al. 2021). However, partridges fed on PPP + with higher  $N_{PPP}$  were less active, highlighting again the potential neurotoxicity of the PPP + cocktail.

Overall, our results highlighted detrimental effect of PPP + cocktail on partridges' health status. However, the biological processes behind these relationships remain complex to explain and to understand, all the more with the  $TU_{tot}$  and  $N_{PPP}$  that are not fully representative of potential cocktail effects. CA models are frequently applied in the regulatory risk assessment to investigate possible synergism of chemicals (Kienzler et al. 2014). Models assuming concentration addition are the most frequently used because i) they are considered to be more conservative than Independent Action (IA) models (Kortenkamp et al. 2009) and ii) they are a less data demanding tool, using existing data such as LD50 by applying the concept of toxic units (Verbruggen and Van den Brink 2010). However, the impact of PPP on individuals also depends on complex combination of multiple factors such as the mode of exposure, the mode of action of the molecules involved, their toxicity, their concentration and the repetition of exposure (acute *versus* chronic), as many variables that are difficult to control even in experimental conditions. One hypothesis that could justify the better health of the organically fed individuals is that the pea, wheat, corn and faba bean mixture was richer in energy than the conventional mixture, increasing the birds' detoxification capacities and thus mitigating the deleterious effects of their cocktail.

## **5. CONCLUSION**

For the first time, a large quantification of PPP in captive partridges' blood highlighted their omnipresence and their sublethal effects on health status through cocktail effect. Such biological effects could be potentially critical to the survival and the reproduction of the birds and may translate into altered population dynamics. Indeed, following this experimental study, it can be assumed that wild grey partridges would certainly be exposed to a wider variety and higher concentration of PPP than captive birds because they do not live in a restricted and controlled area but in the middle of treated fields. Overall, the findings of the current study support the view that pesticide contamination could be a potential driver of farmland bird decline, and highlight the need to urgently review crop protection practices associated with modern agriculture.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Julien Blandin for letting us work on his farm, and for taking care of the partridges during the study. We are grateful to the Fédération des Chasseurs (79), its president Guy Guedon and Frederic Audurier and its team for their support. We would like to thank Landry Boussac and Simon Billon for their assistance during part of the monitoring. Finally, we acknowledge Oxford Science Editing service for carefully improving the English of the manuscript.

## **FUNDING SOURCES**

This work was supported by the French National Centre of Scientific Research (CNRS) and the French National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment (INRAE). This study was partly funded by the projects ANR JCJC PestiStress (#19-CE34-0003-01), the BioBird project funded by the regional government of Nouvelle-Aquitaine, and the French National program EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière).

**REFERENCES**

- Baeta, R., Faivre, B., Motreuil, S., Gaillard, M., Moreau, J., (2008). Carotenoid trade-off between parasitic resistance and sexual display: an experimental study in the blackbird (*Turdus merula*). *Proc. R. Soc. B.* 275, 427–434. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1383>
- Belden, J.B., Gilliom, R.J., Lydy, M.J., (2007). How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integr. Environ. Assess. Manag.* 3, 364–372. <https://doi.org/10.1002/ieam.5630030307>
- Bellot, P., Brischoux, F., Fritsch, C., Goutte, A., Alliot, F., Rocchi, S., Angelier, F., (2022). Evidence of environmental transfer of tebuconazole to the eggs in the house sparrow (*Passer domesticus*): An experimental study. *Chemosphere* 308, 136469. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136469>
- Boatman, N.D., Brickle, N.W., Hart, J.D., Milsom, T.P., Morris, A.J., Murray, A.W.A., Murray, K.A., Robertson, P.A., (2004). Evidence for the indirect effects of pesticides on farmland birds: Indirect effects of pesticides. *Ibis* 146, 131–143. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2004.00347.x>
- Bro, E., Devillers, J., Millot, F., Decors, A., (2016). Residues of plant protection products in grey partridge eggs in French cereal ecosystems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 9559–9573. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6093-7>
- Bro, E., (2016). *La perdrix grise: biologie, écologie, gestion et conservation*. Biotope éditions, Mèze.
- Brodeur, J.C., Damonte, M.J., Rojas, D.E., Cristos, D., Vargas, C., Poliserpi, M.B., Andriulo, A.E., (2022). Concentration of current-use pesticides in frogs from the Pampa region and correlation of a mixture toxicity index with biological effects. *Env. Res.* 204, 112354. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112354>
- Casida, J.E., (2018). Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: progress and prospects. *Annu. Rev. Entomol.* 63, 125–144. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043042>
- Casida, J.E., (2011). Curious about pesticide action. *J. Agric. Food Chem.* 59, 2762–2769. <https://doi.org/10.1021/jf102111s>
- Casida, J.E., (2009). Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 609–619. <https://doi.org/10.1021/tx8004949>
- Casida, J.E., Bryant, R.J., (2017). The ABCs of pesticide toxicology: amounts, biology, and chemistry. *Toxicol. Res.* 6, 755–763. <https://doi.org/10.1039/c7tx00198c>

- Casida, J.E., Durkin, K.A., (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annu. Rev. Entomol.* 58, 99–117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>
- Cedergreen, N., (2014). Quantifying synergy: a systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS ONE* 9, e96580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>
- Chalvet-Monfray, K., Sabatier, P., Belzunces, L.P., Colin, M.E., Fléché, C., (1996). Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees: modeling approach. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 525–534. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150418>
- Colin, M.-E., Belzunces, L.P., (1992). Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *apis mellifera* L.: a convenient biological approach. *Pestic. Sci.* 36, 115–119. <https://doi.org/10.1002/ps.2780360206>
- Destoumieux-Garzón, D., Mavingui, P., Boetsch, G., Boissier, J., Darriet, F., Duboz, P., Fritsch, C., Giraudoux, P., Le Roux, F., Morand, S., Paillard, C., Pontier, D., Sueur, C., Voituren, Y., (2018). The One Health concept: 10 years old and a long road ahead. *Front. Vet. Sci.* 5, 14. <https://doi.org/10.3389/fvets.2018.00014>
- Driver, C.J., Drown, D.B., Ligojke, M.W., Van Voris, P., McVeety, B.D., Greenspan, B.J., (1991). Routes of uptake and their relative contribution to the toxicologic response of Northern bobwhite (*Colinus virginianus*) to an organophosphate pesticide. *Environ. Toxicol. Chem.* 10, 21–33. <https://doi.org/10.1002/etc.5620100104>
- EFSA (2009). Guidance of EFSA: risk assessment for birds and mammals. *EFSA J.* 2009, 7 p. 358
- EFSA (2012). Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR): Scientific opinion on the science behind the development of a risk assessment of Plant Protection Products on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA J.* 2012; 10(5) 2668, 275 pp.
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J., Morrissey, C.A., (2019). A neonicotinoid insecticide reduces fueling and delays migration in songbirds. *Science* 365, 1177–1180. <https://doi.org/10.1126/science.aaw9419>
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J., Morrissey, C.A., (2017). Imidacloprid and chlorpyrifos insecticides impair migratory ability in a seed-eating songbird. *Sci. Rep.* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15446-x>
- 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., (2016). 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>
- European Commission, 2009. Regulation (EU) No 1107/2009 of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC L 309, 1–50.
- Fair, J., Whitaker, S., Pearson, B., (2007). Sources of variation in haematocrit in birds. *Ibis* 149, 535–552. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2007.00680.x>
- Fitze, P.S., Tschirren, B., Gasparini, J., Richner, H., (2007). Carotenoid-based plumage colors and immune function: is there a trade-off for rare carotenoids? *Am. Nat.* 169, S137–S144. <https://doi.org/10.1086/510094>
- Fox, J., Weisberg, S., Fox, J., (2011). *An R companion to applied regression*, 2<sup>nd</sup> ed SAGE Publications, Thousand Oaks, Calif.
- Fritsch, C., Appenzeller, B., Burkart, L., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Raoul, F., Driget, V., Powolny, T., Gagnaison, C., Rieffel, D., Afonso, E., Goydadin, A.-C., Hardy, E.M., Palazzi, P., Schaeffer, C., Gaba, S., Bretagnolle, V., Bertrand, C., Pelosi, C., (2022). Pervasive exposure of wild small mammals to legacy and currently used pesticide mixtures in arable landscapes. *Sci. Rep.* 12, 15904. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19959-y>
- Gaffard, A., Pays, O., Monceau, K., Teixeira, M., Bretagnolle, V., Moreau, J., (2022). Feeding on grains containing pesticide residues is detrimental to offspring development through parental effects in grey partridge. *Environ. Pollut.* 312, 120005. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120005>
- Gibbons, D., Morrissey, C., Mineau, P., (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 22, 103–118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
- Gilliom, R.J., (2007). Pesticides in U.S. streams and groundwater. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3408–3414. <https://doi.org/10.1021/es072531u>
- Giorio, C., Safer, A., Sánchez-Bayo, F., Tapparo, A., Lentola, A., Girolami, V., van Lexmond, M.B., Bonmatin, J.-M., (2021). An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 1: new molecules, metabolism, fate, and transport. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 11716–11748. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0394-3>
- Gómez-Ramírez, P., Shore, R.F., van den Brink, N.W., van Hattum, B., Bustnes, J.O., Duke, G., Fritsch, C., García-Fernández, A.J., Helander, B.O., Jaspers, V., Krone, O., Martínez-López, E., Mateo, R., Movalli, P., Sonne, C., (2014). An overview of existing raptor

- contaminant monitoring activities in Europe. *Environ. Int.* 67, 12–21. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.004>
- Goutner, V., Skartsi, T., Konstantinou, I.K., Sakellarides, T.M., Albanis, T.A., Vasilakis, D., Elorriaga, J., Poirazidis, K., (2011). Organochlorine residues in blood of cinereous vultures and Eurasian griffon vultures in a northeastern Mediterranean area of nature conservation. *Environ. Monit. Assess.* 183, 259–271. <https://doi.org/10.1007/s10661-011-1919-8>
- Hao, C., Eng, M.L., Sun, F., Morrissey, C.A., (2018). Part-per-trillion LC-MS/MS determination of neonicotinoids in small volumes of songbird plasma. *Sci. Total Environ.* 644, 1080–1087. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.317>
- Heys, K.A., Shore, R.F., Pereira, M.G., Jones, K.C., Martin, F.L., (2016). Risk assessment of environmental mixture effects. *RSC Adv.* 6, 47844–47857. <https://doi.org/10.1039/C6RA05406D>
- Hladik, M.L., Main, A.R., Goulson, D., (2018). Environmental risks and challenges associated with neonicotinoid insecticides. *Environ. Sci. Technol.* 52, 3329–3335. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06388>
- Hladik, M.L., Vandever, M., Smalling, K.L., (2016). Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. *Sci. Total Environ.* 542, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.077>
- Hudson, R.H., Haegele, M.A., Tucker, R.K., (1979). Acute oral and percutaneous toxicity of pesticides to mallards: Correlations with mammalian toxicity data. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 47, 451–460. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(79\)90515-5](https://doi.org/10.1016/0041-008X(79)90515-5)
- Humann-Guillemint, S., Binkowski, \Lukasz J., Jenni, L., Hilke, G., Glauser, G., Helfenstein, F., (2019). A nation-wide survey of neonicotinoid insecticides in agricultural land with implications for agri-environment schemes. *J. Appl. Ecol.* 56, 1502–1514. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.13392>
- Hunt, K.A., Bird, D.M., Mineau, P., Shutt, L., (1992). Selective predation of organophosphate-exposed prey by American kestrels. *Anim. Behav.* 43, 971–976. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(06\)80010-2](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(06)80010-2)
- Hussain, R., Ali, F., Rafique, A., Ghaffar, A., Jabeen, G., Rafay, M., Liaqat, S., Khan, I., Malik, R., Khan, M.K., Niaz, M., Akram, K., Masood, A., (2019). Exposure to sub-acute concentrations of glyphosate induce clinico-hematological, serum biochemical and genotoxic damage in adult cockerels. *Pak. Vet. J.* 39, 181–186. <https://doi.org/10.29261/pakvetj/2019.064>

- Katagi, T., Fujisawa, T., (2021). Acute toxicity and metabolism of pesticides in birds. *J. Pestic. Sci.* 46, 305–321. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D21-028>
- Kienzler, A., Bopp, S.K., van der Linden, S., Berggren, E., Worth, A., (2016). Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 80, 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.05.020>
- Köhler, H.-R., Triebkorn, R., (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science* 341, 759–765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>
- Kortenkamp, A., Backhaus, T., Faust, M., (2009). State of the art report on mixture toxicity. Final report. 070307/2007/485103/ETU/D.1, 391 pp
- Kuijper, D.P.J., Oosterveld, E., Wymenga, E., (2009). Decline and potential recovery of the European grey partridge (*Perdix perdix*) population—a review. *Eur. J Wildl. Res.* 55, 455–463. <http://dx.doi.org/10.1007/s10344-009-0311-2>
- Larras, F., Charles, S., Chaumot, A., Pelosi, C., Le Gall, M., Mamy, L., Beaudouin, R., (2022). A critical review of effect modeling for ecological risk assessment of plant protection products. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 43448–43500. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19111-3>
- Legendre, P., Legendre, L., (1998). Numerical ecology, 2<sup>nd</sup> English ed. Developments in environmental modelling. Elsevier, Amsterdam.
- Lennon, R.J., Shore, R.F., Pereira, M.G., Peach, W.J., Dunn, J.C., Arnold, K.E., Brown, C.D., (2020). High prevalence of the neonicotinoid clothianidin in liver and plasma samples collected from gamebirds during autumn sowing. *Sci. Total Environ.* 742, 140493. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140493>
- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D.J., Green, A., (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 22, 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Ljubojević, D., Pelić, M., Kapetanov, M., (2016). Link between pesticide use and the survival of grey partridge *Perdix perdix*. *Worlds Poult. Sci. J.* 72, 615–618. <https://doi.org/10.1017/S0043933916000404>
- Lopez-Antia, A., Feliu, J., Camarero, P.R., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mateo, R., (2016). Risk assessment of pesticide seed treatment for farmland birds using refined field data. *J. Appl. Ecol.* 53, 1373–1381. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12668>



- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Blas, E.G., Camarero, P.R., Mougeot, F., Mateo, R., (2015b). Adverse effects of thiram-treated seed ingestion on the reproductive performance and the offspring immune function of the red-legged partridge. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1320–1329. <https://doi.org/10.1002/etc.2925>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Camarero, P.R., Mougeot, F., Mateo, R., (2015a). Assessing the risk of fipronil-treated seed ingestion and associated adverse effects in the red-legged partridge. *J. Environ. Sci. Technol.* 49, 13649–13657. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03822>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mateo, R., (2014). Experimental approaches to test pesticide-treated seed avoidance by birds under a simulated diversification of food sources. *Sci. Total Environ.* 496, 179–187. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.07.031>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Camarero, P.R., Mateo, R., (2018). Brood size is reduced by half in birds feeding on flutriafol-treated seeds below the recommended application rate. *Environ. Pollut.* 243, 418–426. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.08.078>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., (2013). Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology* 22, 125–138. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1009-x>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., (2015c). Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environ. Res.* 136, 97–107. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.023>
- Matson, K. D., Horrocks, N. P. C., Versteegh, M. A., & Tieleman, B. I., (2012). Baseline haptoglobin concentrations are repeatable and predictive of certain aspects of a subsequent experimentally-induced inflammatory response. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 162(1), 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.01.010>
- Meled, M., Thrasyvoulou, A., Belzunces, L.P., (1998). Seasonal variations in susceptibility of *Apis mellifera* to the synergistic action of prochloraz and deltamethrin. *Environ. Toxicol. Chem.* 17, 2517–2520. <https://doi.org/10.1002/etc.5620171220>
- Mineau, P., (2011). Barking up the wrong perch: Why we should stop ignoring non dietary routes of pesticide exposure in birds. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 7, 297–299. <https://doi.org/10.1002/ieam.174>

- Mineau, P., Palmer, C., (2013). The impact of the nation's most widely used insecticides on birds. American Bird Conservancy, The Plains, Virginia, USA.
- Mitchell, E.A.D., Mulhauser, B., Mulot, M., Mutabazi, A., Glauser, G., Aebi, A., (2017). A worldwide survey of neonicotinoids in honey. *Science* 358, 109–111. <https://doi.org/10.1126/science.aan3684>
- Mitra, A., Chatterjee, C., Mandal, F.B., (2011). Synthetic chemical pesticides and their effects on birds. *Res. J. Environ. Toxicol.* 5, 81–96. <https://dx.doi.org/10.3923/rjet.2011.81.96>
- Moreau, J., Monceau, K., Crépin, M., Tochon, F.D., Mondet, C., Fraikin, M., Teixeira, M., Bretagnolle, V., (2021). Feeding partridges with organic or conventional grain triggers cascading effects in life-history traits. *Environ. Pollut.* 278, 116851. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116851>
- Moreau, J., Rabdeau, J., Badenhauer, I., Giraudeau, M., Sepp, T., Crépin, M., Gaffard, A., Bretagnolle, V., Monceau, K., (2022). Pesticide impacts on avian species with special reference to farmland birds: a review. *Environ. Monit. Assess.* 194, 790. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10394-0>
- Oksanen, J., (2018). *Vegan: ecological diversity*. R Project, <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/vignettes/diversity-vegan.pdf>
- Oliveira, A. G., Telles, L. F., Hess, R. A., Mahecha, G.A.B., Oliveira, C. A., (2007). Effects of the herbicide Roundup® on the epididymal region of drakes *Anas platyrhynchos*. *Reprod. Toxicol.* 23, 182–191. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2006.11.004>
- Ots, I., Murumägi, A., Hõrak, P., (1998). Haematological health state indices of reproducing Great Tits: methodology and sources of natural variation: Great Tit health state indices. *Funct. Ecol.* 12, 700–707. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1998.00219.x>
- Pacyna-Kuchta, A.D., (2022). What should we know when choosing feather, blood, egg or preen oil as biological samples for contaminants detection? A non-lethal approach to bird sampling for PCBs, OCPs, PBDEs and PFASs. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 1–25. <https://doi.org/10.1080/10643389.2022.2077077>
- Pandey, S.P., Tsutsui, K., Mohanty, B., (2017). Endocrine disrupting pesticides impair the neuroendocrine regulation of reproductive behaviors and secondary sexual characters of red munia (*Amandava amandava*). *Physiol. Behav.* 173, 15–22. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2017.01.030>
- Panizzi, S., Suci, N.A., Trevisan, M., (2017). Combined ecotoxicological risk assessment in the frame of European authorization of pesticides. *Sci. Total Environ.* 580, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.154>

- Peig, J., Green, A.J., (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118, 1883–1891. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x>
- Pelosi, C., Bertrand, C., Daniele, G., Coeurdassier, M., Benoit, P., Nélieu, S., Lafay, F., Bretagnolle, V., Gaba, S., Vulliet, E., Fritsch, C., (2021). Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agric. Ecosyst. Environ.* 305, 107167. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107167>
- Potts, G. R., Aebischer, N. J., (1991). Modelling the population dynamics of the grey partridge: conservation and management. In Perrin, C.M., Lebreton, J.D., Hiron, G.J.M. (Eds.), *Bird Population Studies: The Relevance to Conservation and Management* 373-390. Oxford University Press, Oxford
- Quaglia, G., Joris, I., Broekx, S., Desmet, N., Koopmans, K., Vandaele, K., Seuntjens, P., (2019). A spatial approach to identify priority areas for pesticide pollution mitigation. *J. Environ. Manage.* 246, 583–593. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.120>
- Quaye, I. K., (2008). Haptoglobin inflammation and disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 102(8), 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.04.010>
- Quinn, G.P., Keough, M.J., (2002). *Experimental design and data analysis for biologists*, 1<sup>st</sup> ed. Cambridge University Press. <https://doi.org/10.1017/CBO9780511806384>
- Rabdeau, J., Badenhauer, I., Gaffard, A., Mangelinck, C., Moreau, J., Bretagnolle, V., Monceau, K., (2021). Assortative pairing for boldness and consequences for reproductive success in Montagu's harrier. *Biol. J. Linn. Soc. Lond.* 132, 759–773. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa233>
- Rawi, S.M., Al-Logmani, A.S., Hamza, R.Z., (2019). Neurological alterations induced by formulated imidacloprid toxicity in Japanese quails. *Metab. Brain Dis.* 34, 443–450. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0377-1>
- Reemtsma, T., Alder, L., Banasiak, U., (2013). Emerging pesticide metabolites in groundwater and surface water as determined by the application of a multimethod for 150 pesticide metabolites. *Water Res.* 47, 5535–5545. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2013.06.031>
- Richardson, J.R., Fitsanakis, V., Westerink, R.H.S., Kanthasamy, A.G., (2019). Neurotoxicity of pesticides. *Acta Neuropathol.* 138, 343–362. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02033-9>
- Rivera-Rodríguez, L.B., Rodríguez-Estrella, R., Ellington, J.J., Evans, J.J., (2007). Quantification of low levels of organochlorine pesticides using small volumes ( $\leq 100 \mu\text{l}$ ) of plasma of wild birds through gas chromatography negative chemical ionization mass

- spectrometry. Environ. Pollut. 148, 654–662.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2006.11.018>
- Rizzati, V., Briand, O., Guillou, H., Gamet-Payraastre, L., (2016). Effects of pesticide mixtures in human and animal models: An update of the recent literature. Chem. Biol. Interact. 254, 231–246. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.003>
- Rodrigues, A., Gaffard, A., Moreau, J., Monceau, K., Delhomme, O., Millet, M., (2022). Analytical development for the assessment of pesticide contaminations in blood and plasma of wild birds: the case of grey partridges (*Perdix Perdix*). Submitted in J. Chromatogr. A. <https://doi.org/10.2139/ssrn.4214039>
- Sánchez-Bayo, F., (2011). Impacts of agricultural pesticides on terrestrial ecosystems. In F. Sánchez-Bayo, P.J. van den Brink, & R.M. Mann (Eds.) Ecological Impacts of Toxic Chemicals pp. 63–87). Bentham Science.
- Schell, T., Goedkoop, W., Zubrod, J.P., Feckler, A., Lüderwald, S., Schulz, R., Bundschuh, M., (2018). Assessing the effects of field-relevant pesticide mixtures for their compliance with the concentration addition model – An experimental approach with *Daphnia magna*. Sci.Total Environ. 644, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.334>
- Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) and Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), 2012, Opinion on the Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures, 50 pp
- Shen, L., Wania, F., Lei, Y.D., Teixeira, C., Muir, D.C.G., Bidleman, T.F., (2005). Atmospheric distribution and long-range transport behavior of organochlorine pesticides in North America. Environ. Sci. Technol. 39, 409–420. <https://doi.org/10.1021/es049489c>
- Siddig, A.A.H., Ellison, A.M., Ochs, A., Villar-Leeman, C., Lau, M.K., (2016). How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in Ecological Indicators. Ecol. Indic. 60, 223–230. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.036>
- Silva, V., Mol, H.G.J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C.J., Geissen, V., (2019). Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. Sci. Total Environ. 653, 1532–1545. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441>
- Singer, H., Jaus, S., Hanke, I., Lück, A., Hollender, J., Alder, A.C., (2010). Determination of biocides and pesticides by on-line solid phase extraction coupled with mass spectrometry and their behaviour in wastewater and surface water. Environ. Pollut. 158, 3054–3064. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2010.06.013>

- Singla, S., Sandhu, H., (2015). Alterations in hematological profile of experimentally induced subchronic thiacloprid toxicosis in *Gallus domesticus*. *Toxicol. Int.* 22, 147. <https://doi.org/10.4103/0971-6580.172281>
- Socorro, J., Durand, A., Temime-Roussel, B., Gligorovski, S., Wortham, H., Quivet, E., (2016). The persistence of pesticides in atmospheric particulate phase: An emerging air quality issue. *Sci. Rep.* 6, 33456. <https://doi.org/10.1038/srep33456>
- Sotherton, N.W., Aebischer, N.J., Ewald, J.A., (2014). Research into action: grey partridge conservation as a case study. *J Appl. Ecol.* 51, 1–5. <http://dx.doi.org/10.1111/1365-2664.12162>
- Stanton, R.L., Morrissey, C.A., Clark, R.G., (2018). Analysis of trends and agricultural drivers of farmland bird declines in North America: A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 254, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.11.028>
- Svobodová, J., Gabrielová, B., Synek, P., Marsik, P., Vaněk, T., Albrecht, T., Vinkler, M., (2013). The health signalling of ornamental traits in the Grey Partridge (*Perdix perdix*). *J. Ornithol.* 154, 717–725. <https://doi.org/10.1007/s10336-013-0936-5>
- Taliansky-Chamudis, A., Gómez-Ramírez, P., León-Ortega, M., García-Fernández, A.J., (2017). Validation of a QuEChERS method for analysis of neonicotinoids in small volumes of blood and assessment of exposure in Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) nestlings. *Sci.Total Environ.* 595, 93–100. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.246>
- Tekindal, M.A., Erdoğan, B.D., Yavuz, Y., (2017). Evaluating left-censored data through substitution, parametric, semi-parametric, and nonparametric methods: a simulation study. *Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci.* 9, 153–172. <https://doi.org/10.1007/s12539-015-0132-9>
- Tiyawattanoj, W., Witte, S., Fehr, M., Legler, M., (2021). Monitoring of organochlorine pesticide and polychlorinated biphenyl residues in common swifts (*Apus apus*) in the region of Hannover, Lower Saxony, Germany. *Vet. Sci.* 8, 87. <https://doi.org/10.3390/vetsci8050087>
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2005. Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 45, 247–268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
- Tomizawa, M., Casida, J.E., 2003. Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annu. Rev. Entomol.* 48, 339–364. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112731>

- Verbruggen, E.M.J., Van den Brink, P.J., 2010. Review of recent literature concerning mixture toxicity of pesticides to aquatic organisms. RIVM Report 601400001/2010. National Institute for Public Health and the Environment, Alterra & Wageningen University, 1–36
- Walker, C.H., (2006). Ecotoxicity testing of chemicals with particular reference to pesticides. *Pest. Manag. Sci.* 62, 571–583. <https://doi.org/10.1002/ps.1218>
- Wood, T.J., Goulson, D., (2017). The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 24, 17285–17325. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9240-x>
- Woodruff, T.J., (2011). Bridging epidemiology and model organisms to increase understanding of endocrine disrupting chemicals and human health effects. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 127, 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.007>
- Zaller, J.G., Kruse-Plaß, M., Schleichriemen, U., Gruber, E., Peer, M., Nadeem, I., Formayer, H., Hutter, H.-P., Landler, L., (2022). Pesticides in ambient air, influenced by surrounding land use and weather, pose a potential threat to biodiversity and humans. *Sci. Total Environ.* 838, 156012. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156012>
- Zeid, E.H.A., Alam, R.T., Ali, S.A., Hendawi, M.Y., 2019. Dose-related impacts of imidacloprid oral intoxication on brain and liver of rock pigeon (*Columba livia domestica*), residues analysis in different organs. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 167, 60–68.

## Figures

**Fig. 1 Heatmap of the PPP TUs distribution according to partridges' food treatment.** PPP TUs ranged from 0.000007 to 3.19. Zero was attributed when PPP concentration was < LOD.

**Fig. 2 Variation in haptoglobin (a), AChE activity (b) and haematocrit (c) according to partridges' TU and food treatment (PPP + vs. PPP -).** The two curves correspond to the two different models that have been overlaid for a better graphical reading. The line corresponds to the predicted value and shading represents the 95% confidence interval with red colour for PPP + food treatment and green colour for PPP - food treatment.

**Fig. 3 Variation in haematocrit (a), eye ring redness (b) and activity (c) according to partridges' N<sub>PPP</sub> and food treatment (PPP + vs. PPP -).** The two curves correspond to the two different models that have been overlaid for a better graphical reading. The line corresponds to the predicted value and shading represents the 95% confidence interval with red colour for PPP + food treatment and green colour for PPP - food treatment.

Fig.1

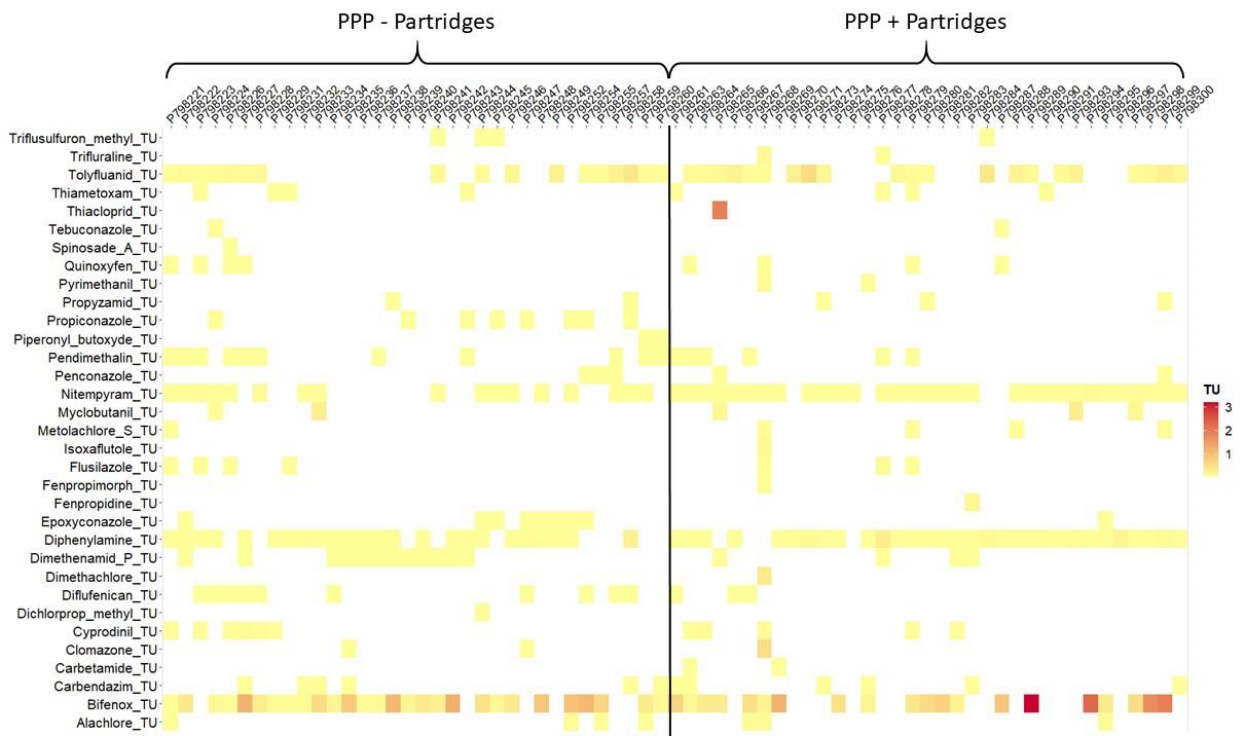




Fig. 2.a

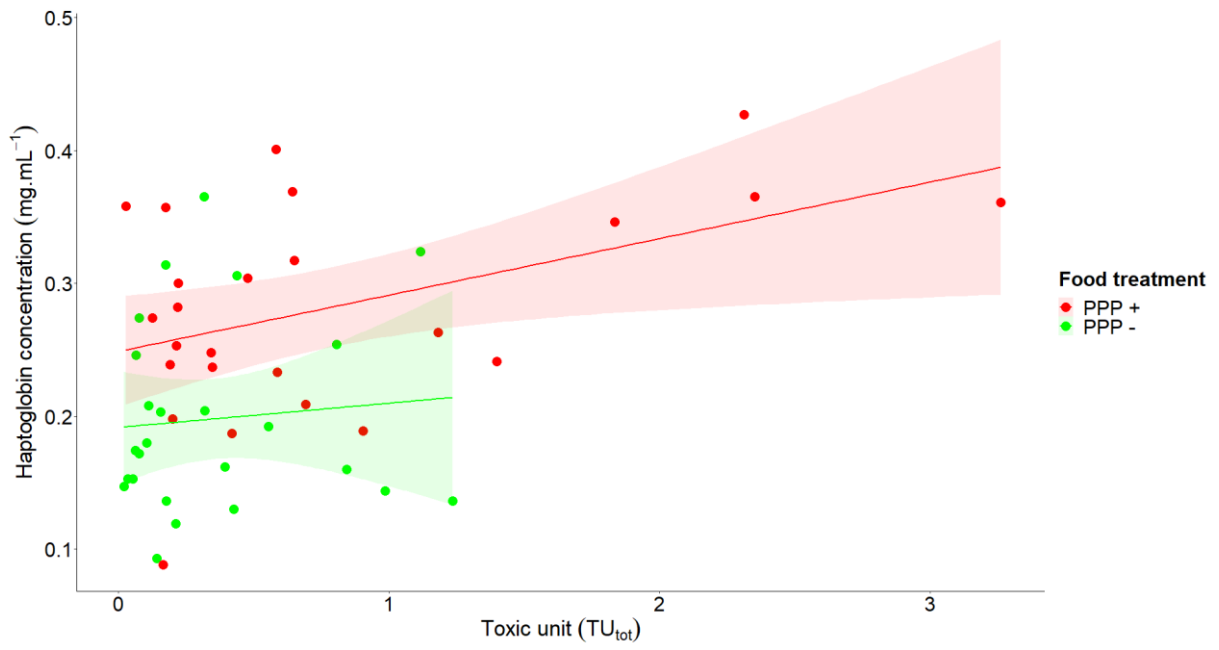


Fig 2.b

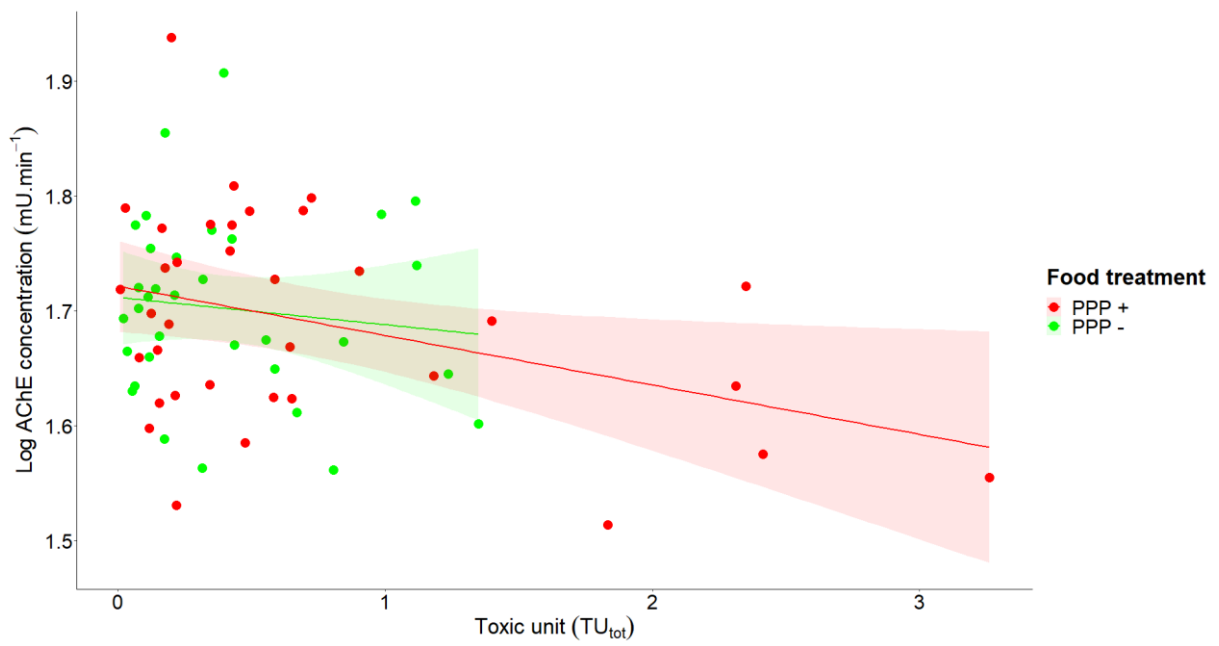


Fig 2.c

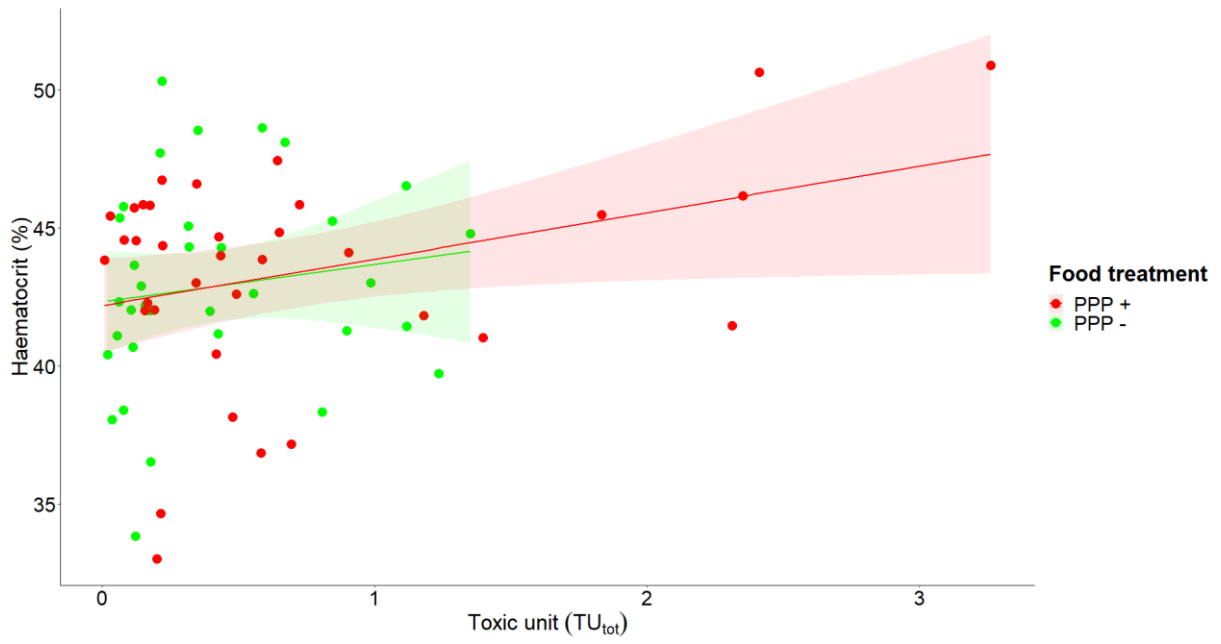


Fig. 3.a

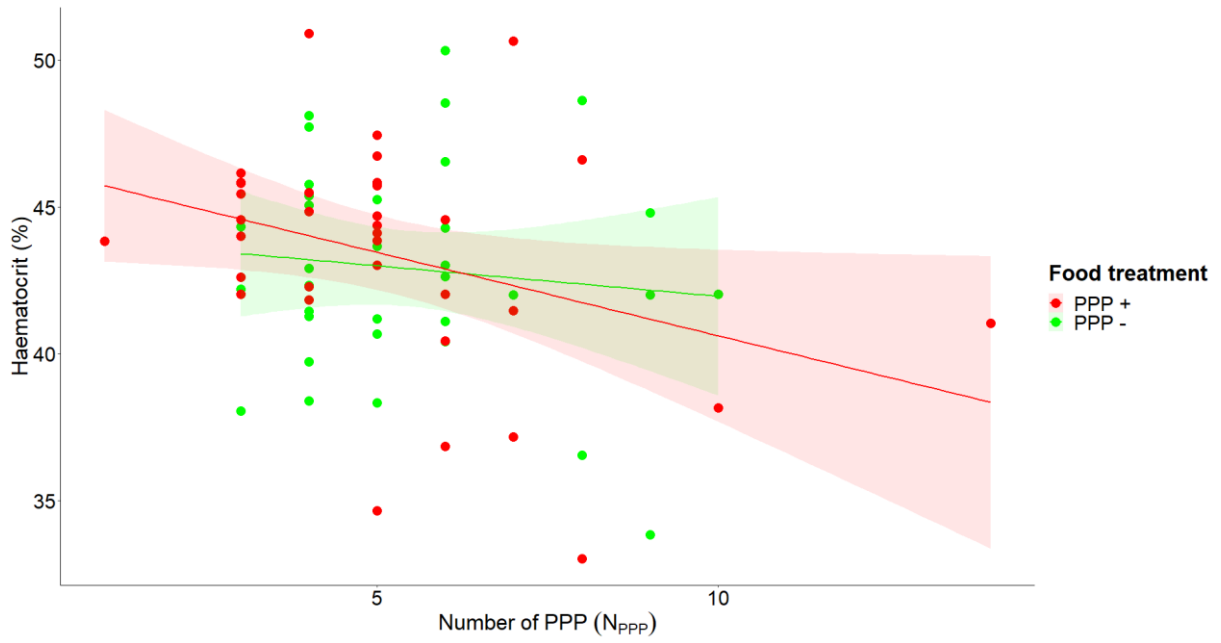


Fig. 3.b

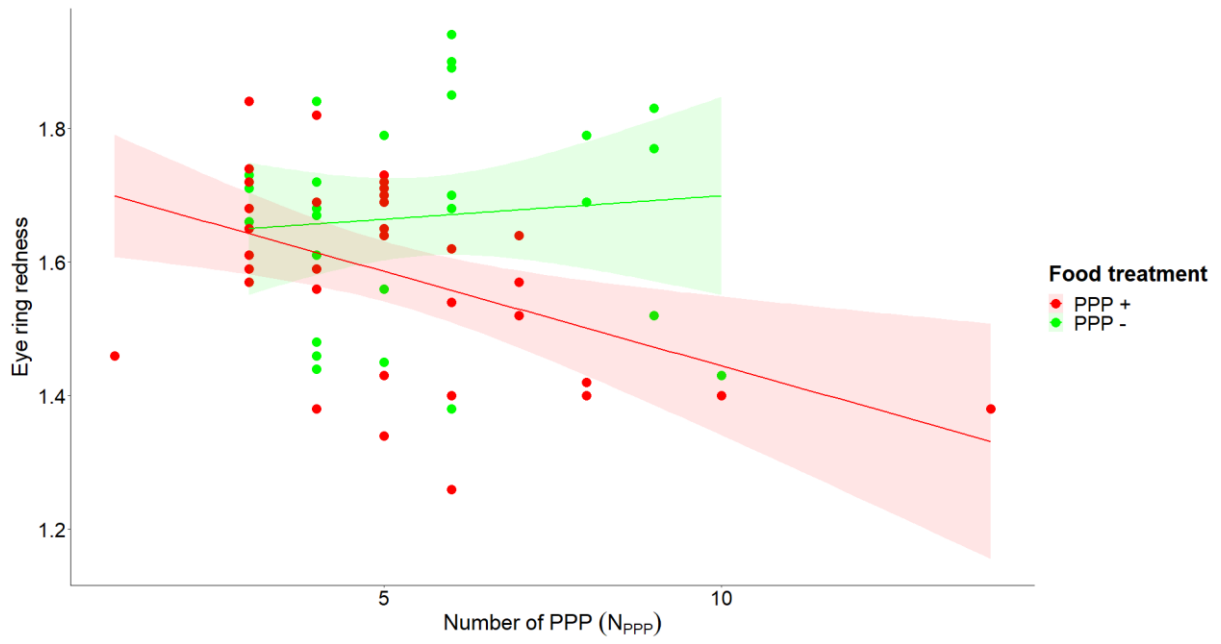
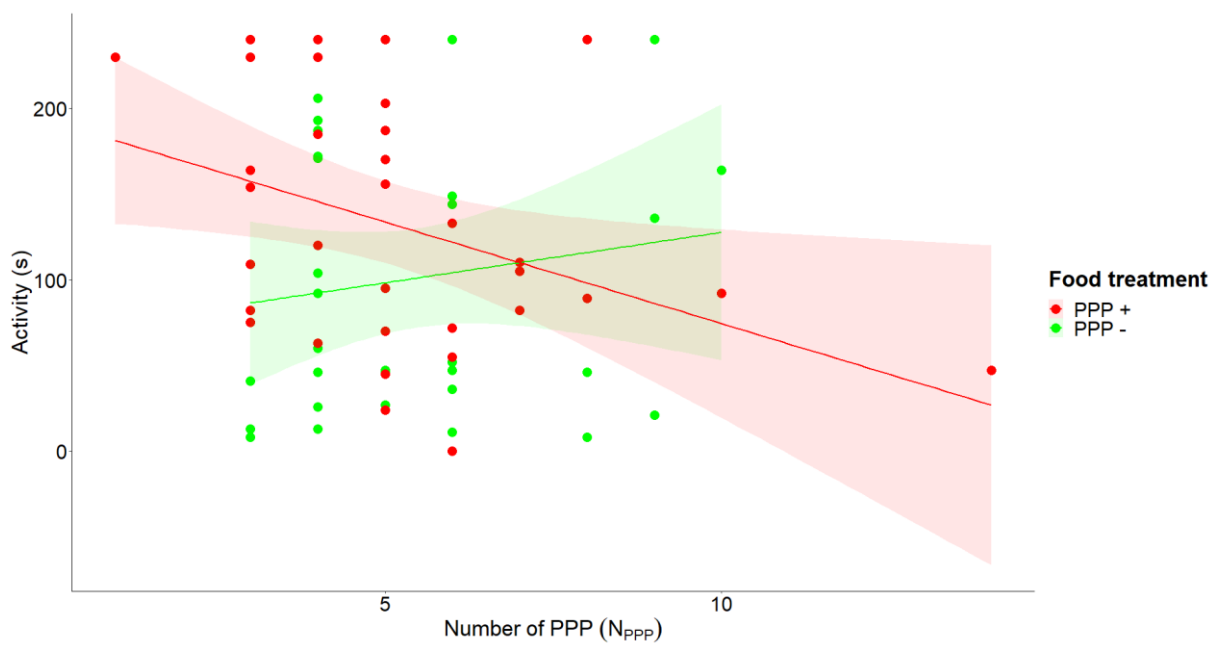


Fig. 3.c



**Table 1** Characteristics of the 33 PPP detected in the 69 partridges blood samples ordered by decreasing numbers of occurrences (> LOD). Lab species for the Bird LD50: *Colinus virginianus*, *Coturnix. c. japonica*, *Anas platyrhynchos*, *Phasianus sp.*, *Serinus canaria*. EC Regulation 1107/2009 status. Farm mean farming use, Dom mean domestic use. \*\*\* not a PPP, may be authorised at national level under different legislation.

| Name                    | Type        | Chemical family      | Use       | EC regulation | Expiration of approval | Bird LD50 (mg.kg <sup>-1</sup> ) | LOD × 10 <sup>-3</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> ) | LOQ × 10 <sup>-3</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> ) | Detected samples | Mode of Action   |
|-------------------------|-------------|----------------------|-----------|---------------|------------------------|----------------------------------|---|---|------------------|--|
| Bifenox                 | Herbicide   | Diphenyl-ether       | Farm      | approved      | -                      | >2000                            | 0.001   | 0.004   | 66               | Inhibition of protoporphyrinogen oxidase                                 |
| Diphenylamine           | Fungicide   | Amine                | Farm      | disapproved   | 2012                   | >2250                            | 0.001   | 0.004   | 56               | Polyene and isoprene biosynthesis inhibitor                              |
| Nitenpyram              | Insecticide | Neonicotinoid        | Dom       | ***           | -                      | >1124                            | 0.009   | 0.03  | 49               | Nicotinic acetylcholine receptor competitive modulators                  |
| Tolylfluanid            | Fungicide   | Sulfonamide          | Farm      | disapproved   | 2007                   | >2000                            | 0.008   | 0.025   | 39               | Multi-site activity with protective action                               |
| Dimethenamid-P          | Herbicide   | Chloroacetamide      | Farm      | approved      | -                      | >1068                            | 0.028   | 0.094   | 17               | Inhibition of cell division  |
| Pendimethalin           | Herbicide   | Dinitroanilin        | Farm      | approved      | -                      | >1421                            | 0.025   | 0.083   | 17               | Inhibition of microtubule assembly                                       |
| Diflufenican            | Herbicide   | Carboxamide          | Farm      | approved      | -                      | >2150                            | 0.003   | 0.01  | 14               | Inhibition of phytoene desaturase  |
| Carbendazim             | Fungicide   | Benzimidazole        | Dom       | disapproved   | 2014                   | >2250                            | 0.004   | 0.014   | 11               | Cytoskeleton and motor protein   |
| Cyprodinil              | Fungicide   | Anilino-pyrimidine   | Farm      | approved      | -                      | >500                             | 0.001   | 0.004   | 11               | Amino acids and protein synthesis  |
| Epoxiconazole           | Fungicide   | Triazole             | Farm      | disapproved   | 2020                   | >2000                            | 0.003   | 0.009   | 10               | Sterol biosynthesis in membranes inhibitor                               |
| Propiconazole           | Fungicide   | Triazole             | Farm      | disapproved   | 2018                   | >2510                            | 0.001   | 0.003   | 9                | Sterol biosynthesis in membranes inhibitor                               |
| Quinoxifen              | Fungicide   | Quinolein            | Farm      | disapproved   | 2019                   | >2250                            | 0.005   | 0.016   | 8                | Signal transduction  |
| Thiametoxam             | Insecticide | Neonicotinoid        | Farm      | disapproved   | 2018                   | >576                             | 0.012   | 0.041   | 8                | Nicotinic acetylcholine receptor competitive modulators                  |
| Alachlor                | Herbicide   | Chloroacetanilide    | Farm      | disapproved   | 2006                   | >1536                            | 0.028   | 0.093   | 7                | Elongase and geranylgeranyl pyrophosphate cyclisation enzymes inhibition |
| Flusilazole             | Fungicide   | Triazole             | Farm      | disapproved   | 2008                   | >1590                            | 0.014   | 0.048   | 7                | Sterol biosynthesis in membranes inhibitor                               |
| Metolachlore-S          | Fungicide   | Chloroacetanilide    | Farm      | approved      | -                      | >2000                            | 0.01  | 0.032   | 5                | Elongase and geranylgeranyl pyrophosphate cyclisation enzymes inhibition |
| Myclobutanil            | Fungicide   | Triazole             | Farm, Dom | disapproved   | 2021                   | >510                             | 0.021   | 0.071   | 5                | Sterol biosynthesis in membranes inhibitor                               |
| Penconazole             | Fungicide   | Triazole             | Farm      | approved      | -                      | >1590                            | 0.001   | 0.003   | 5                | Sterol biosynthesis in membranes inhibitor                               |
| Propyzamid              | Herbicide   | Benzonitrile         | Farm      | approved      | -                      | >6578                            | 0.002   | 0.007   | 5                | Inhibition of microtubule assembly                                       |
| Triflurosulfuron-methyl | Herbicide   | Sulfonylurea         | Farm      | approved      | -                      | >2250                            | 0.001   | 0.004   | 4                | Inhibition of acetolactate synthase                                      |
| Clomazone               | Herbicide   | Isoxazolidinone      | Farm      | approved      | -                      | >2224                            | 0.012   | 0.04  | 3                | Inhibition of deoxy-d-xyulose phosphate synthase                         |
| Carbetamide             | Herbicide   | Carbamates           | Farm, Dom | disapproved   | 2021                   | >2000                            | 0.005   | 0.018   | 2                | Inhibition of microtubule organization                                   |
| Piperonyl butoxide      | Insecticide | Benzodioxol          | Farm, Dom | ***           | -                      | >2250                            | 0   | 0.001   | 2                | Cytochrome P450s inhibitor   |
| Pyrimethanil            | Fungicide   | Pyridine             | Farm      | approved      | -                      | >2000                            | 0.15  | 0.5   | 2                | Amino acids and protein synthesis  |
| Tebuconazole            | Fungicide   | Triazole             | Farm      | approved      | -                      | >1988                            | 0.001   | 0.005   | 2                | Sterol biosynthesis in membranes inhibitor                               |
| Trifluralin             | Herbicide   | Dinitroaniline       | Farm      | disapproved   | 2010                   | >2250                            | 0.008   | 0.028   | 2                | Inhibition of microtubule assembly and cell division inhibitor           |
| Dichlorprop-methyl      | Herbicide   | Phenoxy-carboxylates | Farm      | approved      | -                      | > 4640                           | 0.018   | 0.061   | 1                | Active auxin synthetic promoter  |

*Chapitre III*

|               |             |                   |              |             |      |       |       |       |   |  |
|---------------|-------------|-------------------|--------------|-------------|------|-------|-------|-------|---|--|
| Dimethachlore | Herbicide   | Chloroacetanilide | Farm         | approved    | -    | > 524 | 0.028 | 0.094 | 1 | Elongase and geranylgeranyl pyrophosphate cyclisation enzymes inhibition |
| Fenpropidine  | Fungicide   | Piperidin         | Farm         | approved    | -    | >1899 | 0.008 | 0.025 | 1 | Sterol biosynthesis in membranes inhibitor                               |
| Fenpropimorph | Fungicide   | Morpholin         | Farm         | disapproved | 2019 | >2000 | 0.003 | 0.009 | 1 | Sterol biosynthesis in membranes inhibitor                               |
| Isoxaflutole  | Herbicide   | Isoxazole         | Farm         | approved    | -    | >2150 | 0.038 | 0.128 | 1 | Inhibition of hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase                         |
| Spinosade-A   | Insecticide | Macrolid          | Farm,<br>Dom | approved    | -    | >1333 | 0     | 0.001 | 1 | Nicotinic acetylcholine receptor competitive modulators                  |
| Thiacloprid   | Insecticide | Neonicotinoid     | Farm         | disapproved | 2018 | >35   | 0.001 | 0.005 | 1 | Nicotinic acetylcholine receptor competitive modulators                  |

**Table 2** Number of quantified samples, concentration mean ( $\pm$  se), median [1<sup>st</sup> quartile; 3<sup>rd</sup> quartile] minimum and maximum of the 33 PPP detected in the 69 partridges blood sampling according to food treatment (i.e., PPP+ or PPP-). For PPP+, n = 35, for PPP-, n = 34. Chi-squared tests (or Fisher exact tests when the number of detected samples < 5 in one food treatment) were used. Wilcoxon tests were used for all PPPs where the number of detected samples was higher than 5. Significant effects are in bold.

| Food treatment Name   | Number of detected samples (>LOD) |      | $\chi^2$ or Fisher exact test | Mean concentration $\pm$ se $\times 10^{-3}$ mg.kg <sup>-1</sup> (>LOQ) |                       | Wilcoxon test         | Median concentration $\times 10^{-3}$ mg.kg <sup>-1</sup> [1 <sup>st</sup> quartile; 3 <sup>rd</sup> quartile] |                         | Concentration min $\times 10^{-3}$ mg.kg <sup>-1</sup> |         | Concentration max $\times 10^{-3}$ mg.kg <sup>-1</sup> |         |
|-----------------------|-----------------------------------|------|-------------------------------|---|-----------------------|-----------------------|--|-------------------------|--|---------|--|---------|
|                       | PPP-                              | PPP+ |                               | PPP-  | PPP+                  |                       | PPP-   | PPP+                    | PPP-   | PPP+    | PPP-   | PPP+    |
| Diphenylamine         | 25                                | 31   | NS                            | 33.35 $\pm$ 83.41   | 64.25 $\pm$ 122.59    | NS                    | 12.58 [6.83 ;21.18]  | 19.46 [11.33 ;42.32]    | 1.80   | 4.69    | 418.33   | 588.48  |
| Nitempyram            | 18                                | 31   | $\chi^2=13.24$<br>$P < 0.01$  | 17.91 $\pm$ 16.17   | 16.31 $\pm$ 8.60      | NS                    | 8.73 [7.94 ;19.78]   | 15.38 [11.70 ;20.11]    | 3.46   | 3.84    | 54.70  | 45.02   |
| Bifenox               | 28                                | 20   | NS                            | 818.21 $\pm$ 805.61   | 1644.36 $\pm$ 1675.26 | W = 172<br>$P = 0.02$ | 547.23 [167.13;1351.66]  | 982.02 [555.69;1916.26] | 34.38  | 262.66  | 2450.90  | 6382.18 |
| Tolylfluanid          | 18                                | 21   | NS                            | 167.92 $\pm$ 177.77   | 252.27 $\pm$ 254.74   | NS                    | 102.20 [57.30 ;177.21]   | 180.75 [71.91 ;355.59]  | 15.76  | 36.92   | 689.25   | 1093.12 |
| Pendimethalin         | 11                                | 6    | NS                            | 3.14 $\pm$ 3.03   | 3.50 $\pm$ 1.57       | NS                    | 1.59 [0.39 ;5.89]  | 3.24 [2.47 ;3.66]       | 0.14   | 2.10    | 8.27   | 6.43    |
| Dimethenamid-P        | 12                                | 4    | NS                            | 0.19 $\pm$ 0.15   | 0.03 $\pm$ 0.02       | W = 41<br>$P = 0.04$  | 0.18 [0.05 ;0.28]  | 0.03 [0.01 ;0.04]       | 0.01   | 0.01    | 0.47   | 0.05    |
| Diflufenican          | 11                                | 3    | NS                            | 0.50 $\pm$ 0.75   | 0.23 $\pm$ 0.17       | NS                    | 0.25 [0.09 ;0.52]  | 0.32 [0.18 ;0.33]       | 0.06   | 0.03    | 2.53   | 0.34    |
| Carbendazim           | 6                                 | 5    | NS                            | 0.92 $\pm$ 0.97   | 0.27 $\pm$ 0.23       | NS                    | 0.39 [0.25 ;1.64]  | 0.16 [0.14 ;0.28]       | 0.18   | 0.11    | 2.27   | 0.68    |
| Cyprodinil            | 6                                 | 5    | NS                            | 14.37 $\pm$ 10.28   | 17.04 $\pm$ 12.36     | NS                    | 12.03 [8.66 ;17.73]  | 13.58 [6.31 ;26.49]     | 2.80   | 5.57    | 32.16  | 33.27   |
| Epoxyconazole         | 9                                 | 1    | $P = 0.02$                    | 0.33 $\pm$ 0.31   | -                     | NS                    | 0.27 [0.11 ;0.38]  | -                       | 0.08   | 0.13    | 1.03   | 0.13    |
| Propiconazole         | 9                                 | 0    | $P < 0.01$                    | 0.11 $\pm$ 0.08   | -                     | NS                    | 0.09 [0.07 ;0.10]  | -                       | 0.03   | <LOD    | 0.29   | <LOD    |
| Quinoxifen            | 4                                 | 4    | NS                            | 4.21 $\pm$ 2.75   | 3.83 $\pm$ 1.63       | -                     | 2.98 [2.72 ;4.47]  | 3.80 [2.61 ;5.02]       | 2.54   | 2.15    | 8.31   | 5.55    |
| Thiametoxam           | 4                                 | 4    | NS                            | 3.90 $\pm$ 3.86   | 2.76 $\pm$ 1.06       | -                     | 2.15 [1.93 ;4.12]  | 2.93 [2.35 ;3.34]       | 1.61   | 1.34    | 9.67   | 3.85    |
| Alachlor              | 4                                 | 3    | NS                            | 33.37 $\pm$ 12.02   | 68.35 $\pm$ 3.82      | -                     | 29.26 [26.62 ;36.01]   | 67.37 [66.24 ;69.96]    | 24.08  | 65.11   | 50.88  | 72.56   |
| Flusilazole           | 4                                 | 3    | NS                            | 3.49 $\pm$ 2.86   | 33.70 $\pm$ 48.25     | -                     | 2.73 [2.00 ;4.22]  | 7.43 [5.85 ;48.40]      | 0.93   | 4.28    | 7.55   | 89.38   |
| Penconazole           | 3                                 | 2    | NS                            | 0.38 $\pm$ 0.09   | 0.39 $\pm$ 0.12       | -                     | 0.38 [0.33 ;0.43]  | 0.39 [0.35;0.43]        | 0.29   | 0.30    | 0.47   | 0.48    |
| Myclobutanil          | 2                                 | 3    | NS                            | 67.85 $\pm$ 69.83   | 68.58 $\pm$ 40.62     | -                     | 67.85 [43.16 ;92.53]   | 47.91 [45.18 ;81.64]    | 18.47  | 42.45   | 117.22   | 115.37  |
| Propyzamid            | 2                                 | 3    | NS                            | 187.27 $\pm$ 172.94   | 78.43 $\pm$ 47.01     | -                     | 187.27 [126.13 ;248.41]  | 89.48 [58.18 ;104.20]   | 64.99  | 26.88   | 309.56   | 118.93  |
| Metolachlore-S        | 1                                 | 4    | NS                            | -   | 42.61 $\pm$ 23.27     | -                     | -  | 42.84 [25.52 ;59.92]    | 7.30   | 18.04   | 7.30   | 66.71   |
| Triflusulfuron-methyl | 3                                 | 1    | -                             | 0.21 $\pm$ 0.07   | -                     | -                     | 0.17 [0.16 ;0.23]  | -                       | 0.16   | 0.27    | 0.29   | 0.27    |
| Clomazone             | 2                                 | 1    | -                             | 25.30 $\pm$ 23.53   | -                     | -                     | 25.30 [16.98 ;33.62]   | -                       | 8.67   | 1125.73 | 41.94  | 1125.73 |
| Piperonyl butoxyde    | 2                                 | 0    | -                             | 8.53 $\pm$ 2.17   | <LOD                  | -                     | 8.53 [7.76 ;9.29]  | <LOD                    | 6.99   | <LOD    | 10.06  | <LOD    |
| Tebuconazole          | 1                                 | 1    | -                             | -   | -                     | -                     | -  | -                       | 1.43   | 1.32    | 1.43   | 1.32    |
| Carbetamide           | 0                                 | 2    | -                             | <LOD  | 0.28 $\pm$ 0.20       | -                     | <LOD   | 0.28 [0.21 ;0.35]       | <LOD   | 0.14    | <LOD   | 0.42    |
| Pyrimethanil          | 0                                 | 2    | -                             | <LOD  | 38.91 $\pm$ 49.43     | -                     | <LOD   | 38.91 [21.43 ;56.38]    | <LOD   | 3.96    | <LOD   | 73.86   |
| Trifluraline          | 0                                 | 2    | -                             | <LOD  | 114.46 $\pm$ 119.83   | -                     | <LOD   | 114.46                  | <LOD   | 29.73   | <LOD   | 199.20  |

Chapitre III

|                       |   |   |   |      |      |   |      |      |        |        |        |        |
|-----------------------|---|---|---|------|------|---|------|------|--------|--------|--------|--------|
| Dichloprop-<br>methyl | 1 | 0 | - | -    | <LOD | - | -    | <LOD | 230.84 | <LOD   | 230.84 | <LOD   |
| Spinosade-A           | 1 | 0 | - | -    | <LOD | - | -    | <LOD | 2.63   | <LOD   | 2.63   | <LOD   |
| Dimethachlore         | 0 | 1 | - | <LOD | -    | - | <LOD | -    | <LOD   | 159.13 | <LOD   | 159.13 |
| Fenpropidine          | 0 | 1 | - | <LOD | -    | - | <LOD | -    | <LOD   | 201.24 | <LOD   | 201.24 |
| Fenpropimorph         | 0 | 1 | - | <LOD | -    | - | <LOD | -    | <LOD   | <LOQ   | <LOD   | <LOQ   |
| Isoxaflutole          | 0 | 1 | - | <LOD | -    | - | <LOD | -    | <LOD   | 177.17 | <LOD   | 177.17 |
| Thiacloprid           | 0 | 1 | - | <LOD | -    | - | <LOD | -    | <LOD   | 67.58  | <LOD   | 67.58  |

**Table 3.a Effects of TU<sub>tot</sub> on partridges' health parameters determined using MLR.**  $\beta \pm$  SE were extracted from minimal models including only significant factors. Significant effects are in bold. BC mean body condition.

| Response variables                        | PPP +                  |   |                                      | PPP -                  |  |                                    |
|---|------------------------|---|--------------------------------------|------------------------|--|------------------------------------|
|   | Fixed factors          | F ratio test  | $\beta \pm$ SE                       | Fixed factors          | F ratio test                                 | $\beta \pm$ SE                     |
| BC (g)                                    |                        |   | Intercept = 379.80<br>$\pm$ 6.52     |                        |  | Intercept = 370.95<br>$\pm$ 7.47   |
|   | TU <sub>tot</sub>      | F <sub>1,33</sub> = 0.86,<br><i>P</i> = 0.0.36                |                                      | TU <sub>tot</sub>      | F <sub>1,32</sub> = 0.35,<br><i>P</i> = 0.56 |                                    |
| Haematocrit (%)                           |                        |   | Intercept = 46.10 $\pm$ 10.86        |                        |  | Intercept = 56.71 $\pm$ 12.39      |
|   | TU <sub>tot</sub>      | <b>F<sub>1,31</sub> = 4.28,</b><br><b><i>P</i> = 0.04</b>     | <b>-8.21 <math>\pm</math> 12.95</b>  | TU <sub>tot</sub>      | F <sub>1,30</sub> = 0.86,<br><i>P</i> = 0.36 |                                    |
|   | BC                     | F <sub>1,31</sub> = 0.01,<br><i>P</i> = 0.90                  |                                      | BC                     | F <sub>1,30</sub> = 0.93,<br><i>P</i> = 0.34 |                                    |
|   | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,31</sub> = 0.59,<br><i>P</i> = 0.45                  |                                      | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,30</sub> = 0.49,<br><i>P</i> = 0.49 |                                    |
| Log AChE activity (mU.min <sup>-1</sup> ) |                        |   | Intercept = 1.41 $\pm$ 0.25          |                        |  | Intercept = 1.52 $\pm$ 0.27        |
|   | TU <sub>tot</sub>      | <b>F<sub>1,31</sub> = 4.33,</b><br><b><i>P</i> = 0.04</b>     | <b>0.06 <math>\pm</math> 0.29</b>    | TU <sub>tot</sub>      | F <sub>1,29</sub> = 0.35,<br><i>P</i> = 0.56 |                                    |
|   | BC                     | F <sub>1,31</sub> = 1.75,<br><i>P</i> = 0.19                  |                                      | BC                     | F <sub>1,29</sub> = 0.12,<br><i>P</i> = 0.72 |                                    |
|   | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,31</sub> = 0.11,<br><i>P</i> = 0.73                  |                                      | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,29</sub> = 1.68,<br><i>P</i> = 0.20 |                                    |
| Haptoglobin (mg.mL <sup>-1</sup> )        |                        |   | Intercept = 0.67 $\pm$ 0.21          |                        |  | Intercept = 0.03 $\pm$ 0.27        |
|   | TU <sub>tot</sub>      | <b>F<sub>1,21</sub> = 4.53,</b><br><b><i>P</i> = 0.04</b>     | <b>0.37 <math>\pm</math> 0.34</b>    | TU <sub>tot</sub>      | F <sub>1,21</sub> = 0.11,<br><i>P</i> = 0.73 |                                    |
|   | BC                     | <b>F<sub>1,21</sub> = 13.82,</b><br><b><i>P</i> &lt; 0.01</b> | <b>-0.001 <math>\pm</math> 0.05</b>  | BC                     | F <sub>1,21</sub> = 2.11,<br><i>P</i> = 0.16 |                                    |
|   | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,21</sub> = 0.86,<br><i>P</i> = 0.32                  |                                      | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,21</sub> = 0.27,<br><i>P</i> = 0.61 |                                    |
| Eye ring redness                          |                        |   | Intercept = 2.26 $\pm$ 0.39          |                        |  | Intercept = 2.04 $\pm$ 0.53        |
|   | TU <sub>tot</sub>      | F <sub>1,31</sub> = 0.26,<br><i>P</i> = 0.0.61                |                                      | TU <sub>tot</sub>      | F <sub>1,27</sub> = 1.26,<br><i>P</i> = 0.27 |                                    |
|   | BC                     | <b>F<sub>1,31</sub> = 7.12,</b><br><b><i>P</i> = 0.01</b>     | <b>-0.001 <math>\pm</math> 0.001</b> | BC                     | F <sub>1,27</sub> = 3.37,<br><i>P</i> = 0.08 |                                    |
|   | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,31</sub> = 0.32,<br><i>P</i> = 0.57                  |                                      | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,27</sub> = 0.53,<br><i>P</i> = 0.47 |                                    |
| Activity (s)                              |                        |   | Intercept = 168.31<br>$\pm$ 216.97   |                        |  | Intercept = 440.82<br>$\pm$ 288.30 |
|   | TU <sub>tot</sub>      | F <sub>1,31</sub> = 0.15,<br><i>P</i> = 0.70                  |                                      | TU <sub>tot</sub>      | F <sub>1,29</sub> = 1.11,<br><i>P</i> = 0.30 |                                    |
|   | BC                     | F <sub>1,31</sub> = 0.67,<br><i>P</i> = 0.41                  |                                      | BC                     | F <sub>1,29</sub> = 1.82,<br><i>P</i> = 0.19 |                                    |
|   | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,31</sub> = 0.60,<br><i>P</i> = 0.44                  |                                      | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,27</sub> = 0.22,<br><i>P</i> = 0.64 |                                    |
| Flight initiation distance (m)            |                        |   | Intercept = 88.11 $\pm$ 30.63        |                        |  | Intercept = 167.18<br>$\pm$ 55.84  |
|   | TU <sub>tot</sub>      | F <sub>1,31</sub> = 2.44,<br><i>P</i> = 0.12                  |                                      | TU <sub>tot</sub>      | F <sub>1,29</sub> = 0.01,<br><i>P</i> = 0.99 |                                    |
|   | BC                     | F <sub>1,31</sub> = 1.05,<br><i>P</i> = 0.31                  |                                      | BC                     | F <sub>1,29</sub> = 1.66,<br><i>P</i> = 0.21 |                                    |
|   | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,31</sub> = 0.69,<br><i>P</i> = 0.41                  |                                      | TU <sub>tot</sub> x BC | F <sub>1,29</sub> = 3.15,<br><i>P</i> = 0.09 |                                    |



**Table 3.b Effects of N<sub>PPP</sub> on partridges' health parameters determined using MLR.  $\beta \pm$  SE were extracted from minimal models including only significant factors. Significant effects are in bold. BC mean body condition.**

| Response variables                    | PPP +                  |  |                                      | PPP -                  |                                       |                                    |
|---------------------------------------|------------------------|--|--------------------------------------|------------------------|---------------------------------------|------------------------------------|
|                                       | Fixed factors          | F ratio test   | $\beta \pm$ SE                       | Fixed factors          | F ratio test                          | $\beta \pm$ SE                     |
| BC (g)                                |                        |  | Intercept =<br>369.10 $\pm$ 11.85    |                        |                                       | Intercept =<br>361.53 $\pm$ 15.61  |
|                                       | N <sub>PPP</sub>       | F <sub>1,33</sub> = 0.29,<br>P = 0.59                  |                                      | N <sub>PPP</sub>       | F <sub>1,32</sub> = 0.73,<br>P = 0.39 |                                    |
| Haematocrit (%)                       |                        |  | Intercept =<br>87.53 $\pm$ 25.48     |                        |                                       | Intercept =<br>31.56 $\pm$ 29.17   |
|                                       | N <sub>PPP</sub>       | <b>F<sub>1,31</sub> = 4.59,</b><br><b>P = 0.04</b>     | <b>-8.55 <math>\pm</math> 4.69</b>   | N <sub>PPP</sub>       | F <sub>1,30</sub> = 0.23,<br>P = 0.63 |                                    |
|                                       | BC                     | F <sub>1,31</sub> = 0.01,<br>P = 0.98                  |                                      | BC                     | F <sub>1,30</sub> = 0.61,<br>P = 0.44 |                                    |
|                                       | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,31</sub> = 2.90,<br>P = 0.10                  |                                      | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,30</sub> = 0.45,<br>P = 0.51 |                                    |
| AChE activity (mU.min <sup>-1</sup> ) |                        |  | Intercept =<br>116.65 $\pm$ 74.34    |                        |                                       | Intercept =<br>34.54 $\pm$ 78.30   |
|                                       | N <sub>PPP</sub>       | F <sub>1,31</sub> = 0.13,<br>P = 0.72                  |                                      | N <sub>PPP</sub>       | F <sub>1,29</sub> = 1.66,<br>P = 0.21 |                                    |
|                                       | BC                     | F <sub>1,31</sub> = 2.72,<br>P = 0.11                  |                                      | BC                     | F <sub>1,29</sub> = 0.29,<br>P = 0.59 |                                    |
|                                       | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,31</sub> = 2.21,<br>P = 0.15                  |                                      | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,29</sub> = 1.48,<br>P = 0.23 |                                    |
| Haptoglobin (mg.mL <sup>-1</sup> )    |                        |  | Intercept =<br>0.97 $\pm$ 0.51       |                        |                                       | Intercept =<br>0.65 $\pm$ 0.67     |
|                                       | N <sub>PPP</sub>       | F <sub>1,21</sub> = 0.30,<br>P = 0.59                  |                                      | N <sub>PPP</sub>       | F <sub>1,21</sub> = 0.01,<br>P = 0.98 |                                    |
|                                       | <b>BC</b>              | <b>F<sub>1,21</sub> = 13.84,</b><br><b>P &lt; 0.01</b> | <b>0.001 <math>\pm</math> 0.013</b>  | BC                     | F <sub>1,21</sub> = 2.29,<br>P = 0.14 |                                    |
|                                       | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,21</sub> = 0.01,<br>P = 0.92                  |                                      | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,21</sub> = 1.27,<br>P = 0.27 |                                    |
| Eye ring redness                      |                        |  | Intercept =<br>3.94 $\pm$ 0.79       |                        |                                       | Intercept =<br>1.15 $\pm$ 1.26     |
|                                       | N <sub>PPP</sub>       | <b>F<sub>1,31</sub> = 9.89,</b><br><b>P &lt; 0.01</b>  | <b>-0.31 <math>\pm</math> 0.14</b>   | N <sub>PPP</sub>       | F <sub>1,27</sub> = 0.46,<br>P = 0.51 |                                    |
|                                       | <b>BC</b>              | <b>F<sub>1,31</sub> = 9.02,</b><br><b>P &lt; 0.01</b>  | <b>-0.005 <math>\pm</math> 0.002</b> | BC                     | F <sub>1,27</sub> = 2.97,<br>P = 0.09 |                                    |
|                                       | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,31</sub> = 3.75,<br>P = 0.06                  |                                      | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,27</sub> = 0.82,<br>P = 0.37 |                                    |
| Activity (s)                          |                        |  | Intercept =<br>467.33 $\pm$ 494.20   |                        |                                       | Intercept =<br>548.91 $\pm$ 634.55 |
|                                       | N <sub>PPP</sub>       | <b>F<sub>1,31</sub> = 5.03,</b><br><b>P = 0.03</b>     | <b>-42.32 <math>\pm</math> 91.11</b> | N <sub>PPP</sub>       | F <sub>1,29</sub> = 0.97,<br>P = 0.33 |                                    |
|                                       | BC                     | F <sub>1,31</sub> = 0.54,<br>P = 0.47                  |                                      | BC                     | F <sub>1,29</sub> = 1.96,<br>P = 0.17 |                                    |
|                                       | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,31</sub> = 0.11,<br>P = 0.73                  |                                      | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,29</sub> = 0.13,<br>P = 0.72 |                                    |
| Flight initiation distance (m)        |                        |  | Intercept =<br>59.18 $\pm$ 76.76     |                        |                                       | Intercept =<br>111.06 $\pm$ 128.75 |
|                                       | N <sub>PPP</sub>       | F <sub>1,31</sub> = 1.10,<br>P = 0.30                  |                                      | N <sub>PPP</sub>       | F <sub>1,29</sub> = 0.06,<br>P = 0.80 |                                    |
|                                       | BC                     | F <sub>1,31</sub> = 0.44,<br>P = 0.51                  |                                      | BC                     | F <sub>1,29</sub> = 1.57,<br>P = 0.22 |                                    |
|                                       | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,31</sub> = 0.01,<br>P = 0.92                  |                                      | NC <sub>PPP</sub> x BC | F <sub>1,29</sub> = 0.02,<br>P = 0.87 |                                    |

# Chapitre IV

## **Biomonitoring of GPS-tracked Grey Partridges in a French agroecosystem: home ranges, multiple pesticides residues in blood and health status**

En préparation pour *Agriculture, Ecosystems & Environment*



©Agathe Gaffard

©Guillaume Calonego

## Avant-propos et résumé du Chapitre IV

Aujourd'hui, plus de 500 molécules actives de produits phytopharmaceutiques (PPP) aux modes d'action variés sont utilisées dans le monde, une tendance qui ne devrait pas s'inverser avec le changement climatique et la croissance de la population humaine. L'agriculture intensive est responsable de la production et de la libération de ces composés dans les différents compartiments de l'environnement. Globalement, nos connaissances concernant la contamination réelle des PPP et de leurs métabolites dans les écosystèmes, ainsi que leurs effets sur la faune non ciblée, sont extrêmement limités. Malgré un nombre croissant de recherches montrant que les PPP sont des moteurs importants du déclin des oiseaux spécialistes des terres agricoles, les processus à l'origine de cette diminution ne sont toujours pas formellement identifiés. Une étape critique consiste à caractériser l'exposition et la contamination des oiseaux sauvages à ces composés et à quantifier les effets sur leurs traits d'histoire de vie. Ainsi, l'utilisation d'espèces bio-sentinelles pour surveiller les niveaux de PPP dans les agroécosystèmes s'est développée au cours des dernières décennies, fournissant un aperçu de la contamination ubiquitaire de la faune par les PPP. Cependant, très peu d'études ont corrélié cette contamination aux traits d'histoire de vie des individus, ce qui souligne la nécessité de poursuivre les recherches et les données sur cette question d'actualité. Dans ce chapitre prospectif, nous cherchons à savoir s'il est possible de corréler l'exposition aux PPP, la contamination et les traits d'histoire de vie de perdrix grises sauvages vivant sur une plateforme de recherche socio-écologique à long terme, la Zone Atelier Plaine et Val de Sèvre (LTSER ZAPVS). Pour cela, 54 perdrix grises ont été capturées dans la zone d'étude, équipées de GPS et relâchées après que des mesures morphologiques, un test de comportement et une prise de sang aient été réalisés. Une partie du sang prélevé a été utilisée pour quantifier la contamination des oiseaux par les PPP et l'autre partie pour doser les concentrations de caroténoïdes et d'haptoglobine dans le plasma. Un test de comportement a permis d'estimer la distance de fuite des perdrix. Une fois relâchées, les perdrix ont été suivies par GPS afin d'estimer la taille de leur domaine vital 28 jours après la capture. Pour chaque perdrix, le pourcentage de surfaces conventionnelles à l'intérieur de son domaine vital a été soustrait à celui obtenu si le domaine vital avait été distribué aléatoirement sur la ZAPVS (simulation de 100 buffers aléatoire de la taille du domaine vital de la perdrix). Cette soustraction a ainsi permis d'obtenir le  $\Delta\text{CONV}$ , indiquant si la perdrix avait utilisé préférentiellement ( $\Delta\text{CONV} > 0$ ) ou évité ( $\Delta\text{CONV} < 0$ ) les surfaces conventionnelles dans son diomaine vital. La détection et la quantification des PPPs dans le sang des perdrix ont permis de calculer la charge en PPP des oiseaux ( $N_{\text{ppp}}$  et  $TU_{\text{tot}}$ , voir

chapitre III). Les relations entre la charge en PPP et le risque d'exposition aux PPPs ( $\Delta$ CONV) ont ensuite été étudiées. Puis la charge en PPP des oiseaux a été mise en lien avec leurs traits d'histoire de vie (concentrations en caroténoïdes et haptoglobine, condition corporelle et distance de fuite). Cinquante PPPs différents ont été retrouvés dans le sang des perdrix dont 13 herbicides, 23 fongicides and 14 insecticides. Douze PPPs étaient présents dans plus de 50% des individus. La charge en PPP n'a pas pu être reliée au risque d'exposition  $\Delta$ CONV, bien qu'une tendance légèrement supérieure au seuil de significativité montre que les perdrix utilisant préférentiellement les surfaces conventionnelles auraient un  $N_{\text{ppp}}$  plus élevé. En revanche, les perdrix qui avaient la une charge en PPP plus élevée disposaient de moins de caroténoïdes dans le sang, suggérant l'allocation des caroténoïdes dans un potentiel processus de détoxification des PPPs. De plus, les perdrix avec le plus de PPPs détectés dans le sang ( $N_{\text{ppp}}$ ) avaient une distance de fuite plus courte, soulignant une possible altération du système nerveux à travers les capacités de détection et de vigilance des oiseaux. Ces résultats montrent (i) la contamination ubiquitaire des PPP chez des perdrix grises vivant dans un agroécosystème et (ii) les conséquences délétères sur leurs traits d'histoire de vie. Ces observations soulèvent des questions sur la toxicité des mélanges de PPP et plaident pour une nouvelle conception de l'évaluation des risques associés et des mesures d'atténuation pour la flore et la faune non-visée. Ce travail souligne en outre l'importance des initiatives de biomonitoring, qui deviennent un enjeu crucial pour suivre en temps réel la contamination des paysages agricoles et les risques sanitaires associés.

**The grey partridge as a bio-sentinel of French agroecosystem: home-ranges, multiple PPP residues in blood and health status**

Agathe Gaffard<sup>a</sup>, Clément Harmange<sup>b</sup>, Anaïs Rodrigues<sup>c</sup>, Maurice Millet<sup>c</sup>, Maria Teixeira<sup>d</sup>, Vincent Bretagnolle<sup>a,e</sup>, Karine Monceau<sup>a</sup>, Jérôme Moreau<sup>d</sup>, Olivier Pays<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, UMR 7372, CNRS & La Rochelle Université, 79360 Villiers-en-bois, France

<sup>b</sup>Univ Angers, BIODIVAG, 49000 Angers, France  
REHABS International Research Laboratory, CNRS-Université Lyon 1-Nelson Mandela University, George Campus, Madiba Drive 6531 George, South Africa.

<sup>c</sup>ICPEES, UMR 7515, CNRS et Université de Strasbourg, 67000, France

<sup>d</sup>UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université Bourgogne Franche-Comté, 6 Boulevard 7 Gabriel, 21000 Dijon, France

<sup>e</sup>LTSER “Zone Atelier Plaine & Val de Sèvre”, Villiers-en-Bois, 79360, France

**\*Correspondence:** A. Gaffard, Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, UMR 7372, CNRS & La Rochelle Université, 79360 Villiers-en-Bois, France. E-mail address: [agathe.gaffard@cebc.cnrs.fr](mailto:agathe.gaffard@cebc.cnrs.fr)

## **ABSTRACT**

Contamination with phyto-pharmaceutical products (PPP) is frequently mentioned as a key factor in global farmland birds declines although the processes behind are still not formally identified. A critical step is to characterize the exposure of non-target species to these compounds and quantified its effects on birds' life history traits. This study aimed to i) measure free-living partridge's PPP load using multiple pesticide residues analysis and correlate it with ii) their health status and iii) farming practices in their home-ranges. 50 PPP were found in partridges' blood. Although no significant effect between conventional surfaces and PPP load was detected, our results highlighted the existence of a strong negative correlation between PPP load and health parameters. PPP load was negatively correlated with carotenoids concentration and flight initiation distance. These results indicate that partridge living in intensive agricultural landscape are exposed to a complex and diffuse contamination by PPP mixtures. Moreover, these results highlight the risks associated with chronic PPP exposure, as immune system and risk-taking behaviour may be altered. This work further highlights the importance of monitoring initiatives and bio-sentinel species use to relevantly survey farmland landscapes contamination to PPP and associated health risks for non-target wildlife.

## **Key-words**

Pesticides, farmland birds, biomonitoring, farming practices, health status

## 1. INTRODUCTION

Phyto-pharmaceutical products (PPP) are plant protecting substances used to control or eradicate crop pests, designed and regulated in order to be low persistent, low bioaccumulative and targeted (Casida 2009). Nowadays, more than 500 active substances with various modes of action are used worldwide, a trend that is not expected to be reversed (Bernhardt et al. 2017). However, these synthetic products have been suspected of being environmental contaminant for several decades. Indeed, intensive agriculture is responsible for the production and release of these new synthetic molecules into the different environmental compartments (Sabatier et al. 2014). Once sprayed, PPP can contaminate air and water surface (Bonmatin et al. 2015; Giorio et al. 2021) and accumulate in soils of various habitats within the agricultural landscapes (Pelosi et al. 2021). Overall, our knowledge regarding the actual contamination of PPP and their identified metabolites in the environment, as well as their effects on non-target wildlife, is extremely limited (Goulson 2013, Moreau et al. 2022).

Despite a growing body of research showing that PPP are a key factor in global biodiversity declines, the processes behind are still not formally identified (Bernhardt et al. 2017; Brühl and Zaller 2019). A critical step is to (i) characterize the exposure and the contamination of non-target species to these compounds and (ii) quantified its effects on their life history traits. Thus, the use of bio-sentinel species to monitor the levels and adverse effects of chemical pollutants has developed over the last few decades, providing insights on ubiquitous PPP contamination of wildlife and suggesting a potential risk associated. Two recent studies in French agroecosystems showed global contamination and accumulation of PPP mixtures in earthworms (Pelosi et al. 2021) and micromammals' hair (Fritsch et al. 2022), whatever the farming practices (i.e., organic or conventional). These studies raise questions about the pervasiveness of contamination in agricultural landscapes including organic plots, and the ecotoxicological consequences of such exposure to PPP mixtures.

Nowadays, the studies monitoring PPP residues in wildlife are mostly based on necropsies of dead individuals collected via networks of toxicological surveillance or through non-invasive samples like hairs and feathers (e.g., Brodeur et al. 2022; see Pacyna-Kuchta et al. 2022 for a review). However, these approaches does not allow to follow in real time the environmental contamination nor to connect it directly with individual health (Pacyna-Kuchta et al. 2022). Thus, the implementation of detection and analysis of PPP in blood represent a promising matrix for revealing the level of contamination and associated health risks, as it supposes to reflect a short-term exposure (Espín et al. 2016). Moreover, a single blood sample

could enable the analysis of several physiological parameters in addition to measuring PPP residues, which allows to connect in real time the PPP contamination and their potential effects on health. However, performing such monitoring on free-living bio-sentinel species requires (i) access to wildlife monitoring, (ii) permission to capture individuals and take blood samples, (iii) access to details of agricultural practices inside the home-range of animals, and finally (iv) the ability to perform multiple PPP analyses in biological matrices (Stephen et al. 2018; Valverde et al. 2022).

Farmland birds are valuable candidates as bio-sentinels of agroecosystems, as they are particularly well monitored worldwide, being involved in long-term banding programs over decades, which has highlighted their decline (Stanton et al. 2018; Rosenberg et al. 2019; Li et al. 2020; Burns et al. 2021; DEFRA 2021). These broad monitoring programs are facilitated in long-term socioeconomic research platforms (LTSEs), which enable these types of transdisciplinary approaches (Mirtl et al. 2018; Angelstam et al. 2019; e.g., for agricultural landscapes, see Bretagnolle et al. 2018). Indeed, detailed knowledge of the landscape, land use, and farming practices over several decades enable to characterize the exposition risk to PPP for farmland birds, and is a critical asset for conducting spatially explicit sampling designs and minimizing some biases (Bretagnolle et al. 2018). Numerous experimental studies have shown farmland birds' sensitivity to PPP contamination, which can impede their physiological processes and adversely affect their health and behaviour (Mitra et al. 2011; Pandey et al. 2017; Moreau et al. 2022). A well-known farmland bird is the grey partridge (*Perdix perdix*), a species in major decline since 1950 in Europe, although many conservation efforts have been made to reverse this trend (Kuijper et al. 2009; Sotherton et al. 2014; Bro 2016). It is a sedentary bird, living in crop fields with a rather small home-range (i.e., less than 150 ha) and feeding with seeds and insects from cultivated fields (Potts and Aebischer 1991). Therefore, this species is exposed to PPP throughout their lives. Although PPPs have already been measured in the carcasses of hunted grey partridges (Lennon et al. 2020), or in their unhatched eggs (Bro et al. 2016), no direct monitoring of these birds has yet been carried out to quantify their real time contamination and the associated health risks.

In this study, we set up the monitoring of GPS-equipped grey partridges on a LTSE platform in order to explore relationships between PPP exposition risk, contamination and health status. We particularly address the following questions: (i) does the conventional surfaces used in partridges' home-range drive their PPP contamination in blood? And (ii) does the PPP load in blood alter partridges' health status? Fifty-four partridges were captured during



winter 2020-2021 and 2021-2022 to assess i) PPP contamination in their blood and correlate it with ii) their health status. Then, partridges were iii) GPS-equipped and released in order to assess their home-range considering farming practices (i.e., organic or conventional). A multiple analysis of PPP residues in blood (i.e., 94 PPP sought from different PPP families) was used to link PPP load (using proxies of their toxicity, see material and methods) and multiple health parameters (i.e., body condition, carotenoid concentration, haptoglobin concentration and risk-taking behaviour). We predicted a correlation between PPP load in blood and health parameters; a higher load would be related to health status alteration (e.g., lower body condition, carotenoid concentration, risk-taking behaviour and higher haptoglobin concentration). We also hypothesized that the birds with the highest PPP load would be partridges that preferentially used conventional farming plots rather than organic ones in their home-range

## 2. MATERIAL AND METHODS

All experiments complied with French laws on animal experimentation. Permission to capture and handle the study birds was given by the authority Préfecture Départementale des Deux-Sèvres (Number 2022/1).

### 2.1. Study area

The study was conducted on the long-term socio-ecological research (LTSER) platform “Zone Atelier Plaine & Val de Sèvre”, Département des Deux-Sèvres, in Western France (Fig. 1). Study area covers 435 km<sup>2</sup>, which is characterized by intensive cereal production. The ZA-PVS shows a rather high diversity of farming systems, with 60 farms using organic farming, and 350 conventional farms of which about 50% are mixed dairy/cereal farms. Agricultural land use within ZA-PVS has been monitored yearly at the field scale since 1994 and mapped on vector-based shape files (Bretagnolle et al. 2018). Land-cover use is represented by winter cereals (41.5%, mean value calculated over the years 2009–2016), sunflower (10.4%), corn (9.6%), rape (8.3%), meadows (13.5%), woodlands (2.9%), and built-up areas (9.8%) (Bretagnolle et al. 2018). Every single organically farmed plots are also identified which therefore provides a very detailed description of the farming practices in regard to PPP use, at field scale (Fig. 1). In 2021, 16.87% of the ZA-PVS’ utilised agriculture area was in organic farming. On average, conventional farmers of the ZA-PVS use 5-10 different PPP molecules on their fields (in about 4-8 applications per year; unpublished data from Bretagnolle and Gaba), while organic farmers use none.

## 2.2. Grey partridge captures and monitoring

Grey partridges (*Perdix perdix*) were caught during two consecutive years from November 2020 to February 2021 (winter 2020-2021) and from December 2021 to March 2022 (winter 2021-2022) in the study area. In autumn and winter, grey partridges are mostly herbivorous and granivorous, living in large coveys in winter crops (Potts and Aebischer 1991). At night, they sleep in ploughing, which make them more easily to spot and capture. Before the capture period, a survey of the different coveys present on the ZA-PVS has been made. Then, for each night when the weather was propitious to capture (cloud cover, no moon), one covey was targeted for the capture. The goal was to capture as many partridges as possible with equal sex ratio. Partridges were captured after nightfall, in the dark, using thermal binoculars, dazzling and a landing net (i.e., a method inspired by Eurasian Woodcock catching technique, Williams 2015). Captured partridges were then placed together in transport cardboard boxes and brought back to the laboratory to spend the night with food (i.e., organic corn and wheat) and water *ad libitum*. The next morning at 9 a.m., each partridge was sexed (according to the presence of secondary sexual characters) and fitted with an alphanumeric metal ring. Then, PPP load and health status of each bird were assessed using the same sequential order of measures with (i) risk-taking behaviour test, (ii) morphological measurements and (iii) blood sample. Finally, the partridges were fitted with OrniTrack 10g Ornitela®, a transmitter solar-powered GPS-GSM tracker for terrestrial birds (produced by Ornitela UAB - [www.ornitela.com](http://www.ornitela.com); Clements et al. 2022), set onto the back using a Teflon harness. The weight of the transmitters was 10 g, which is less than 3 % of the weight of the birds tracked (mean  $\pm$  SE = 389.16  $\pm$  26.81 g), following the recommendations of < 3 % (Kenward 2001). This transmitter model was chosen because of its good performance in periods of low sunlight as they were used during winter (Clements et al. 2022). The transmitters were set to detect the coordinates every hour during daytime and nighttime and data transmission occurred every 24 hours. Once all partridges were fitted, GPS transmitters were turned on and partridges were released all together to the previous day's capture point before midday. Overall, 54 partridges were caught, with 23 partridges during winter 2020-2021 and 31 during winter 2021-2022 (Table 1, Fig. 1).

## 2.3. Partridges' home-range assessment

Since partridges are sedentary birds, we hypothesized that their home-range before capture and after capture would be equivalent. Partridges' home-range sizes were assessed using 95 % minimum convex polygons (MCP) and kernel, two estimates of partridge's home-range. MCP

calculates home-range size by drawing a convex polygon around the location points of an individual (Hayne 1949). Although MCP has limitations, especially its inability to distinguish between areas of high and low use by the subject animal, it is still one of the most widely used methods of calculating home-range (Boyle et al. 2008). By contrast, kernel estimator use nonparametric statistics to calculate utilization distribution contours and identify core areas (Worton 1989). As kernel method could possibly exclude punctual episodes of acute exposure to PPP when partridge has moved away from its maximum area of use, we chose to assess home-range using the MCP method here (but kernel would also be considered for publication). We checked how quickly the partridges reached their maximum home-range after capture, suggesting that the associated disturbance to capture was no longer impacting the birds (Fig. 2). MCP became asymptotic at about 15-20 days after capture (Fig. 2), thus, we chose to use the MCP at 28 days post-capture to quantified partridges' home-range. The 54 GPS-equipped partridges survived on average 99 days after capture (min: 2 days after capture, max: 634 days after capture). Ten partridges died before reaching 28 days of survival, therefore only 44 partridge's home-ranges were used for the analysis.

#### 2.4. Data collection

Captured partridges allowed to obtain (i) their PPP load (i.e. the number of PPP detected and the toxic unit, see below) and (ii) their health status (i.e., behavioural and physiological traits) at the time of the capture using a blood sample taken from the brachial vein using a sterile needle ( $\varnothing$  0,06 mm) and heparinised micro-capillary tubes. Blood was then either directly reserved in Eppendorf tubes either centrifuged to obtain plasma according to the needs for the analyses. All the samples were then stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until analysis. Overall, less than 200  $\mu\text{l}$  of blood was taken per bird.

##### 2.4.1. Analytics for residues of PPP in blood

Fifty microliters of blood were analysed by the Institut de Chimie et Procédés pour l'Energie, l'Environnement et la Santé (ICPEES, UMR 7515) of the University of Strasbourg (France). 94 PPP most commonly found in the agroecosystem were sought for each individual following the method in Rodrigues et al. 2022 (see **Article VI** for methods). The concentration of each PPP found for each individual was obtained in  $\text{pg}\cdot\text{mg}^{-1}$ . When a PPP was detected at a level below the Limit of Quantification ("LOQ" hereafter) but above the Limit of Detection ("LOD" hereafter), the LOQ/2 value was attributed (Tekindal et al. 2017). When a PPP below the LOD, the concentration value was set at the  $(1/3 \text{ LOQ}) / 2$  (Tekindal et al. 2017). To assess PPP load

of partridges, we first calculated the number of PPP (“N<sub>PPP</sub>” hereafter) detected in the blood of each bird. Although this approach does not take into account the toxicity of the compounds, it remains a simple metric to represent the risk related to potential additive and/or synergism effects in PPP mixture (i.e., an increasing number of PPP leads to an increased risk of interactions among molecules and thus toxicity; Zaller et al. 2022). Then, we calculated a second variable representative of the mixture toxicity using concentration addition methods, which implies that individual components of the mixture contribute to mixture toxicity in proportion to their individual concentration and toxicity (Kortenkamp et al. 2009). As there is no existing models to assess potential synergism or antagonism in PPP mixtures (Cedergreen et al. 2014; Hladik et al. 2016; Brodeur et al. 2022; Larras et al. 2022), concentration addition models are often suggested as a default model for risk assessment of chemical mixtures (Panizzi et al. 2017; Schell et al. 2018; Larras et al. 2022). Thus, we calculated the toxic unit per bird (“TU<sub>tot</sub>” hereafter) defined by several committees (SCHER/SCENIHR/SCCS 2012) as the ratio between the concentration of a mixture component and its toxicological acute (e.g. LD50) or chronic (e.g. long-term No-Observed Effect Concentration NOEC) endpoint. Basically, this concept can be used to quantify the toxicity of a mixture based on its composition, assuming the CA principle (EFSA 2012; Hladik et al. 2016; Panizzi et al. 2017). Here, TU<sub>tot</sub> corresponds to the sum of each PPP toxic unit (“TU” hereafter), i.e., the ratio between PPP concentration and the corresponding LD50.

$$TU_{tot} = \sum_{i=1}^n TU, \text{ with } TU = \frac{PPP \text{ concentration (pg.mg}^{-1})}{PPP \text{ LD50 (mg.kg}^{-1})}$$

TU calculations are based upon LD50 data for each substance from the PPP Properties Database accessed in 2022 (Lewis et al. 2016). When the reported available LD50 values exceeded a certain value (e.g., >2000 mg.kg<sup>-1</sup>), the minimum value (here, 2000 mg kg<sup>-1</sup>) was used. Although not all PPP operate via the same mode of action, and toxicity may not be additive, this approach allowed a first step in assessing potential acute toxicity of the mixture of PPP observed in partridges’ blood (Hladik et al. 2016; Panizzi et al. 2017).

#### 2.4.2. Health status

Partridges’ health status was assessed through risk-taking behaviour, body condition, and carotenoid and haptoglobin concentrations. All these monitored parameters were chosen as they are easily measurable, minimally invasive (a single blood sample allowed the analysis of several physiological parameters), and their responses to PPP mixtures have already been reported

(Gaffard et al. 2022, in prep.). None of the 54 partridges caught was injured or died during the experiments.

#### 2.4.2.1. Risk-taking behaviour

Risk-taking behaviour was assessed through Flight Initiation Distance (FID hereafter), which corresponds to the distance at which the individual begins to fly when a danger approaches (Frid and Dill 2002; e.g., Gaffard et al. 2022b). Partridges were placed by one operator in a squared, wired cage (46 cm x 32 cm x 36 cm) in a plough field closed to the laboratory. Another operator was hidden behind a hedge, 100 m from the cage, and watched partridges' behaviour with binoculars. After 3 minutes of acclimatization, the hidden operator approached the birds. The FID was estimated as the distance at which the bird reacted (tried to run or fly inside the cage) to the straight-line approach of the operator. After the test, birds were caught by the first operator, put in a cardboard box (66 cm x 38 cm x 17.5 cm) and brought directly in a nearby building to carry out morphological measurements and blood sample.

#### 2.4.2.2. Body condition

Body condition determines the corpulence of individuals according to their weight and tarsus size as a proxy of energy capital accumulated by feeding (Peig and Green 2009) and can greatly vary under PPP-induced stress (e.g., Lopez-Antia et al. 2013; Bellot et al. 2022). Right and left tarsus lengths were measured twice with a calliper (accuracy of 0.1 mm) and body mass using a spring scale to the nearest 1 g (Pesola 500 g). From body mass and mean tarsus length (right and left), we evaluated the body condition with the scaled mass index (Gaffard et al. 2022a, b).

#### 2.4.2.3. Carotenoid concentration

Carotenoids are pigments involved both in the antioxidant system and in the expression of secondary sexual traits (Baeta et al. 2008). Carotenoids concentration may increase to struggle with reactive oxygen components (ROS) produced by PPP-induced oxidative stress (Lopez-Antia et al. 2013, 2015a, b). A standardised colorimetric method was used to determine the concentration of carotenoids in blood (see Alonson-Alvarez et al. 2004). Twenty microlitres of plasma was diluted in 180  $\mu$ L of absolute ethanol, vortexed and then centrifuged at 1500 rpm at 4°C for 10 minutes to precipitate coagulated proteins. The supernatant was examined in a spectrophotometer (SpectraMax iD3, Molecular Devices, Inc., Sunnyvale, CA, USA) which determined the optical density of the carotenoid peak at 450 nm. The carotenoid concentration (in  $\mu$ g/mL<sup>-1</sup>) was calculated from a standard range made by cascade dilution of a pure lutein solution at 20 ng/ $\mu$ L.

#### 2.4.2.4. Haptoglobin concentration

Haptoglobin is multifunctional an acute phase protein that can increase rapidly in response to infection or inflammation (Matson et al. 2012; Quaye 2008). This protein is responsible for binding free haemoglobin in order to limit damages caused by reactive oxygen components released during inflammation (Quaye 2008). Thus, in the context of the study, haptoglobin concentration may increase to mitigate reactive oxygen species (ROS) damages under PPP-induced oxidative stress. Haptoglobin was quantified using the protocol presented in Gaffard et al. 2022, in prep. Results are given in  $\text{mg/mL}^{-1}$ .

## 2.5. Statistical analyses

### 2.5.1. Calculation of the selection index for conventional surfaces $\Delta\text{CONV}$ in partridges' home-range

Percentage of conventional surfaces in each partridges' home-range ( $\% \text{CONV}_{\text{obs}}$ ) were computed using the ZA-PVS shape of organic fields and land use. All arable lands cultivated in conventional agriculture was considered as conventional fields and woods, hedgerows, roads, buildings and grasslands were excluded. Arable lands cultivated in organic agriculture were also excluded. Then, for each partridge, 100 buffers of the size of their MCP were randomly distributed in the ZAPVS to assess the expected mean percentage of conventional surface within ( $\% \text{CONV}_{\text{th}}$ ). The delta ( $\Delta\text{CONV}$ ) between the  $\% \text{CONV}_{\text{obs}}$  and  $\% \text{CONV}_{\text{th}}$  was then calculated meaning that partridges with  $\Delta\text{CONV} > 0$  had more conventional surfaces in their home-range than randomness and partridges with  $\Delta\text{CONV} < 0$  had less conventional surfaces (and thus more organic surfaces) in their home-range than randomness.

### 2.5.2. Relationships between partridges' PPP load, $\Delta\text{CONV}$ and health status

First, effect of sex on partridges'  $\Delta\text{CONV}$ , PPP load and health parameters was checked before analysis using either Student t-test or Wilcoxon test according to variable distributions. Similarly, effect of date of capture on partridges'  $\Delta\text{CONV}$ , PPP load and health parameters was checked before analysis using linear regression model. Then, we tested if the selection index for conventional surfaces ( $\Delta\text{CONV}$ ) could explain partridges' PPP load (i.e.,  $N_{\text{PPP}}$  and  $\text{TU}_{\text{tot}}$ ) and if partridge's PPP load impacted their health status (i.e., body condition, haptoglobin and carotenoid concentrations, and risk-taking behaviour). These relationships were assessed using simple linear regression models ("LM" hereafter) with  $F$ -ratio statistics. Statistical assumptions to run linear models were checked. For all tests,  $P$  values are given at a 5% significance level. All statistical analyses were performed with RStudio software (version 4.0.4, R Core Team

2022) implemented with the ‘smatr’ package for the calculation of body mass index (Peig and Green 2009).

Winter is a critical period for grey partridges because it is the period when coveys break up for pair formations (Bro et al. 2000). PPPs use also depend of the seasons considering crop type and target species. Therefore, date of capture may induce variation in partridges’  $\Delta\text{CONV}$ , PPP load and health parameters. However, this chapter is still prospective and the impact of the date of capture in these relationships needs to be further explored. Consequently, the date has not yet been included in the models and have been treated separately.

### 3. RESULTS

#### 3.1. Description of partridge’ home-ranges and $\Delta\text{CONV}$

Partridges’ home-range at 28 days post-capture varied from 6.49 to 144.12 ha with a mean ( $\pm$  SE) of  $58.48 \pm 33.78$  ha. No effect of partridges’ sex on their home-range was detected (Wilcoxon test:  $W = 166$ ,  $P = 0.09$ ). However, time had a significant effect on partridges’ home-range (LM:  $F_{1,42} = 13.91$ ,  $P < 0.001$ ; Fig 3), as the later the date of capture, the smaller the home-range. Partridges’  $\Delta\text{CONV}$  varied from -26.44 to 29.27 with a mean of  $5.08 \pm 17.52$ . Twenty partridges had a  $\Delta\text{CONV} < 0$ , meaning that they avoid conventional surfaces in their home-range as opposed to the 24 remaining partridges with  $\Delta\text{CONV} > 0$ , meaning that they selected conventional surfaces in their home-range than randomness (Fig. 4).

#### 3.2. Description of partridges PPP load in blood and relationship with $\Delta\text{CONV}$

Table 2 shows the 50 PPP that have been detected in the blood samples of partridges. Among the 94 searched PPP in the partridge blood, 50 were detected at least in one blood sample and included 23 fungicides, 14 insecticides and 13 herbicides. Therefore, only molecules detected in at least one partridge blood sample were considered for analysis. Twelve PPP were found in the blood of more than half of the individuals, including Indoxacarb, Chloridazone, Cyproconazole and Epoxiconazole which were found in almost all partridges despite their disapproved status according to European Commission (EC) regulation No 1107/2009 (Table 2). Each PPP concentration quantified in each partridge’s blood sample was then corrected by its acute LD50 to obtain PPP TUs, which ranged from  $1.86 \times 10^{-6}$  to 12.12 (Fig. 5). The addition of each PP TUs allowed to obtain the  $\text{TU}_{\text{tot}}$  of each partridge (Fig. 5). Partridges’  $N_{\text{PPP}}$  varied from 8 to 20 molecules detected per blood sample, with a mean ( $\pm$  SE) of  $13 \pm 2$  molecules. Partridges  $\text{TU}_{\text{tot}}$  ranged from 0.12 to 20.52 with a mean ( $\pm$  SE) of  $8.92 \pm 4.79$ . No effect of partridges’ sex on PPP load was detected (Wilcoxon test on  $N_{\text{PPP}}$ :  $W = 392.5$ ,  $P = 0.60$ ; Wilcoxon

test on  $TU_{tot}$ :  $W = 394$ ,  $P = 0.59$ ). However, date of capture had a significant effect on partridges' PPP load (LM on  $N_{ppp}$ :  $F_{1,52} = 17.98$ ,  $P < 0.001$ ; LM on  $TU_{tot}$ :  $F_{1,52} = 17.60$ ,  $P < 0.001$ ; Fig 6), as PPP load decreased with time. Finally, no significant effect of  $\Delta CONV$  on  $TU_{tot}$  was detected (LM:  $F_{1,42} = 0.66$ ,  $P = 0.42$ ; Table 3). However, a trend slightly above the significance level has to be noted concerning the effect of  $\Delta CONV$  on  $N_{ppp}$  (LM:  $F_{1,42} = 3.71$ ,  $P = 0.06$ ), as  $N_{ppp}$  increased when  $\Delta CONV$  increased (Fig. 7; Table 3).

### 3.3. Partridges PPP load and health status relationships

No effect of partridges' sex was detected on carotenoid (Wilcoxon test:  $W = 280.15$ ,  $P = 0.16$ ), haptoglobin (Wilcoxon test:  $W = 245.2$ ,  $P = 0.10$ ) and FID (Student t-test:  $t = -1.16$ ,  $P = 0.25$ ) but females had higher body condition than males (Student t-test:  $t = 3.14$ ,  $P < 0.01$ ). No effect of date of capture was detected on body condition (LM:  $F_{1,52} = 0.33$ ,  $P = 0.60$ ), haptoglobin concentration (LM:  $F_{1,50} = 2.11$ ,  $P = 0.15$ ) and FID (LM:  $F_{1,50} = 0.24$ ,  $P = 0.63$ ). However, carotenoid concentration increased with date of capture (LM:  $F_{1,52} = 20.18$ ,  $P < 0.001$ ; Fig 8.a). Relationships between PPP load and health status are presented in Table 4. No significant effects of PPP load (i.e.,  $N_{ppp}$  and  $TU_{tot}$ ) on body condition and haptoglobin concentration were detected (Table 4). However, partridges with higher  $TU_{tot}$  had lower carotenoid concentration (LM,  $F_{1,52} = 14.67$ ,  $P < 0.001$ ; Fig. 8.b, Table 4). The same relationship was observed for  $N_{ppp}$  and carotenoid concentration (LM,  $F_{1,52} = 6.40$ ,  $P = 0.01$ ; Fig. 8.c, Table 4). Finally, partridges with higher  $N_{ppp}$  had also lower FID (LM,  $F_{1,52} = 6.15$ ,  $P = 0.01$ ; Fig. 9, Table 4).

## 4. DISCUSSION

This study aimed to i) measure free-living partridge's PPP load, correlate it with ii) their health status and iii) farming practices in their home-range. As expected due to the pervasiveness of environmental contamination, all birds were contaminated by PPP mixtures with an average of 13 PPP by partridges. Although no significant effect between  $\Delta CONV$  and PPP load was detected, a slight trend suggests that partridges that preferentially used conventional farming plots rather than randomness would have higher  $N_{ppp}$ . Moreover, PPP load seemed to impede partridges' health status as carotenoid concentration and FID decreased when  $TU_{tot}$  and  $N_{ppp}$  increased respectively. Showing global contamination of free-living partridges, these results highlight the risks associated with chronic PPP exposure, which could be correlated to conventional farming practices, as immune system and risk-taking behaviour may be altered. This work further highlights the importance of monitoring initiatives and bio-sentinel species use to relevantly



survey farmland landscapes contamination to PPP and associated health risks for non-target wildlife.

#### 4.1. Description of partridges contamination

This ubiquitous contamination of free-living partridges was expected, as both studies conducted on the same area on earthworms (Pelosi et al. 2011) and micromammals hair (Fritsch et al. 2022) already showed that non-target species were contaminated by several PPP. Partridges had on average 13 PPP in their blood. Half of the PPP found was fungicides and 21 PPP of the 54 detected were disapproved by EC Regulation. Even worse, eight PPP found are banned for more than five years and four neonicotinoids were detected while they are not supposed to be used on the study area since 2018. This contamination raises many questions about the source of exposition of these banned PPP. For instance, if we consider the five neonicotinoids found in partridges blood, the two most detected (i.e., Nitenpyram and Dinotofuran) are insecticides used only for veterinary purpose and concerned domestic animals (see Table 2). Even if wild grey partridges might originate from releases for small game hunting, French marketing authorizations of Dinotofuran and Nitenpyram do not include bird species or any farmed animal as targets (<http://www.ircp.anmv.anses.fr/index.aspx>). In the present case, except a fraudulent use of those molecules, we do not know how those concentrations of Dinotofuran and Nitenpyram can be found in partridges (but see Fuentes et al. 2022 submitted for more details; **Article VII**). Similarly, Clothianidin (found in eight partridges), Thiamethoxam (found in four partridges) and Thiachloprid (found in one partridge) are supposed to be “rapidly” excreted (English et al. 2021) and cleared from blood (ca. 22 days, Lopez-Antia et al. 2015a). Taking together, and considering also Indoxacarb, Chloridazone, Cyproconazole and Epoxiconazole which were found in almost all partridges despite their EC disapproved status, these results suggest either these PPP are still used illegally by farmers, either their persistence in the environment is much higher than expected. Indeed, knowing that blood is supposed to reflect a recent exposure (Espín et al. 2016), it means that partridges have been exposed to these molecules recently.

#### 4.2. Relationships between PPP load and $\Delta$ CONV

We expected that partridges PPP load would be related to their use of conventional surfaces in their home-range. First, we highlighted that partridges' home-range and PPP load were respectively smaller and lower when the date of capture was later in the winter season. This season effect on home-range size suggest the sedentarization of the bird for reproduction (Bro et al. 2013). Concerning PPP load, further investigations are needed concerning PPP application dates on the ZAPVS to explain why birds captured in early winter had higher PPP load than birds captured in late winter. Regardless of the date and contrary to our predictions, partridges' PPP load ( $TU_{tot}$  and

$N_{\text{PPP}}$ ) was not link to their selection index of conventional surfaces ( $\Delta\text{CONV}$ ). Indeed, we expected that partridges that preferentially used conventional farming plots rather than randomness (i.e.,  $\Delta\text{CONV} > 0$ ) would have higher PPP load than partridges with  $\Delta\text{CONV} < 0$ . Ubiquity of exposure to PPP in both treated and untreated habitats was evidenced for soils, earthworms and beetles over the ZAPVS (Bertrand et al. 2018; Pelosi et al 2021). However, soils and earthworms showed a lower PPP accumulation in plots under organic farming than under conventional farming (Pelosi et al. 2021). Similarly, an ubiquitous, general, exposure of house sparrows (*Passer domesticus*) to neonicotinoids in Swiss farmlands has been shown, but birds living in conventional farms exhibited higher concentrations than individuals from organic farms (Humann-Guillemint et al. 2019). Our results raise similar issues about generalized contamination irrespective of farming practices in partridge's blood. However,  $N_{\text{PPP}}$  and  $\text{TU}_{\text{tot}}$  were not affected by farming practices, even if  $N_{\text{PPP}}$  seemed to slightly increase with  $\Delta\text{CONV}$ . This trend could suggest that partridges which preferentially used conventional farming plots rather than randomness had more PPP in their blood in comparison to partridges with  $\Delta\text{CONV} < 0$ . Similarly, the detection frequency of PPP in two frog species in Argentina did not differ significantly among sites located along a gradient of distance to the nearest crop, with frogs sampled in places without PPP treatment showing similar frequency of PPP detection than frogs captured near crops (Brodeur et al. 2022). These results on terrestrial stages of amphibians echo the present findings. In our study, the lack of significant correlation with conventional surfaces may be related to the mobility of partridges and the spatial extent they exploit. Indeed, organic practices could limit environmental and biota contamination by PPP, thus providing refuges for wildlife within the landscape mosaic (Pelosi et al. 2021). However, these drivers seem insufficient to significantly buffer the exposure of animals at higher trophic levels and having a greater home-range as our results suggest that the current surfaces under organic farming in partridges' home-range are insufficient to tone down their PPP load. Indeed, PPP have been shown to occur both in organic cultures and non-treated semi-natural habitats all along the year (i.e. at the beginning of crop season and post-harvest), and sometimes exceeding predicted environmental concentrations even in non-treated habitats (Geissen et al. 2021; Pelosi et al. 2021). Direct inputs of PPP in non-treated patches from surrounding treatments might occur, for instance due to drift, volatilization, and run-off. The contamination of non-treated habitats might therefore be one of the reasons explaining the ubiquity of exposure.

#### 4.3. Effects of PPP load on health status

The use of multi-residue analyses reveals the accumulation of complex mixtures of compounds in partridges, which reflects a co-exposure that might be caused by simultaneous, successive or cumulative multiple exposure (Scholz et al. 2022). Altogether, these results and recent findings showed that exposure to complex mixtures of PPP is likely to be the rule rather than the exception (Pelosi et al. 2021, Brodeur et al. 2022; Fritsch et al. 2022; Gaffard et al. 2022). The ecotoxicological significance of such a co-exposure might be due to either chronic long-term exposure to low doses, or acute short-term exposure or both. The PPP quantified in our work can have toxic effects, as known from the literature (Brodeur et al. 2022). However, it is hard to interpret their concentrations with regards to toxicity benchmarks because toxicity thresholds have been established usually under single compound exposure. In that case, CA models are frequently applied in the regulatory risk assessment to investigate possible synergism of chemicals (Kienzler et al. 2014, Brodeur et al. 2022). Here, the calculation of the  $N_{ppp}$  and the  $TU_{tot}$  allowed to demonstrate that, the greater the PPP load, the lower the carotenoid concentration, suggesting that PPP mixture could have deleterious effect on both immune system and ornamentation. Indeed, carotenoid are pigments known to scavenge free radicals and enhance immune system responses but also to determine the coloration of secondary sexual traits (Baeta et al., 2008). Thus, lower carotenoid concentration in blood could be a signal that the organism is undergoing a detoxification process due to PPP contamination (Moreau et al. 2021, Broughton et al. 2017). However, a complex relationship with the date of capture has to be considered, as birds captured in late winter had higher carotenoid concentration than birds captured in early winter. As mentioned above, carotenoids are also mobilized for sexual ornamentation during mate choice. Thus we can expected that birds caught first in the season would have lower carotenoid concentration than birds caught later, i.e., when mate choice occurred. Consequently, the relationship between PPP load, carotenoid concentration and time need further investigations to understand the processes underlying. Finally, partridges' risk-taking behaviour was also impeded by  $N_{ppp}$ , as birds with higher  $N_{ppp}$  had lower FID. This result is concomitant with experimental studies as PPP are known to impede activity (Eng et al. 2019) and vigilance (Gaffard et al. 2022a,) through nervous system alteration. As grey partridge are birds suffering from great risk of predation, both by mammals and by humans, risk-taking behaviour alteration may be a key factor of their survival.

## 5. Conclusion

By assessing the exposure of free-living grey partridges to PPP in agricultural landscapes using blood samples, this study shed light on the extent and ubiquity of farmland birds' contamination

by complex mixtures of PPP. Although no relationship could be established between conventional surfaces use by partridges and their PPP load in blood, our findings provide support of unintentional impacts of PPP mixture on health status. This constitutes a timely issue towards biodiversity conservation and also towards societal implications (Bernhardt et al. 2017; Groh et al. 2022; Persson et al. 2022). Finally, our results also question the efficacy of present PPP management to protect wildlife, providing support to re-design risk assessment and mitigation measures, as called for in the recent literature (Brühl and Zaller 2019; Topping et al. 2020; Weisner et al. 2021). Indeed, despite constantly tightening regulation and organic farming development within the last decades, an exposure to dozens of PPP is shown here in non-target vertebrates, which moreover questions whether the extent and spatial configuration of refuges is sufficient to ensure ecological recovery. This work further highlights the importance of monitoring initiatives, which become a critical issue to follow in real time farmland landscapes contamination and associated health risks.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

We thank Landry Boussac and Samuel Perroteau for their assistance during partridge captures, manipulation and GPS monitoring. We are grateful to the Fédération des Chasseurs (79), its president Guy Guedon and Frederic Audurier and its team for their support. Finally, we acknowledge Oxford Science Editing service for carefully improving the English of the manuscript.

#### **FUNDING SOURCES**

This work was supported by the French National Centre of Scientific Research (CNRS) and the French National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment (INRAE). This study was partly funded by the projects ANR JCJC PestiStress (#19-CE34-0003-01), the BioBird project funded by the regional government of Nouvelle-Aquitaine, and the French National program EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière).

#### **REFERENCES**

Alonso-Alvarez, C., Bertrand, S., Devevey, G., Prost, J., Faivre, B., Sorci, G., (2004). Increased susceptibility to oxidative stress as a proximate cost of reproduction: Oxidative stress as a

- cost of reproduction. *Ecol. Lett.* 7, 363–368. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00594.x>
- Angelstam, P., Manton, M., Elbakidze, M., Sijtsma, F., Adamescu, M.C., Avni, N., Beja, P., Bezak, P., Zyablikova, I., Cruz, F., Bretagnolle, V., Díaz-Delgado, R., Ens, B., Fedoriak, M., Flaim, G., Gingrich, S., Lavi-Neeman, M., Medinets, S., Melecis, V., Muñoz-Rojas, J., Schäckermann, J., Stocker-Kiss, A., Setälä, H., Stryamets, N., Taka, M., Tallec, G., Tappeiner, U., Törnblom, J., Yamelynets, T., (2019). LTSER platforms as a place-based transdisciplinary research infrastructure: learning landscape approach through evaluation. *Landscape Ecol.* 34, 1461–1484. <https://doi.org/10.1007/s10980-018-0737-6>
- Baeta, R., Faivre, B., Motreuil, S., Gaillard, M., Moreau, J., (2008). Carotenoid trade-off between parasitic resistance and sexual display: an experimental study in the blackbird (*Turdus merula*). *Proc. Biol. Sci.* 275, 427–434. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1383>
- Bernhardt, E.S., Rosi, E.J., Gessner, M.O., (2017). Synthetic chemicals as agents of global change. *Front. Ecol. Environ.* 15, 84–90. <https://doi.org/10.1002/fee.1450>
- Bertrand, C. Zagatti, P., Bonthoux, S., Daniele G., Lafay, F., Vulliet, E., Bretagnolle, V., Fritsch, C., Pelosi, C., (2018) Assessing the impact of farming practices and landscape heterogeneity on ground beetles' exposure to pesticides.
- Bonmatin, J.M., Moineau, I., Charvet, R., Colin, M.E., Fleche, C., Bengsch, E.R., (2005). Behaviour of Imidacloprid in Fields. Toxicity for Honey Bees, in: Lichtfouse, E., Schwarzbauer, J., Robert, D. (Eds.), *Environ. Chem.* Springer-Verlag, Berlin/Heidelberg, pp. 483–494. [https://doi.org/10.1007/3-540-26531-7\\_44](https://doi.org/10.1007/3-540-26531-7_44)
- Boyle, S.A., Lourenço, W.C., da Silva, L.R., Smith, A.T., (2008). Home range estimates vary with sample size and methods. *IJFP* 80, 33–42. <https://doi.org/10.1159/000201092>
- Bretagnolle, V., Berthet, E., Gross, N., Gauffre, B., Plumejeaud, C., Houte, S., Badenhauer, I., Monceau, K., Allier, F., Monestiez, P., Gaba, S., (2018). Towards sustainable and multifunctional agriculture in farmland landscapes: Lessons from the integrative approach of a French LTSER platform. *Sci. Total Environ.* 627, 822–834. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.142>
- Bro, E., Devillers, J., Millot, F., Decors, A., (2016). Residues of plant protection products in grey partridge eggs in French cereal ecosystems. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23, 9559–9573.
- Bro, E., Millot, F., Delorme, R., Polvé, C., Mangin, E., Godard, A., Brault, X. (2013). PeGASE, bilan synthétique d'une étude perdrix grise «population-environnement». *Faune Sauvage*, 298, 17–48.

- Bro, E., Novoa, C., Gest, D., (2016). La perdrix grise: biologie, écologie, gestion et conservation. Biotope éditions, Mèze.
- Bro, E., Sarrazin, F., Clobert, J., Reitz, F., (2000). Demography and the decline of the grey partridge *Perdix perdix* in France. *J. Appl. Ecology* 37, 432–448. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2000.00511.x>
- Brodeur, J.C., Damonte, M.J., Rojas, D.E., Cristos, D., Vargas, C., Poliserpi, M.B., Andriulo, A.E., (2022). Concentration of current-use pesticides in frogs from the Pampa region and correlation of a mixture toxicity index with biological effects. *Environ. Res.* 204, 112354. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112354>
- Broughton, D.R., Schneider, B.C., McGraw, K.J., Ardia, D.R., (2017). Carotenoids buffer the acute phase response on fever, sickness behavior, and rapid bill color change in zebra finches. *J. Exp. Biol.* 155069. <https://doi.org/10.1242/jeb.155069>
- Brühl, C.A., Zaller, J.G., (2019). Biodiversity decline as a consequence of an inappropriate environmental risk assessment of pesticides. *Front. Environ. Sci.* 7, 177. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00177>
- Burns, F., Eaton, M.A., Burfield, I.J., Klvaňová, A., Šilarová, E., Staneva, A., Gregory, R.D., (2021). Abundance decline in the avifauna of the European Union reveals cross-continental similarities in biodiversity change. *Ecol. Evol.* 11, 16647–16660. <https://doi.org/10.1002/ece3.8282>
- Casida, J.E., (2009). Pest toxicology: the primary mechanisms of pesticide action. *Chem. Res. Toxicol.* 22, 609–619. <https://doi.org/10.1021/tx8004949>
- Cedergreen, N., (2014). Quantifying synergy: A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS ONE* 9, e96580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>
- Clements, S.J., Ballard, B.M., Eccles, G.R., Sinnott, E.A., Weegman, M.D., (2022). Trade-offs in performance of six lightweight automated tracking devices for birds. *J. Field Ornithol.* 12392. <https://doi.org/10.1111/jofo.12392>
- DEFRA. (2021). Wild Bird Populations in the UK, 1970 to 2019. Retrieved June 6, 2022, from <https://www.gov.uk/government/statistics/wild-bird-populations-in-the-uk>
- EFSA (2009). Guidance of EFSA: risk assessment for birds and mammals. *EFSA J.* 2009, 7 p. 358
- EFSA (2012). Panel on Plant Protection Products and their Residues (PPR): Scientific opinion on the science behind the development of a risk assessment of Plant Protection Products

- on bees (*Apis mellifera*, *Bombus* spp. and solitary bees). *EFSA J.* 2012; 10(5) 2668., 275 pp.
- European Commission, (2009). Regulation (EU) No 1107/2009 of 21 October 2009 concerning the placing of plant protection products on the market and repealing Council Directives 79/117/EEC and 91/414/EEC L 309, 1–50.
- Eng, M.L., Stutchbury, B.J., Morrissey, C.A., (2019). A neonicotinoid insecticide reduces fueling and delays migration in songbirds. *Science* 365, 1177–1180.
- English, S.G., Sandoval-Herrera, N.I., Bishop, C.A., Cartwright, M., Maisonneuve, F., Elliott, J.E., Welch, K.C., (2021). Neonicotinoid pesticides exert metabolic effects on avian pollinators. *Sci. Rep.* 11, 2914. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82470-3>
- 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., (2016). Tracking pan-continental trends in environmental contamination using sentinel raptors—what types of samples should we use? *Ecotoxicology* 25, 777–801.
- Frid, A., Dill, L.M., 2002. Human-caused disturbance stimuli as a form of predation risk. *Conserv. Ecol.* 6:11. <https://doi.org/10.5751/ES-00404-060111>
- Fritsch, C., Appenzeller, B., Burkart, L., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Raoul, F., Driget, V., Powolny, T., Gagnaison, C., Rieffel, D., Afonso, E., Goydadin, A.-C., Hardy, E.M., Palazzi, P., Schaeffer, C., Gaba, S., Bretagnolle, V., Bertrand, C., Pelosi, C., (2022). Pervasive exposure of wild small mammals to legacy and currently used pesticide mixtures in arable landscapes. *Sci. Rep.* 12, 15904. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19959-y>
- Gaffard, A., Loiseau, C., Bretagnolle, V., Pays, O., Moreau, J., (2022a). Sublethal effects of pesticide residues differ between strains of captive Grey partridge: Consequences in terms of rearing conditions. *Appl. Anim. Behav. Sci.* 257, 105791. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2022.105791>
- Gaffard, A., Pays, O., Monceau, K., Teixeira, M., Bretagnolle, V., Moreau, J., (2022b). Feeding on grains containing pesticide residues is detrimental to offspring development through parental effects in grey partridge. *Environ. Pollut.* 312, 120005. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.120005>
- Geissen, V., Silva, V., Lwanga, E.H., Beriot, N., Oostindie, K., Bin, Z., Pyne, E., Busink, S., Zomer, P., Mol, H., Ritsema, C.J., (2021). Cocktails of pesticide residues in conventional and organic farming systems in Europe – Legacy of the past and turning point for the future. *Environ. Pollut.* 278, 116827. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116827>

- Giorio, C., Safer, A., Sánchez-Bayo, F., Tapparo, A., Lentola, A., Girolami, V., van Lexmond, M.B., Bonmatin, J.-M., (2021). An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 1: new molecules, metabolism, fate, and transport. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 28, 11716–11748. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0394-3>
- Goulson, D., (2013). Review: An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *J. Appl. Ecol.* 50, 977–987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>
- Groh, K., vom Berg, C., Schirmer, K., Tlili, A., (2022). Anthropogenic chemicals as underestimated drivers of biodiversity loss: scientific and societal implications. *Environ. Sci. Technol.* 56, 707–710. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c08399>
- Hayne, D.W., (1949). Calculation of size of home range. *J. Mammal.* 30, 1. <https://doi.org/10.2307/1375189>
- Hladik, M.L., Vandever, M., Smalling, K.L., (2016). Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. *Sci. Total Environ.* 542, 469–477. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.077>
- 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. *Environ. Res.* 177, 108589. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.108589>
- Kenward, R. (2001). *A manual for wildlife radio tagging*, 2nd edition. New York: Academic Press. 350 pp.
- Kienzler, A., Bopp, S.K., van der Linden, S., Berggren, E., Worth, A., (2016). Regulatory assessment of chemical mixtures: Requirements, current approaches and future perspectives. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 80, 321–334. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.05.020>
- Kortenkamp, A., Backhaus, T., Faust, M., (2009). State of the art report on mixture toxicity. Final report. 070307/2007/485103/ETU/D.1, 391 pp
- Kuijper, D.P.J., Oosterveld, E., Wymenga, E., (2009). Decline and potential recovery of the European grey partridge (*Perdix perdix*) population—a review. *Eur. J. Wildl. Res.* 55, 455–463.
- Larras, F., Charles, S., Chaumot, A., Pelosi, C., Le Gall, M., Mamy, L., Beaudouin, R., (2022). A critical review of effect modeling for ecological risk assessment of plant protection products. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 29, 43448–43500. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19111-3>



- Lennon, R.J., Shore, R.F., Pereira, M.G., Peach, W.J., Dunn, J.C., Arnold, K.E., Brown, C.D., (2020). High prevalence of the neonicotinoid clothianidin in liver and plasma samples collected from gamebirds during autumn sowing. *Sci. Total Environ.* 742, 140493.
- Lewis, K.A., Tzilivakis, J., Warner, D.J., Green, A., (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Hum. Ecol. Risk Assess.* 1050–1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Li, Y., Miao, R., Khanna, M., (2020). Neonicotinoids and decline in bird biodiversity in the United States. *Nat Sustain* 3, 1027–1035. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-0582-x>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Blas, E.G., Camarero, P.R., Mougeot, F., Mateo, R., (2015b). Adverse effects of thiram-treated seed ingestion on the reproductive performance and the offspring immune function of the red-legged partridge. *Environ. Toxicol. Chem.* 34, 1320–1329.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Camarero, P.R., Mougeot, F., Mateo, R., (2015a). Assessing the risk of fipronil-treated seed ingestion and associated adverse effects in the red-legged partridge. *Environ. Sci. Tech.* 49, 13649–13657.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M.E., Mougeot, F., Mateo, R., (2013). Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology* 22, 125–138.
- Matson, K. D., Horrocks, N. P. C., Versteegh, M. A., & Tieleman, B. I., (2012). Baseline haptoglobin concentrations are repeatable and predictive of certain aspects of a subsequent experimentally-induced inflammatory response. *Comp. Biochem. Physiol. Part A Mol. Integr. Physiol.* 162(1), 7–15. <https://doi.org/10.1016/j.cbpa.2012.01.010>
- Millsbaugh, J.J. (2001). Radio tracking and animal populations. Academic Press, San Diego.
- Mirtl, M., T. Borer, E., Djukic, I., Forsius, M., Haubold, H., Hugo, W., Jourdan, J., Lindenmayer, D., McDowell, W.H., Muraoka, H., Orenstein, D.E., Pauw, J.C., Peterseil, J., Shibata, H., Wohner, C., Yu, X., Haase, P., (2018). Genesis, goals and achievements of Long-Term Ecological Research at the global scale: A critical review of ILTER and future directions. *Sci. Total Environ.* 626, 1439–1462. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.001>
- Mitra, A., Chatterjee, C., Mandal, F.B., (2011). Synthetic chemical pesticides and their effects on birds. *Res. J. Environ. Toxicol.* 5, 81–96.
- Moreau, J., Rabdeau, J., Badenhassser, I., Giraudeau, M., Sepp, T., Crépin, M., Gaffard, A., Bretagnolle, V., Monceau, K., (2022). Pesticide impacts on avian species with special

- reference to farmland birds: a review. *Environ. Monit. Assess.* 194, 790. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10394-0>
- Pacyna-Kuchta, A.D., (2022). What should we know when choosing feather, blood, egg or preen oil as biological samples for contaminants detection? A non-lethal approach to bird sampling for PCBs, OCPs, PBDEs and PFASs. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 1–25.
- Pandey, S.P., Tsutsui, K., Mohanty, B., (2017). Endocrine disrupting pesticides impair the neuroendocrine regulation of reproductive behaviors and secondary sexual characters of red munia (*Amandava amandava*). *Physiol. Behav.* 173, 15–22.
- Panizzi, S., Suciú, N.A., Trevisan, M., (2017). Combined ecotoxicological risk assessment in the frame of European authorization of pesticides. *Sci. Total Environ.* 580, 136–146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.154>
- Peig, J., Green, A.J., (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: the scaled mass index as an alternative method. *Oikos* 118, 1883–1891. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x>
- Pelosi, C., Bertrand, C., Daniele, G., Coeurdassier, M., Benoit, P., Nélieu, S., Lafay, F., Bretagnolle, V., Gaba, S., Vulliet, E., Fritsch, C., (2021). Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agric. Ecosyst. Environ.* 305, 107167. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107167>
- Persson, L., Carney Almroth, B.M., Collins, C.D., Cornell, S., de Wit, C.A., Diamond, M.L., Fantke, P., Hassellöv, M., MacLeod, M., Ryberg, M.W., Søgaard Jørgensen, P., Villarrubia-Gómez, P., Wang, Z., Hauschild, M.Z., (2022). Outside the safe operating space of the planetary boundary for novel entities. *Environ. Sci. Technol.* 56, 1510–1521. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c04158>
- Potts, G.R., Aebischer, N.J., (2008). Population dynamics of the Grey Partridge *Perdix perdix* 1793-1993: monitoring, modelling and management. *Ibis* 137, S29–S37. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1995.tb08454.x>
- Quaye, I. K., (2008). Haptoglobin inflammation and disease. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 102(8), 735–742. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.04.010>
- Rodrigues, A., Gaffard, A., Moreau, J., Monceau, K., Delhomme, O., Millet, M., (2023). Analytical development for the assessment of pesticide contaminations in blood and plasma of wild birds: The case of grey partridges (*Perdix perdix*). *J. Chromatogr. A* 1687, 463681. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463681>

- Rosenberg, K.V., Dokter, A.M., Blancher, P.J., Sauer, J.R., Smith, A.C., Smith, P.A., Stanton, J.C., Panjabi, A., Helft, L., Parr, M., Marra, P.P., (2019). Decline of the North American avifauna. *Science* 366, 120–124. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1313>
- Sabatier, P., Poulenard, J., Fanget, B., Reyss, J.-L., Develle, A.-L., Wilhelm, B., Ployon, E., Pignol, C., Naffrechoux, E., Dorioz, J.-M., Montuelle, B., Arnaud, F., (2014). Long-term relationships among pesticide applications, mobility, and soil erosion in a vineyard watershed. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111, 15647–15652. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411512111>
- Schell, T., Goedkoop, W., Zubrod, J.P., Feckler, A., Lüderwald, S., Schulz, R., Bundschuh, M., (2018). Assessing the effects of field-relevant pesticide mixtures for their compliance with the concentration addition model – An experimental approach with *Daphnia magna*. *Sci Total Environ.* 644, 342–349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.334>
- Scholz, S., Nichols, J.W., Escher, B.I., Ankley, G.T., Altenburger, R., Blackwell, B., Brack, W., Burkhard, L., Collette, T.W., Doering, J.A., Ekman, D., Fay, K., Fischer, F., Hackermüller, J., Hoffman, J.C., Lai, C., Leuthold, D., Martinovic-Weigelt, D., Reemtsma, T., Pollesch, N., Schroeder, A., Schüürmann, G., von Bergen, M., (2022). The eco-exposome concept: supporting an integrated assessment of mixtures of environmental chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.* 41, 30–45. <https://doi.org/10.1002/etc.5242>
- Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) and Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), (2012), Opinion on the Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures, 50 pp
- Sotherton, N.W., Aebischer, N.J., Ewald, J.A., (2014). Research into action: grey partridge conservation as a case study. *J. Appl. Ecol.* 51, 1–5.
- Stanton, R.L., Morrissey, C.A., Clark, R.G., (2018). Analysis of trends and agricultural drivers of farmland bird declines in North America: A review. *Agric. Ecosyst. Environ.* 254, 244–254. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.11.028>
- Stephen, C., Duff, J.P., Gavier-Widen, D., Ryser-Degiorgis, M.P., Uhart, M.M., Sleeman, J., Nguyen, N., Zimmer, P., Grillo, T., Lee, H., Rijks, J., Tana, T., (2018). Proposed attributes of national wildlife health programmes. *Rev. Sci. Tech. OIE* 37, 925–936. <https://doi.org/10.20506/37.3.2896>
- Tekindal, M.A., Erdoğan, B.D., Yavuz, Y., (2017). Evaluating left-censored data through substitution, parametric, semi-parametric, and nonparametric methods: a simulation study.

- Interdiscip. Sci. Comput. Life Sci. 9, 153–172. <https://doi.org/10.1007/s12539-015-0132-9>
- Topping, C.J., Aldrich, A., Berny, P., (2020). Overhaul environmental risk assessment for pesticides. *Science* 367, 360–363. <https://doi.org/10.1126/science.aay1144>
- Valverde, I., Espín, S., Gómez-Ramírez, P., Sánchez-Virosta, P., García-Fernández, A.J., Berny, P., (2022). Developing a European network of analytical laboratories and government institutions to prevent poisoning of raptors. *Environ. Monit. Assess.* 194, 113. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09719-2>
- Weisner, O., Frische, T., Liebmann, L., Reemtsma, T., Roß-Nickoll, M., Schäfer, R.B., Schäffer, A., Scholz-Starke, B., Vormeier, P., Knillmann, S., Liess, M., (2021). Risk from pesticide mixtures – The gap between risk assessment and reality. *Sci. Total Environ.* 796, 149017. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149017>
- Williams, O. (2015). The Woodcock Network. <http://www.ringwoodcock.net/index.shtml>  
Accessed date: 12 October 2022.
- Worton, B.J., (1989). Kernel methods for estimating the utilization distribution in home-range studies. *Ecology* 70, 164–168. <https://doi.org/10.2307/1938423>
- Zaller, J.G., Kruse-Platz, M., Schlechtriemen, U., Gruber, E., Peer, M., Nadeem, I., Formayer, H., Hutter, H.-P., Landler, L., (2022). Pesticides in ambient air, influenced by surrounding land use and weather, pose a potential threat to biodiversity and humans. *Sci. Total Environ.* 838, 156012. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156012>

## Figures captions

**Fig. 1 Spatial distribution across the Long-Term Socio-Ecological Research Zone Atelier Plaine & Val de Sèvres (LTSER ZAPVS) of GPS-equipped grey partridges.**

**Fig. 2 Evolution of the cumulative 95% MCP from the first day to the 30<sup>th</sup> day after release according to partridges' identity.**

**Fig. 3 Variation of the 95% MCP at 28 days post-captured of each partridge according to the date of capture.** The line corresponds to the predicted value and shading represents the 95% confidence interval.

**Fig. 4 Distribution of each partridge's  $\Delta\text{CONV}$  according to the municipality they lived in.**  $\Delta\text{CONV} > 0$  mean that partridge had more conventional surfaces in their home-range than randomness,  $\Delta\text{CONV} < 0$  mean that partridge had less conventional surfaces in their home-range than randomness.

**Fig. 5 Heatmap of the PPP TUs distribution according to partridges' identity.** PPP TUs ranged from  $1.86 \times 10^{-6}$  to 12.12. Zero was attributed when PPP concentration was  $< \text{LOD}$ .

**Fig. 6 Variation of (a)  $N_{\text{ppp}}$  and (b)  $\text{TU}_{\text{tot}}$  according to the date of capture.** The line corresponds to the predicted value and shading represents the 95% confidence interval.

**Fig. 7 Variation of (a)  $N_{\text{ppp}}$  according to  $\Delta\text{CONV}$ .** The line corresponds to the predicted value and shading represents the 95% confidence interval.  $\Delta\text{CONV} > 0$  mean that partridge had more conventional surfaces in their home-range than randomness,  $\Delta\text{CONV} < 0$  mean that partridge had less conventional surfaces in their home-range than randomness.

**Fig. 8 Variation of partridges' carotenoid concentration according to (a)  $\text{TU}_{\text{tot}}$ , (b)  $N_{\text{ppp}}$  and (c) Date of capture.** The line corresponds to the predicted value and shading represents the 95% confidence interval.

**Fig. 9 Variation of FID according to partridges'  $N_{\text{ppp}}$ .** The line corresponds to the predicted value and shading represents the 95% confidence interval.

Fig. 1

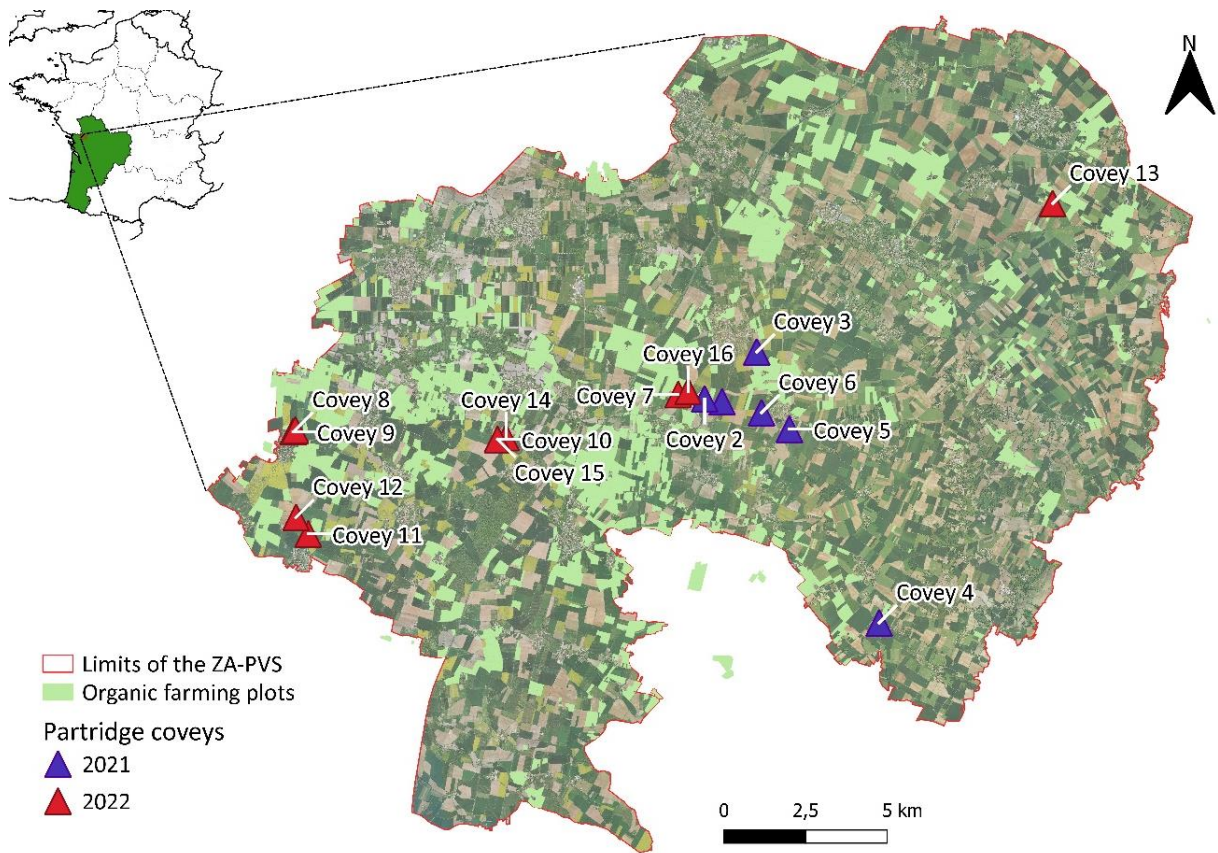


Fig. 2

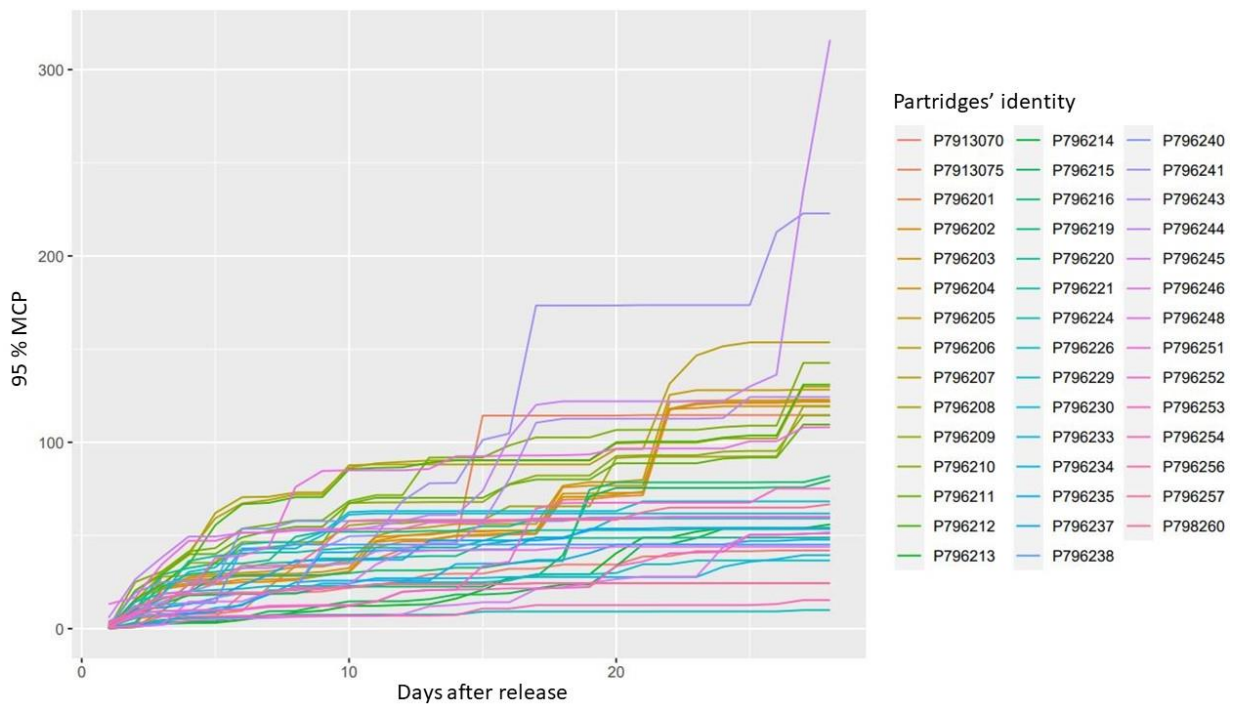


Fig. 3

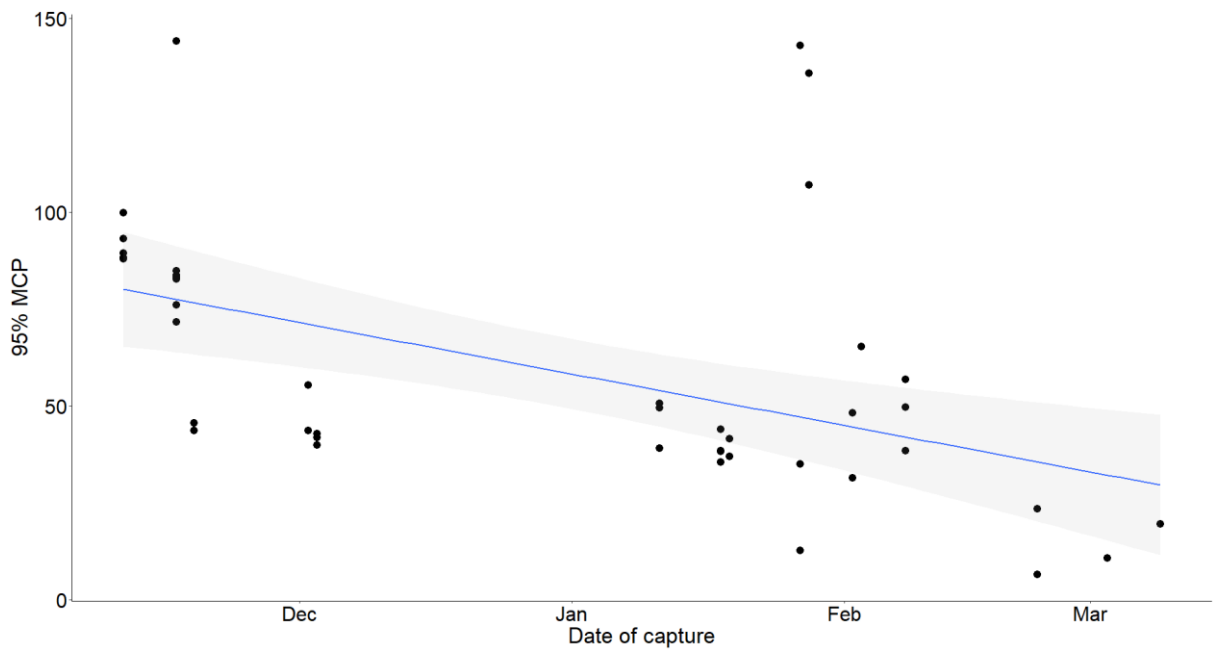


Fig. 4

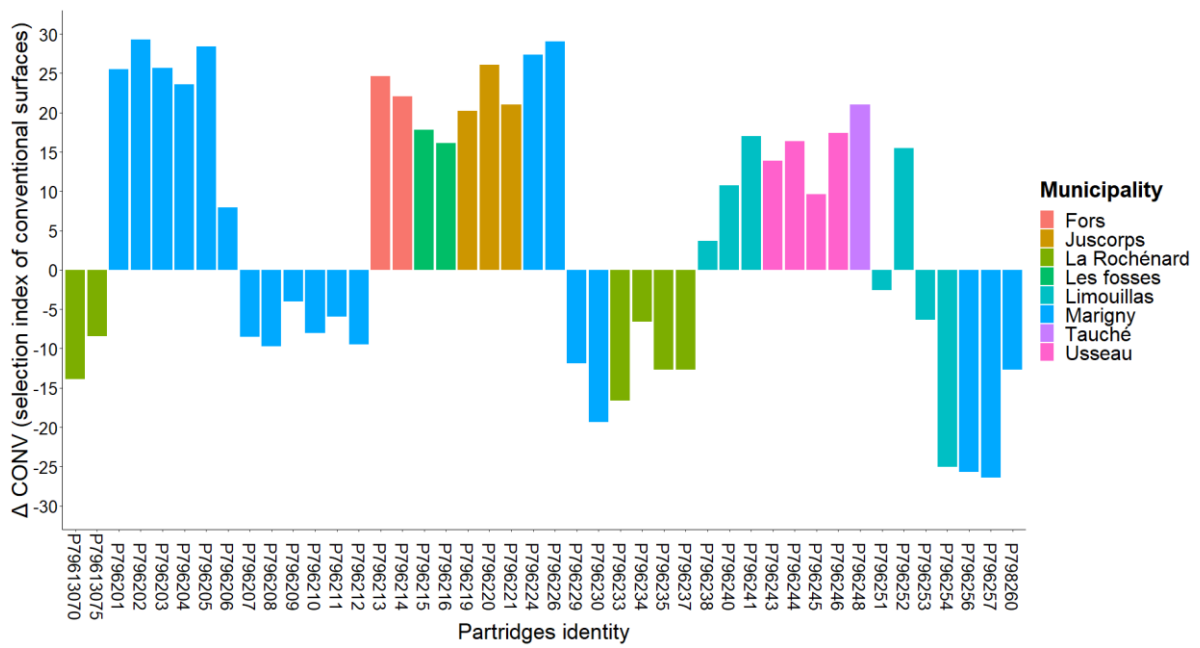


Fig. 5

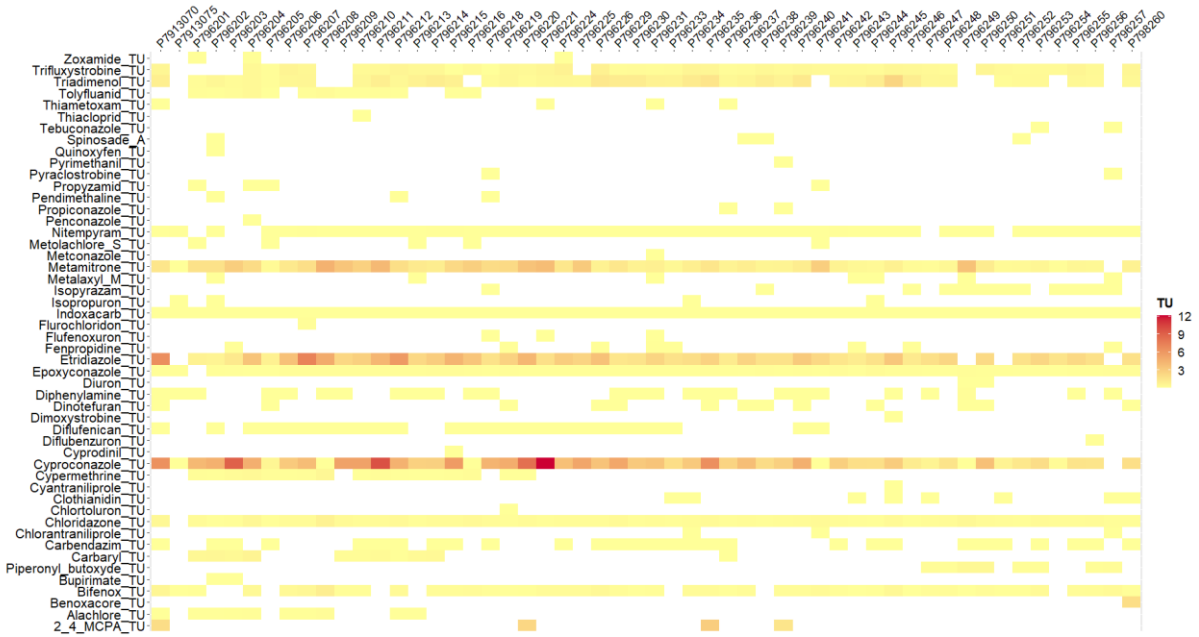


Fig. 6.a

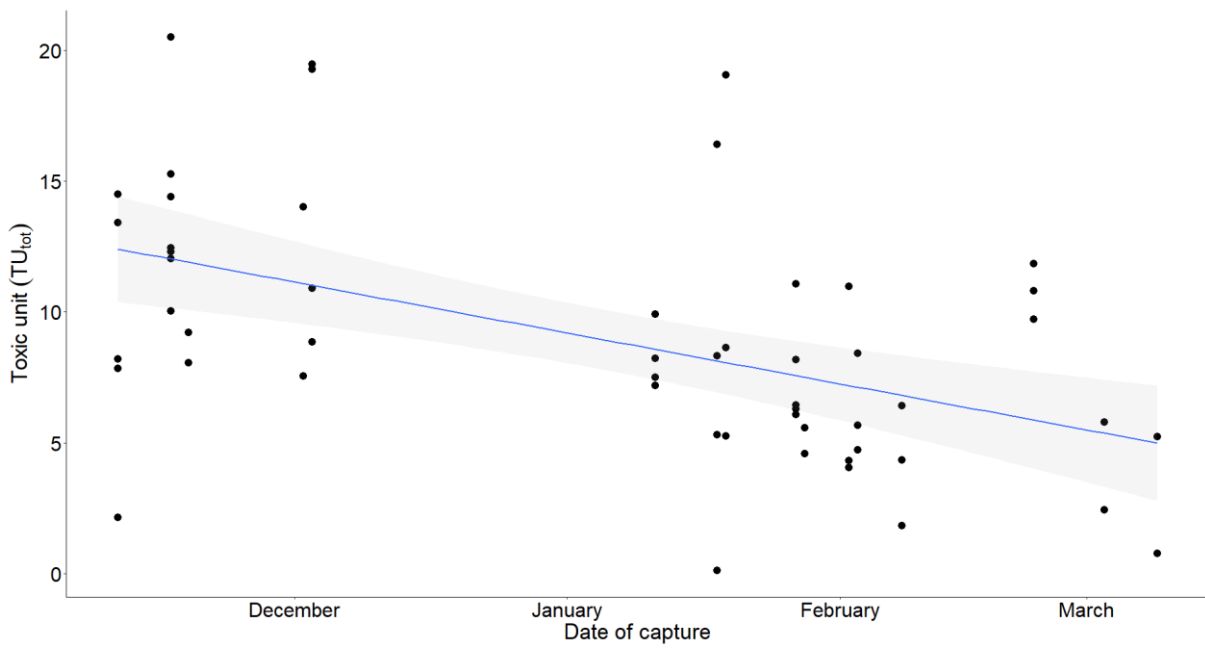


Fig. 6.b



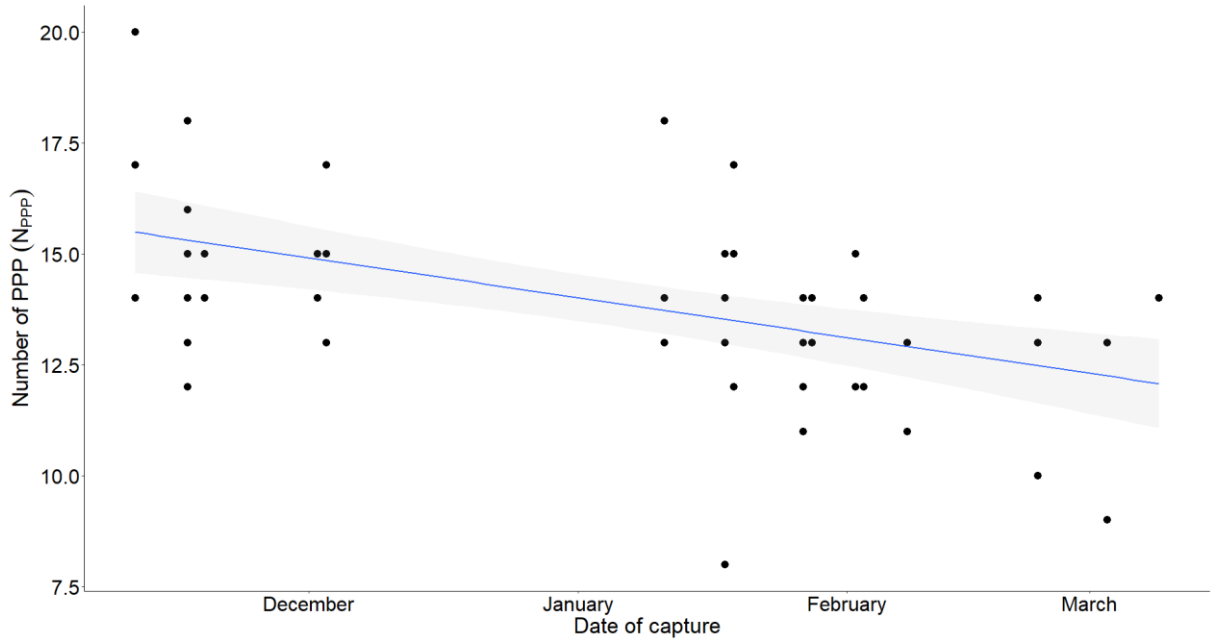


Fig. 7

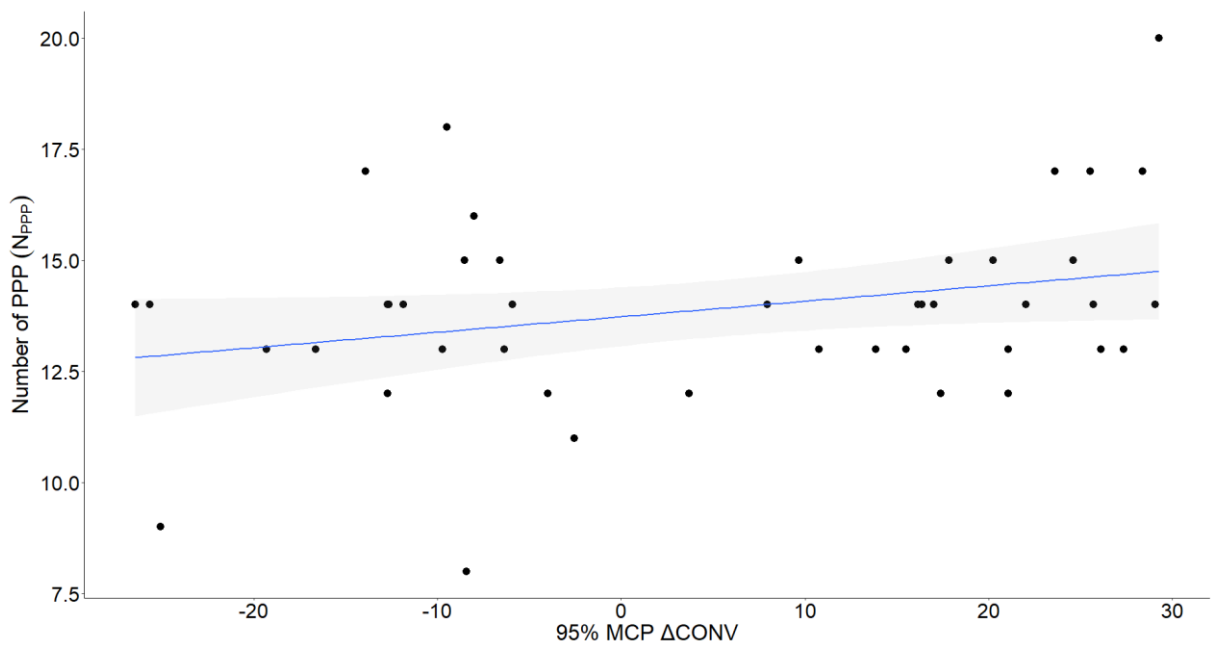
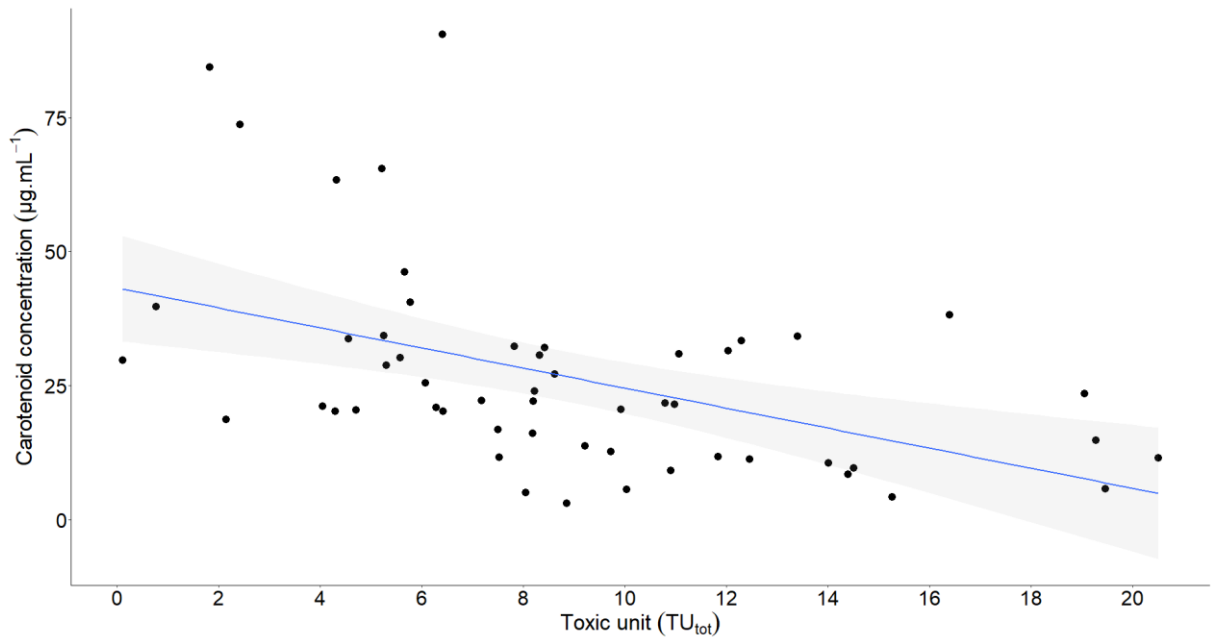
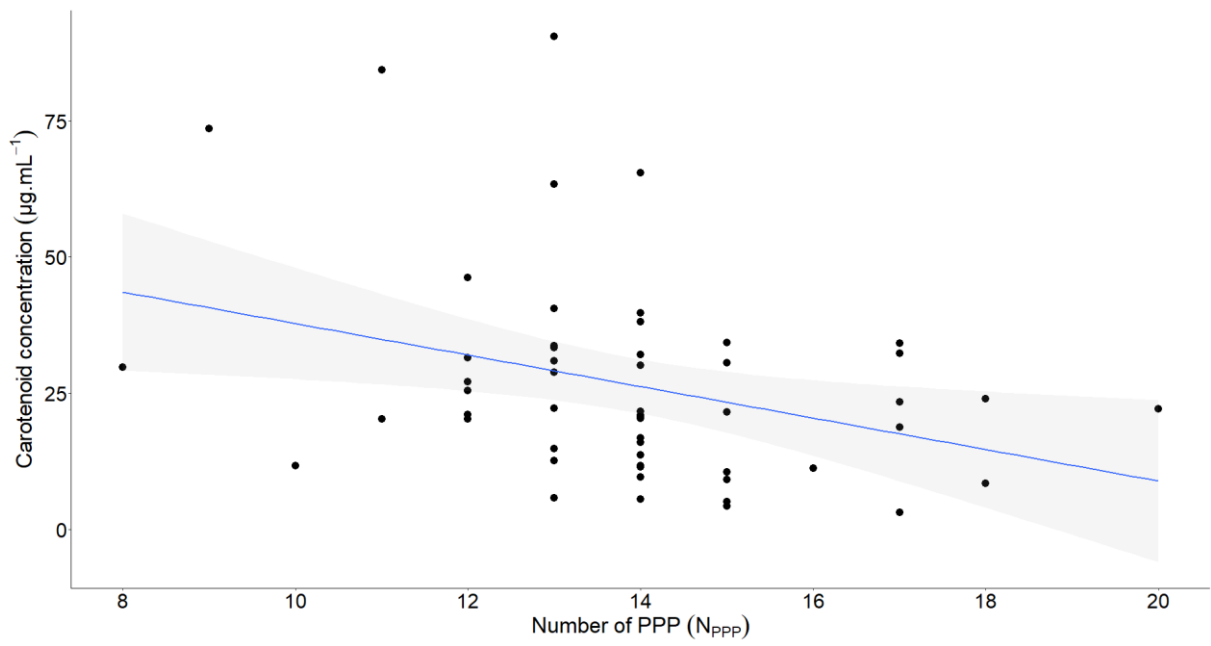


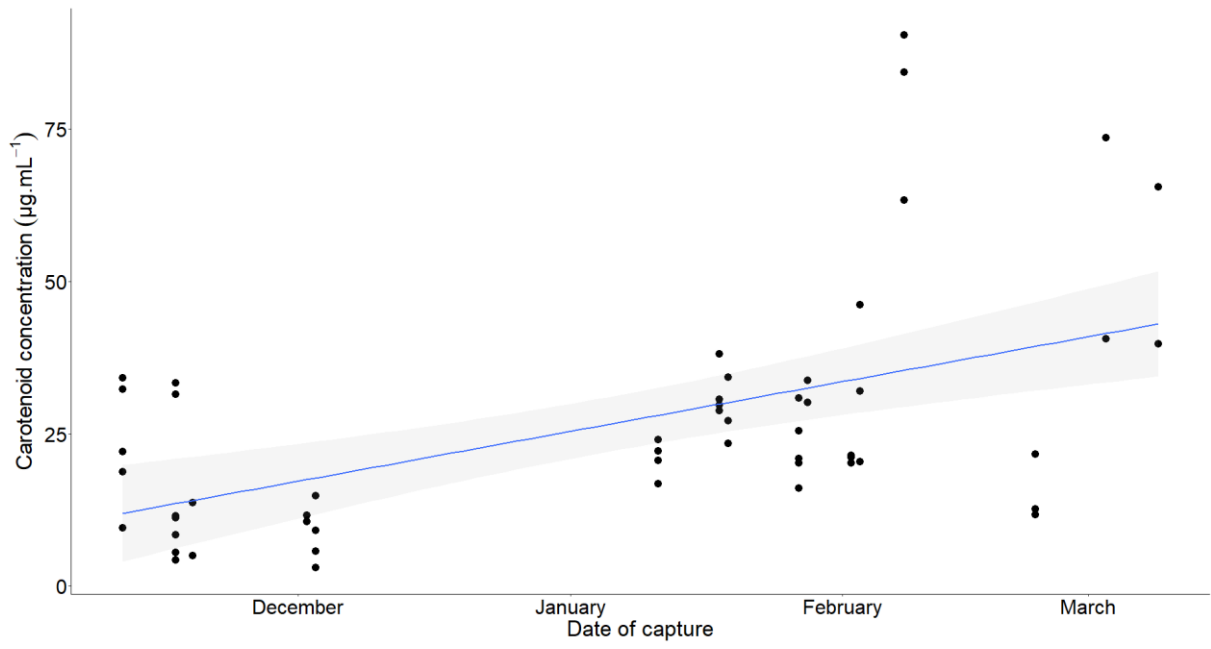
Fig. 8.a



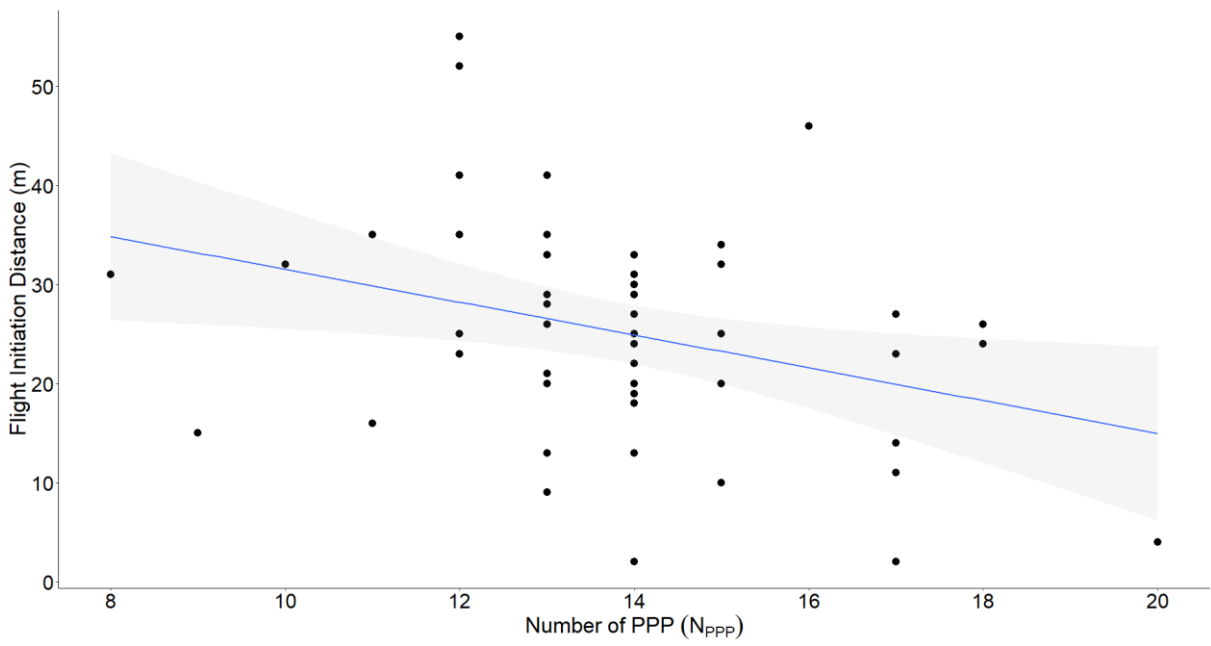
**Fig 8.b**



**Fig 8.c**



**Fig. 9**



**Table 1 Summary of the 54 grey partridges captured during the two consecutives winter (2020-2021 and 2021-2022). M mean number of males, F mean number of females.**

| Covey | Capture date | Number of partridges captured and GPS-equipped (M; F) | Covey size | Municipality         |
|-------|--------------|---|------------|----------------------|
| 1     | 10/11/2020   | 5 (3;2)   | 6          | Marigny (79360)      |
| 2     | 16/11/2020   | 7 (5;2)   | 19         | Marigny (79360)      |
| 3     | 18/11/2020   | 2 (1;1)   | 2          | Fors (79230)         |
| 4     | 01/12/2020   | 2 (1;1)   | 5          | Les Fosses (79360)   |
| 5     | 02/12/2020   | 3 (1;2)   | 9          | Juscorps (79230)     |
| 6     | 22/02/2021   | 2 (0;2)   | 6          | Marigny (79360)      |
| 7     | 10/01/2022   | 4 (2;2)   | 5          | Marigny (79360)      |
| 8     | 17/01/2022   | 4 (2;2)   | 4          | La Rochénard (79270) |
| 9     | 18/01/2022   | 2 (2;0)   | 18         | La Rochénard (79270) |
| 10    | 26/01/2022   | 4 (3;1)   | 5          | Limouillas (79360)   |
| 11    | 27/01/2022   | 2 (2;0)   | 10         | Usseau (79210)       |
| 12    | 01/02/2022   | 3 (1;2)   | 3          | Usseau (79210)       |
| 13    | 02/02/2022   | 2 (1;1)   | 3          | Tauché (79370)       |
| 14    | 07/02/2022   | 3 (2;1)   | 3          | Limouillas (79360)   |
| 15    | 02/03/2022   | 3 (1;2)   | 3          | Limouillas (79360)   |
| 16    | 08/03/2022   | 4 (2;2)   | 4          | Marigny (79360)      |

**Table 2 Characteristics of the 50 PPP detected in the 54 partridges blood samples ordered by decreasing numbers of occurrences (> LOD).**

Lab species for the Bird LD50: *Colinus virginianus*, *Coturnix. c. japonica*, *Anas platyrhynchos*, *Phasianus sp.*, *Serinus canaria*. EC Regulation refers to the EC regulation 1107/2009 status with year of approval expiration. Farm mean farming use, Dom mean domestic use. \*\*\* not a PPP, may be authorised at national level under different legislation; ND mean that LOD and LOQ could not have been determined.

| Name               | Type         | Chemical family      | Use   | EC regulation | Expiration of approval | Bird LD50 (mg.kg <sup>-1</sup> ) | LOD × 10 <sup>-3</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> ) | LOQ × 10 <sup>-3</sup> (mg.kg <sup>-1</sup> ) | Detected samples | Concentration min (mg.kg <sup>-1</sup> ) | Concentration max (mg.kg <sup>-1</sup> ) | Mean concentration (mg.kg <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|--------------|----------------------|-------|---------------|------------------------|----------------------------------|---|---|------------------|--|--|---|
| Indoxacarb         | Insecticide  | Oxadiazine           | Farm  | disapproved   | 2021                   | 73.5                             | 0.007   | 0.023   | 54               | 0.00013                                  | 0.00071                                  | 0.00044                                   |
| Chloridazon        | Herbicide    | Pyridazinone         | Farm  | disapproved   | 2018                   | 2000                             | 0.021   | 0.071   | 53               | 0.00045                                  | 5.90040                                  | 1.91379                                   |
| Cyproconazole      | Fungicide    | Triazole             | Farm  | disapproved   | 2021                   | 94                               | 0.019   | 0.064   | 53               | 0.09214                                  | 1.58314                                  | 0.42507                                   |
| Epoxiconazole      | Fungicide    | Triazole             | Farm  | disapproved   | 2020                   | 2000                             | 0.003   | 0.009   | 53               | 0.00037                                  | 1.13896                                  | 0.32000                                   |
| Metamitron         | Herbicide    | Triazinone           | Farm  | approved      | -                      | 1302                             | 0.058   | 0.192   | 53               | 0.04391                                  | 0.41435                                  | 0.17506                                   |
| Etridiazole        | Fungicide    | Heteroaromatic       | Farm  | disapproved   | 2021                   | 560                              | 0.188   | 0.625   | 50               | 0.36766                                  | 4.04669                                  | 1.44374                                   |
| Nitenpyram         | Insecticide  | Neonicotinoid        | Dom   | ***           | -                      | 1124                             | 0.009   | 0.03  | 50               | 0.00071                                  | 0.04251                                  | 0.01940                                   |
| Bifenox            | Herbicide    | Diphenyl-ether       | Farm  | approved      | -                      | 2000                             | 0.001   | 0.004   | 46               | 0.00045                                  | 1.99531                                  | 0.39431                                   |
| Triadimenol        | Fungicide    | Triazole             | Farm  | disapproved   | 2019                   | 2000                             | 0.053   | 0.175   | 45               | 0.29202                                  | 4.91836                                  | 1.35917                                   |
| Trifloxystrobin    | Fungicide    | Oximino-acetate      | Farm  | approved      | -                      | 2000                             | 0.039   | 0.132   | 45               | 0.00045                                  | 1.65765                                  | 0.74020                                   |
| Carbendazim        | Fungicide    |                      | Dom   | disapproved   | 2014                   | 2250                             | 0.004   | 0.014   | 29               | 0.00004                                  | 0.00330                                  | 0.00049                                   |
| Diflufenican       | Herbicide    | Carboxamide          | Farm  | approved      | -                      | 2150                             | 0.013   | 0.043   | 27               | 0.00000                                  | 0.00096                                  | 0.00009                                   |
| Diphenylamine      | Fungicide    | Amine                | Farm  | disapproved   | 2012                   | 2250                             | 0.001   | 0.004   | 26               | 0.00045                                  | 0.24108                                  | 0.02168                                   |
| Cypermethrine      | Insecticide  | Pyrethroid           | Farm  | approved      | -                      | 9520                             | 0.001   | 0.004   | 17               | 0.00063                                  | 4.22485                                  | 1.10757                                   |
| Dinotefuran        | Insecticides | Neonicotinoid        | Dom   | ***           | -                      | 2000                             | 0.011   | 0.037   | 13               | 0.02067                                  | 0.71284                                  | 0.22007                                   |
| Tolyfluanid        | Fungicide    | Sulfonamide          | Farm  | disapproved   | 2007                   | 2000                             | 0.008   | 0.025   | 13               | 0.00209                                  | 0.01622                                  | 0.00730                                   |
| Isopyrazam         | Fungicide    | Pyrazole carboxamide | Farm  | disapproved   | 2022                   | 2000                             | 0.011   | 0.038   | 12               | 0.00058                                  | 0.02507                                  | 0.00568                                   |
| Carbaryl           | Insecticide  | Carbamate            | Farm  | disapproved   | 2006                   | 2000                             | ND  | ND  | 11               | 0.05345                                  | 1.26632                                  | 0.60694                                   |
| Alachlor           | Herbicide    | Chloro-acetanilide   | Farm  | disapproved   | 2006                   | 1536                             | 0.028   | 0.093   | 10               | 0.04377                                  | 0.22890                                  | 0.09984                                   |
| Clothianidin       | Insecticide  | Neonicotinoid        | Farm  | disapproved   | 2018                   | 430                              | 0.010   | 0.034   | 8                | 0.20205                                  | 0.92973                                  | 0.43206                                   |
| Fenpropridine      | Fungicide    | Piperidin            | Farm  | approved      | -                      | 1899                             | 0.008   | 0.025   | 8                | 0.07654                                  | 0.16033                                  | 0.10580                                   |
| Piperonyl butoxide | Insecticide  | Benzodioxol          | Farm. | ***           | -                      | 2250                             | 0.000   | 0.001   | 8                | 0.00187                                  | 0.01393                                  | 0.00514                                   |
|                    |              |                      | Dom   |               |                        |                                  |   |   |                  |  |  |   |
| Metalaxyl_M        | Fungicide    | Phenylamide          | Farm  | approved      | -                      | 981                              | 0.000   | 0.001   | 7                | 0.00111                                  | 0.00569                                  | 0.00267                                   |
| Metolachlore-S     | Herbicide    | Chloro-acetanilide   | Farm  | approved      | -                      | 2000                             | 0.01  | 0.032   | 5                | 0.00583                                  | 0.03616                                  | 0.01484                                   |
| 2,4-MCPA           | Herbicide    | Phenoxy-carboxylate  | Farm  | approved      |                        | 377                              | 0.158   | 0.158   | 4                | 0.58359                                  | 1.10516                                  | 0.82891                                   |
| Isoproturon        | Herbicide    | Urea                 | Farm  | disapproved   | 2016                   | 1401                             | 0.002   | 0.006   | 4                | 0.00852                                  | 0.07357                                  | 0.04459                                   |
| Propyzamid         | Herbicide    | Benzonitrile         | Farm  | approved      | -                      | 6578                             | 0.002   | 0.007   | 4                | 0.00120                                  | 0.02317                                  | 0.00700                                   |

Chapitre IV

|                     |             |                    |           |             |      |       |       |       |   |         |         |         |
|---------------------|-------------|--------------------|-----------|-------------|------|-------|-------|-------|---|---------|---------|---------|
| Spinosade-A         | Insecticide | Macrolid           | Farm. Dom | approved    | -    | 1333  | 0.000 | 0.001 | 4 | 0.00009 | 0.00052 | 0.00033 |
| Thiametoxam         | Insecticide | Neonicotinoid      | Farm      | disapproved | 2018 | 576   | 0.012 | 0.041 | 4 | 0.00002 | 0.00048 | 0.00019 |
| Chlorantraniliprole | Insecticide | Diamide            | Farm      | approved    | -    | 2250  | 0.001 | 0.003 | 3 | 0.00052 | 0.12512 | 0.08318 |
| Flufenoxuron        | Insecticide | Benzoylurea        | Farm      | disapproved | 2011 | 2000  | 0.011 | 0.038 | 3 | 0.00049 | 0.07850 | 0.03965 |
| Pendimethalin       | Herbicide   | Dinitroanilin      | Farm      | approved    | -    | 1421  | 0.025 | 0.083 | 3 | 0.00060 | 0.00548 | 0.00365 |
| Zoxamide            | Fungicide   | Benzamide          | Farm      | approved    | -    | 2000  | 0.024 | 0.081 | 3 | 0.00079 | 0.00590 | 0.00260 |
| Bupirimate          | Fungicide   | Hydroxy-pyrimidine | Farm      | approved    | -    | 10000 | 0.023 | 0.075 | 2 | 0.03069 | 0.05030 | 0.04049 |
| Diuron              | Herbicide   | Urea               | Farm      | disapproved | 2008 | 1104  | 0.004 | 0.014 | 2 | 0.02167 | 0.03222 | 0.02694 |
| Propiconazole       | Fungicide   | Triazole           | Farm      | disapproved | 2018 | 2510  | 0.001 | 0.005 | 2 | 0.02045 | 0.02223 | 0.02134 |
| Pyraclostrobin      | Fungicide   | Metoxy-carbamate   | Farm      | approved    | -    | 2000  | ND    | ND    | 2 | 0.00004 | 0.00196 | 0.00100 |
| Tebuconazole        | Fungicide   | Triazole           | Farm      | approved    | -    | 1988  | 0.001 | 0.005 | 2 | 0.00029 | 0.00101 | 0.00065 |
| Benoxacore          | Herbicide   | Benzoxazine        | Farm      | ***         | -    | 2000  | ND    | ND    | 1 | 3.88259 | 3.88259 | 3.88259 |
| Chlorotoluron       | Herbicide   | Urea               | Farm      | approved    | -    | 272   | 0.008 | 0.026 | 1 | 0.43580 | 0.43580 | 0.43580 |
| Cyantraniliprole    | Insecticide | Diamide            | Farm      | approved    | -    | 2250  | 0.111 | 0.370 | 1 | 0.26759 | 0.26759 | 0.26759 |
| Cyprodinil          | Fungicide   | Anilino-pyrimidine | Farm      | approved    | -    | 500   | 0.001 | 0.004 | 1 | 0.00555 | 0.00555 | 0.00555 |
| Diflubenzuron       | Insecticide | Benzoylurea        | Farm      | disapproved | 2020 | 5000  | ND    | ND    | 1 | 0.00153 | 0.00153 | 0.00153 |
| Dimoxystrobine      | Fungicide   | Oximino-acetamide  | Farm      | approved    | -    | 2000  | 0.004 | 0.013 | 1 | 0.00089 | 0.00089 | 0.00089 |
| Flurochloridon      | Herbicide   | Phenyl-ether       | Farm      | approved    | -    | 2150  | 0.121 | 0.403 | 1 | 0.00087 | 0.00087 | 0.00087 |
| Metconazole         | Fungicide   | Triazole           | Farm      | approved    | -    | 787   | ND    | ND    | 1 | 0.00086 | 0.00086 | 0.00086 |
| Penconazole         | Fungicide   | Triazole           | Farm      | approved    | -    | 1590  | 0.001 | 0.003 | 1 | 0.00078 | 0.00078 | 0.00078 |
| Pyrimethanil        | Fungicide   | Anilino-pyrimidine | Farm      | approved    | -    | 2000  | 0.150 | 0.500 | 1 | 0.00025 | 0.00025 | 0.00025 |
| Quinoxyfen          | Fungicide   | Quinolein          | Farm      | disapproved | 2019 | 2250  | 0.005 | 0.016 | 1 | 0.00007 | 0.00007 | 0.00007 |
| Thiacloprid         | Insecticide | Neonicotinoid      | Farm      | disapproved | 2018 | 35    | 0.001 | 0.005 | 1 | 0.00007 | 0.00007 | 0.00007 |

**Table 3 Effect of  $\Delta$ CONV on partridges' PPP load  $TU_{tot}$  and  $N_{ppp}$  determined using LM.**  $\beta \pm SE$  were extracted from minimal models including only significant factors. Time mean date of capture.

| Response variables | Fixed factors | F ratio test                | $\beta \pm SE$               |
|--------------------|---------------|-----------------------------|------------------------------|
| $TU_{tot}$         | $\Delta$ CONV | $F_{1,42} = 0.67, P = 0.42$ | Intercept = $9.09 \pm 0.82$  |
| $N_{ppp}$          | $\Delta$ CONV | $F_{1,42} = 3.71, P = 0.06$ | Intercept = $13.73 \pm 0.33$ |

**Table 4 Effects of TU<sub>tot</sub> and N<sub>ppp</sub> on partridges' health parameters determined using LM.**  $\beta \pm SE$  were extracted from minimal models including only significant factors. Significant effects are in bold. Time mean date of capture.

|  |                   | TU <sub>tot</sub>                             |                           | N <sub>ppp</sub> |  |   |
|--|-------------------|---|---------------------------|------------------|--|---|
| Response variables                     | Fixed factors     | F ratio test                                  | $\beta \pm SE$            | Fixed factors    | F ratio test                             | $\beta \pm SE$                                  |
| Body condition (g)                     | TU <sub>tot</sub> | F <sub>1,52</sub> = 0.03, P = 0.95            | Intercept = 389.41 ± 8.83 | N <sub>ppp</sub> | F <sub>1,50</sub> = 0.02, P = 0.99       | Intercept = 390.29 ± 26.90                      |
| Log Haptoglobin (mg.mL <sup>-1</sup> ) | TU <sub>tot</sub> | F <sub>1,50</sub> = 3.07, P = 0.09            | Intercept = -1.19 ± 0.07  | N <sub>ppp</sub> | F <sub>1,48</sub> = 0.02, P = 0.88       | Intercept = -1.33 ± 0.22                        |
| Carotenoid (µg.mL <sup>-1</sup> )      | TU <sub>tot</sub> | <b>F<sub>1,52</sub> = 14678, P &lt; 0.001</b> | <b>-1.87 ± 0.48</b>       | N <sub>ppp</sub> | <b>F<sub>1,52</sub> = 6.40, P = 0.01</b> | <b>-2.90 ± 1.14</b>                             |
| Flight initiation distance (m)         | TU <sub>tot</sub> | F <sub>1,50</sub> = 0.89, P = 0.35            | Intercept = 22.22 ± 3.40  | N <sub>ppp</sub> | <b>F<sub>1,50</sub> = 6.15, P = 0.01</b> | Intercept = 48.09 ± 9.39<br><b>-1.66 ± 0.67</b> |



# DISCUSSION GENERALE



Depuis plusieurs décennies, le déclin des oiseaux spécialistes des milieux agricoles anime le monde scientifique à travers une large documentation sur les causes et les conséquences de ce phénomène. Une des questions clefs porte sur la part de responsabilité des pesticides dans cette tendance par rapport aux autres causes (changement climatique, homogénéisation du paysage, urbanisation...), car les études menées jusqu'ici indiquent des relations de cause à effet sans pour autant identifier clairement les mécanismes sous-jacents. La question du risque de l'utilisation des pesticides sur la faune sauvage est complexe à différents niveaux, impliquant des législations locales et internationales, des questions méthodologiques et des processus biologiques. L'un des défis majeurs est donc de fournir des faits pertinents sur le plan biologique pour une meilleure évaluation de ces risques. Ainsi, l'objectif de cette thèse était de faire avancer le front de science concernant les effets sublétaux des pesticides sur les traits d'histoire de vie des oiseaux spécialistes des milieux agricoles à l'aide d'une approche systémique.

Un des premiers enjeux de la thèse était de mettre en place des protocoles expérimentaux réalisés en conditions contrôlées qui se rapprochent au mieux de ce qui se déroule *in natura*. Les études publiées sur les relations entre l'altération des traits d'histoire de vie des oiseaux et leur exposition aux pesticides reposent sur des manipulations expérimentales en laboratoire, utilisant des espèces modèles maintenues en captivité depuis plusieurs générations et exposées généralement à des doses de pesticides non représentatives de celles retrouvées dans l'environnement. Ces tests négligent les différences de sensibilité interspécifique, les multiples voies d'exposition auxquelles les individus sont soumis sur le terrain tels que les effets cocktails, mais aussi l'impact de ces effets à des échelles populationnelles. Dans le chapitre I, nous avons montré que la réponse à une exposition aux pesticides pouvait varier en fonction de la lignée génétique de perdrix grises issues soit de captivité à long terme soit de lignée sauvage. Le chapitre II nous a permis de démontrer que l'exposition à des pesticides chez des adultes de perdrix grises pouvait avoir des conséquences délétères sur la génération suivante à travers des effets parentaux. Enfin, le chapitre III nous a permis de mettre en lumière les cocktails de pesticides présents dans le sang de perdrix grises captives peu importe leur exposition (alimentation biologique *versus* conventionnelle) mais aussi de lier la toxicité des cocktails avec leur état de santé. Le second enjeu de cette thèse était d'utiliser des perdrix grises sauvages comme sentinelles de leur environnement afin d'étudier les liens entre leur exposition, leur contamination et leur état de santé. Les données obtenues pour ce chapitre encore prospectif (Chapitre IV) ne permettent pas encore clairement de relier (i) l'exposition directe *in natura*

des perdrix à travers la surface cultivée en agriculture conventionnelle dans leur domaine vital avec la contamination en pesticides dans leur sang. Cependant, un effet délétère de la contamination sur leurs traits d'histoire de vie a été mis en avant.

Un des résultats majeurs obtenus à l'issue de ces quatre chapitres de thèse est l'altération de plusieurs traits d'histoire de vie des perdrix suite à une exposition à des cocktails de pesticides. Que ce soit en captivité ou dans la nature, des paramètres physiologiques, comportementaux et liés à la reproduction des perdrix ont été affectés. Ces altérations pourraient être le résultat d'un stress physiologique global induit par la métabolisation des pesticides et la mise en place de processus de détoxification coûteux pour les oiseaux. Ces résultats soulèvent ainsi plusieurs interrogations concernant la plasticité phénotypique des individus dans leur réponse à la contamination, notamment par rapport aux différences de sensibilité observées entre les individus, entre les lignées génétiques et entre les milieux de vie (en captivité ou *in natura*).

Le second résultat majeur de cette thèse porte sur la contamination ubiquitaire des perdrix par des cocktails de pesticides. Bien que l'exposition et la contamination des individus varient en fonction du milieu de vie (i.e., captivité *versus in natura*), l'omniprésence des mélanges de pesticides couramment utilisés, mais aussi interdits d'utilisation, soulève des questions sur les sources d'exposition des oiseaux. En effet, il semble que la contamination ne soit pas influencée par l'alimentation (grains biologiques *versus* conventionnels) (Chapitre III) ni l'évitement des parcelles conventionnelles (Chapitre IV). En revanche, l'absence d'effets sur les traits d'histoire de vie des perdrix nourries avec des grains biologiques suggère que ces derniers pourraient être un levier d'atténuation des effets sublétaux des pesticides. Cette hypothèse soulève aussi des questions sur la capacité des parcelles cultivées en agriculture biologique à devenir des zones refuges à l'exposition aux pesticides. Le chapitre IV suggère pour le moment que les surfaces biologiques disponibles (et les autres composantes du paysage hors parcelles conventionnelles) pour les perdrix sur la ZAPVS ne seraient pas encore suffisantes pour être une zone refuge et diluer le risque d'exposition et de contamination aux pesticides.

Ainsi, les résultats issus de cette thèse permettent de mettre en lumière de nombreuses pistes de recherches à explorer autour de la question des pesticides et de leur impact sur la faune sauvage. Premièrement, il semble nécessaire d'améliorer nos connaissances sur les processus de bioaccumulation et de détoxification des pesticides par les oiseaux, à l'aide d'expériences *in vitro* afin de limiter l'expérimentation animale et les biais liés à la captivité. Dans un second temps, cette thèse promeut l'utilisation du biomonitoring d'espèces sentinelles, comme la perdrix grise, afin de surveiller la contamination des écosystèmes à une échelle locale. Ce type de suivi peut

être un outil de développement et de mise en place de zones refuges à l'exposition aux pesticides, bien que de nombreuses difficultés méthodologiques résident dans le développement de ces axes de recherche.

## **1. Effets des pesticides sur les traits d'histoire de vie des perdrix**

L'approche multi traits réalisée pour les quatre chapitres de la thèse a permis de montrer que l'ingestion de grains conventionnels et/ou la contamination sanguine par les pesticides pouvaient altérer de nombreux traits d'histoire de vie de la perdrix grise. Chaque trait considéré et traité dans cette thèse peut avoir, en fonction du contexte, une importance dans la survie et/ou la reproduction des perdrix à plus ou moins long terme. Leur altération pourrait être le résultat de différents processus physiologiques complexes tels que la métabolisation des pesticides (e.g., biotransformation, bioaccumulation) ou encore des processus de détoxification. La mise en place de ces processus est dépendante de nombreux facteurs propres à la chimie de chaque molécule mais aussi à la sensibilité de l'espèce et de l'individu, des axes de recherche encore très peu étudiés dans la littérature.

### **1.1. Synthèse des principaux effets sublétaux observés**

De nombreux traits d'histoire de vie ont été suivis en fonction de l'expérience réalisée. La condition corporelle et l'hématocrite, utilisés comme proxy de l'état de santé global des individus (Ots et al. 1998), se sont révélés être des variables complexes à analyser de par leur variabilité multifactorielle. En accord avec nos prédictions, les paramètres physiologiques reflétant à la fois les réponses du système nerveux (AChE) et du système immunitaire (concentration sanguine en haptoglobine et caroténoïdes), mais aussi la mise en place des caractères sexuels secondaires (intensité du rouge autour de l'oeil) et les réponses comportementales des individus (activité, exploration et réponses anti-prédateur) se sont montrés sensibles à la contamination aux pesticides. Cependant, l'expression de ces traits sont la résultante de nombreux processus complexes et d'interactions physiologiques plus ou moins développés dans la littérature, rendant parfois l'interprétation de nos résultats complexes.

#### **1.1.1. Condition corporelle et hématocrite**

La condition corporelle et l'hématocrite des perdrix ont été mesurés lors de chaque expérience, avant et après l'exposition aux pesticides, et utilisés comme proxy de leur état de santé général. Ces deux paramètres représentent l'état nutritionnel des individus et sont connus pour varier

sous un stress physiologique (Ots et al. 1998 ; Fair et al. 2007). D'un côté, la condition corporelle s'est révélée peu sensible à la contamination aux pesticides chez les adultes, puisqu'elle n'a varié dans aucun des quatre chapitres entre avant et après l'exposition aux pesticides. Les seules variations de condition corporelle observées chez les perdrix adultes avant et après l'exposition étaient probablement liées à d'autres facteurs tels que le changement de régime alimentaire (Chapitre I) ou la prise de masse saisonnière (préparation de la reproduction ; Chapitres II et III). L'absence d'effet des pesticides sur la condition corporelle était contraire à nos prédictions, puisqu'il a été montré que l'ingestion de pesticides pouvaient diminuer la condition corporelle (Lopez-Antia et al. 2013, 2015) mais également l'augmenter (Moreau et al. 2021, Bellot et al. 2022), suggérant un rôle des pesticides dans l'altération des voies de stockage des graisses (Ruzzin et al. 2010). A l'inverse, l'hématocrite s'est avéré être une variable sensible aux pesticides mais dont les résultats ont été complexes à interpréter. En effet, les pesticides n'ont pas impacté l'hématocrite des individus dans les chapitres I et IV mais une diminution a été observée pour les chapitres II et III. Un oiseau soumis à un stress physiologique induit par l'exposition aux pesticides peut montrer un hématocrite réduit, comme cela a été montré après ingestion de néonicotinoïdes, de thiram (CB) et de lindane (OC) (Lopez-Antia et al. 2013, 2015b, 2015c ; Moreau et al. 2021). Ces résultats sont concomitants avec ceux obtenus dans les chapitres II pour les poussins issus des couples nourris avec du grain conventionnel et dans le chapitre III pour les perdrix adultes nourries avec du grain conventionnel.

Autrement, lorsque l'on combine les observations issues des différents chapitres, on remarque à plusieurs reprises une interaction entre la condition corporelle et l'hématocrite des adultes (Chapitre I, II et III), mais aussi chez les poussins issus des couples nourris avec du grain conventionnel (Chapitre II). Pourtant, l'hématocrite et la condition corporelle sont en général corrélés positivement, soulignant la bonne santé globale de l'individu (Fair et al. 2007). Dans notre cas ici, et indépendamment de l'exposition aux pesticides, la condition corporelle des perdrix adultes a diminué avec le temps dans le chapitre I alors que l'hématocrite a augmenté. A l'inverse, dans les chapitres II et III, la condition corporelle des perdrix adultes a augmenté avec le temps alors que leur hématocrite a diminué. De nombreuses études ont montré que ces deux paramètres pouvaient varier en fonction de plusieurs facteurs abiotiques (e.g., température, saison, heure de la journée) et biotiques (e.g., hydratation, période de reproduction, croissance, stress physiologique) (voir Fair et al. 2007 pour une review). Les résultats obtenus concernant ces deux variables sont donc à interpréter avec précaution. Un paramètre important

à prendre en compte pour expliquer ces résultats portent notamment sur les conditions de vie des oiseaux dans nos protocoles expérimentaux. En effet, les perdrix adultes étaient dans des conditions de mésocosmes avec de grandes volières (volières de 1000 m<sup>2</sup> pour maximum 40 oiseaux), abritant des sources de nourriture variées indépendamment des grains biologiques et conventionnels fournis *ad libitum* mais aussi soumis aux variations météorologiques. De plus, la période des expériences s'étalait sur plusieurs mois et incluait systématiquement la mise en place de la reproduction et des comportements associés (e.g., agressivité, territorialité). Par conséquent, les différents résultats constatés sur ces deux variables sont probablement la résultante de plusieurs interactions et processus physiologiques comprenant à la fois la biologie de l'espèce, les facteurs abiotiques, des compromis d'allocation des ressources, masquant potentiellement le stress physiologique induit par les pesticides.

### 1.1.2. Système nerveux et comportement

L'activité de l'AChE, une enzyme utilisée ici comme proxy de l'influx nerveux (Mitra et al. 2011) a été mesurée pour les chapitres II (adultes, poussins), III et IV (seulement pour les perdrix capturées en hiver 2021-2022). Aucun effet des pesticides n'a été observé sur cette variable dans le chapitre II, que ce soit pour les adultes ou pour les poussins ni dans le chapitre IV. En revanche, l'activité de l'AChE a diminué lorsque la toxicité du mélange augmentait chez les perdrix nourries avec du grain conventionnel (chapitre III). Ce résultat est en accord avec la littérature et nos prédictions, de nombreuses études ayant déjà montré l'effet délétère des pesticides sur le système nerveux (Casida 2009, 2011, 2018 ; Casida & Durkin 2013 ; Casida & Bryant 2017). Parallèlement, la réponse anti-prédateur, l'activité et l'exploration ont été mesurées pour les adultes des chapitres I et III et les poussins du chapitre II. Pour le chapitre IV, seule la distance de fuite a pu être mesurée pour des raisons méthodologiques (i.e., pas la possibilité de mettre en place un test en open-field lors des captures). Ces trois variables se sont montrées sensibles aux pesticides. En effet, les perdrix nourries avec du grain conventionnel et/ou les perdrix les plus contaminées ont montré une diminution de leur distance de fuite et/ou de leur exploration et/ou de leur activité. En effet, de nombreuses études ont montré que les pesticides pouvaient altérer les comportements anti-prédateur (Kobiela et al. 2015), l'activité (Eng et al. 2017, 2019) et la vigilance (de Faria et al. 2018). Lorsque l'activité de l'AChE et les comportements ont été mesurés dans la même expérience (Chapitres II, III et IV), il était notamment attendu que ces deux paramètres soient corrélés positivement. En effet, l'altération du système nerveux est souvent corrélée à une diminution de la locomotion des oiseaux (Elliott et al. 1996 ; Eng et al. 2017, 2019) ou encore une vulnérabilité accrue aux prédateurs (Hunt et

al. 1992). Cependant, cette relation n'a été observée que dans le chapitre III, où les perdrix les plus contaminées avaient une activité de l'AChE réduite et étaient aussi moins actives. Chez les poussins du chapitre II, aucun effet des pesticides n'a été observé sur l'AChE ni sur le comportement, suggérant que le traitement des parents n'a affecté que les paramètres de croissance des jeunes et non leur système nerveux. Un résultat plus étonnant est l'absence de cette corrélation chez les perdrix du Chapitre IV. En effet, les perdrix les plus contaminées ont montré une distance de fuite réduite, suggérant potentiellement une atteinte de la vigilance à travers l'altération du système nerveux. De plus, la présence de plusieurs néonicotinoïdes dans le sang aurait pu induire un effet neurotoxique (Mittra et al. 2011). Pourtant, l'activité de l'AChE n'a pas été impactée. Il est cependant important de rappeler que l'activité de l'AChE n'a pu être mesurée que pour les perdrix capturées le second hiver (2021-2022), réduisant la taille d'échantillonnage pour cette variable et donc la probabilité de détecter un effet. Autrement, la diminution de la distance de fuite pourrait aussi être la résultante de l'altération des systèmes dopaminergique ou glutamatergique (i.e., systèmes qui interagissent entre eux pour réguler l'activité neuronale et le comportement) par le biais de processus neuronaux indépendant du système cholinergique et donc de l'activité de l'AChE (Costas-Ferreira & Faro 2021).

#### 1.1.3. Système immunitaire et coloration des caractères sexuels secondaires

L'haptoglobine est une protéine de la réponse inflammatoire dont les concentrations plasmatiques peuvent augmenter rapidement en cas de stress oxydatif, i.e., lors de la production de radicaux libres (Broughton et al. 2017). Celle-ci a été mesurée pour les chapitres III et IV et utilisée comme proxy de la réponse immunitaire. Les caroténoïdes, eux, sont des pigments obtenus lors de la consommation de plantes ou d'insectes et qui sont connus non seulement pour éliminer les radicaux libres et renforcer les réponses du système immunitaire comme l'haptoglobine, mais aussi pour déterminer la coloration des caractères sexuels secondaires (Blount et al. 2003 ; McGraw & Ardia 2003 ; Baeta et al. 2008). Leur concentration peut être mesurée dans le plasma (Chapitre II, III et IV) ou à travers l'intensité du rouge de la caroncule de l'œil des perdrix puisqu'ils en déterminent la couleur (Chapitre I, II, III et IV). Durant cette thèse, nous avons remarqué que les concentrations de caroténoïdes circulant dans le plasma étaient proches de la limite de quantification, suggérant des ressources en caroténoïdes très limitées dans les volières. Les caroténoïdes ingérés par les oiseaux étaient donc probablement stockés dans la caroncule de l'œil directement réduisant fortement les concentrations plasmatiques. Par conséquent, seule l'analyse de l'intensité du rouge de la caroncule a été utilisée comme proxy de réserve en caroténoïdes pour les oiseaux captifs. En revanche pour le

chapitre IV, les concentrations en caroténoïdes des perdrix capturées *in natura* étaient bien supérieures à la limite de quantification, permettant d'exploiter cette variable. L'intensité du rouge de la caroncule de l'œil des perdrix sauvages est en cours d'analyse et sera ajouté aux résultats de l'article IV.

Dans le chapitre III, les concentrations plasmatiques d'haptoglobine augmentaient et l'intensité du rouge de la caroncule de l'œil diminuait lorsque la toxicité du cocktail et le nombre de pesticides augmentaient respectivement. Ces résultats sont en accord avec nos prédictions et la littérature. Chez la perdrix grise, la coloration rouge de la caroncule de l'œil est déterminée par la quantité de caroténoïdes stockée par l'individu. Ainsi, une faible intensité de rouge de la caroncule peut être le signal de la mobilisation des caroténoïdes dans un processus de détoxification de l'organisme (Moreau et al. 2021 ; Broughton et al. 2017). Il était donc attendu que suite à l'exposition et la contamination des perdrix aux pesticides, une réponse immunitaire se mettrait en place pour détoxifier l'organisme des radicaux libres issus de la contamination. La réponse immunitaire entraînerait donc à la fois un déstockage des caroténoïdes présents dans la caroncule et une augmentation de la concentration en haptoglobine dans le plasma. Cependant, dans le chapitre IV, seule la concentration plasmatique en caroténoïdes a diminué lorsque la toxicité du mélange augmentait. Les concentrations en haptoglobine n'étaient pas affectées par la toxicité et le nombre de pesticides dans le sang. Ces résultats soulèvent plusieurs questions, la réponse immunitaire étant complexe, s'exprimant par de nombreuses voies physiologiques et faisant appel à de nombreux composants en plus des caroténoïdes et de l'haptoglobine (Broughton et al. 2017). L'absence de variation de l'haptoglobine dans le chapitre IV peut potentiellement s'expliquer par la différence de disponibilité en caroténoïdes entre les conditions *in natura* du chapitre IV et celles en captivité du Chapitre III. En effet, pour les perdrix sauvages, l'apport en caroténoïdes était plus élevé grâce à l'alimentation diverse dont elles bénéficient. On pourrait alors supposer que les réserves en caroténoïdes des perdrix sauvages étaient suffisantes pour la détoxification des radicaux libres, et que l'augmentation de l'haptoglobine n'était pas forcément nécessaire pour appuyer la détoxification.

## 1.2. La détoxification : un mécanisme coûteux ?

L'altération des différents traits d'histoire de vie résumés ci-dessus pourrait être en partie le résultat de la métabolisation des pesticides à travers l'organisme des individus (Fig. 16). Lorsqu'un pesticide est absorbé par l'organisme, il va être distribué à différents organes à travers le flux sanguin (Fig. 16). Son devenir va ensuite principalement dépendre de ses propriétés physico-chimiques (e.g., clairance, lipophilie), les molécules et leurs métabolites



pouvant être bioaccumulés dans différentes parties de l'organisme (e.g., foie, graisses, muscles, plumes) ou être excrétés dans les œufs ou les fèces (e.g., tébuconazole : Gross et al. 2020 ; pour une review voir Katagi and Fujisawa 2021 ; Fig. 16). Un organisme dispose alors de deux moyens principaux pour réduire la toxicité d'un composé : soit il est excrété sous sa forme originale (le composé parent), soit il est biotransformé par l'organisme en métabolite(s) (Fig. 16). Dans cette situation, les oiseaux exposés aux pesticides subissent des coûts énergétiques engendrés par la mise en place de ces processus. La disponibilité de l'énergie étant limitée, les différentes fonctions physiologiques entrent en concurrence, entraînant généralement des compromis d'allocation des ressources entre survie et reproduction (McNab 2002). Bien que les axes de recherches développés au cours de cette thèse ne se soient pas centrés sur la question du devenir des pesticides dans l'organisme, les résultats obtenus dans les chapitres II, III et IV suggèrent que des processus de détoxification ont été mis en place à travers des effets parentaux (chapitre II), des compromis d'allocation des ressources (Chapitre II et III), et la mobilisation des caroténoïdes comme antioxydants (Chapitre IV).

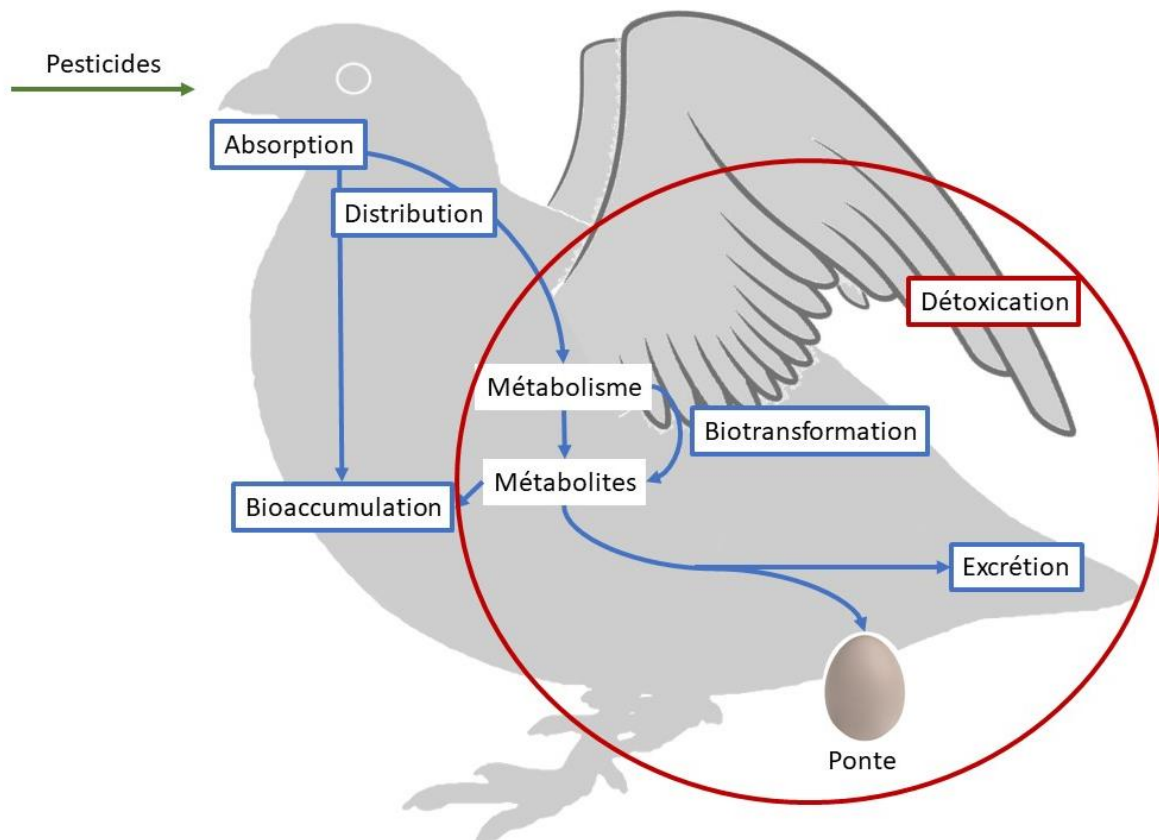


Fig. 16 : Schéma résumant les principales voies de métabolisation et d'excrétion des pesticides par les oiseaux

### 1.2.1. Détoxification par les œufs

Dans le chapitre II, les poussins issus des couples nourris avec du grain conventionnel étaient plus petits, avec une condition corporelle et un hémocrite plus faible en comparaison avec les poussins issus des couples nourris avec du grain biologique. Pour autant, les différents paramètres mesurés sur les parents n'ont pas été altérés par l'exposition aux pesticides. Ce résultat suggère l'existence d'effets parentaux suite à l'ingestion des pesticides par les parents durant la phase embryonnaire. En effet, une exposition chronique aux pesticides (quatre mois pour le chapitre II) peut entraîner une bioaccumulation des molécules dans l'organisme des parents, et par conséquent une moindre capacité du foie à métaboliser les composés qui vont alors s'accumuler dans les tissus maternels (Yang et al. 2018). Un des moyens de détoxification classique de ces molécules est de les transférer dans les œufs. En effet, la détoxification de polluants par les œufs est un mécanisme bien connu chez les oiseaux, comme cela a été observé pour le mercure (pour une review voir Ackerman et al. 2020), les substances per- et polyfluoroalkylées (Lopez-Antia et al. 2021a, Jouanneau et al. 2021), les OC (Van den Steen et al. 2009), le glyphosate (Ruuskanen et al. 2020) et le tébuconazole (Bellot et al. 2022). On peut supposer que les molécules de pesticides ingérées par les parents ont pu s'accumuler dans les tissus reproducteurs des perdrix lors de la phase embryonnaire et ont ensuite été excrétées dans les œufs, contaminant ainsi la génération suivante. L'exposition embryonnaire à des pesticides peut avoir des conséquences délétères sur le développement du poussin, affectant un large éventail de ses traits d'histoire de vie par le biais d'un déséquilibre entre la nécessité de croître et de détoxifier, à son tour, son organisme des pesticides (Ottinger et al. 2008, 2009).

### 1.2.2. Compromis d'allocation des ressources

La croissance et la prise de masse sont deux facteurs essentiels à la survie dans les premières semaines de vie du poussin (Ottinger et al. 2009). Ce sont donc dans ces paramètres que toute l'énergie des individus est sensée être allouée. Dans le chapitre II, les poussins issus des couples nourris en conventionnel, plus petits, ont probablement dû faire face à des coûts énergétiques plus élevés que les poussins biologiques afin de réduire l'impact de ces pesticides par la détoxification. De plus, les capacités de détoxification des embryons et des poussins sont inférieures à celles des adultes (Liu et al. 2019). Par conséquent, la présence de toxines dans les œufs peut ralentir la croissance embryonnaire. En effet, lorsque les coûts de maintenance (c'est-à-dire le taux métabolique, la réparation des tissus, la détoxification, etc.) deviennent prioritaires, l'énergie dépensée pour la croissance devrait être réduite (McNab 2002). Cette hypothèse est soutenue par le compromis d'allocation des ressources observé entre le stockage des graisses

et le nombre de globules rouges des poussins conventionnels après un mois de croissance alors que cette relation est inexistante chez les poussins biologiques. Ces résultats suggèrent que les poussins conventionnels ont dû faire face au principe de croissance compensatoire, leur énergie et leurs ressources devant être allouées à la détoxification des pesticides plutôt qu'à d'autres fonctions telles que la croissance (Liu et al. 2019). Le même principe de compromis d'allocation des ressources a été observé chez les perdrix adultes du chapitre III nourries avec des grains conventionnels. En effet, les individus les plus contaminés montraient une caroncule moins rouge, suggérant l'allocation des caroténoïdes dans la réponse immunitaire plutôt que dans l'ornementation. Cette hypothèse est soutenue par l'augmentation des concentrations d'haptoglobine chez ces mêmes individus probablement due à la mise en place d'un processus de détoxification. Ce compromis entre maintenance et reproduction est un compromis déjà bien documenté dans la littérature, notamment en ce qui concerne les relations entre haptoglobine et les ressources limitantes en caroténoïdes (Broughton et al. 2017 ; Moreau et al. 2021).

Ainsi, nos résultats suggèrent que l'exposition et la contamination aux pesticides entraînent la mise en place de mécanismes coûteux pour les individus en terme de survie et de reproduction. En cas d'exposition chronique et/ou d'effets synergiques entre les molécules, les processus de détoxification peuvent être saturés, conduisant à un transfert des molécules à la génération suivante et/ou à des compromis favorisant l'immunité au détriment de l'ornementation. Ces mécanismes coûteux peuvent avoir des conséquences délétères sur le long terme à l'échelle populationnelle. Plus généralement, les mécanismes de détoxification à travers les effets parentaux constituent un front de recherche qu'il est nécessaire d'explorer plus en profondeur. En effet, peu d'étude ont pu encore mettre en évidence le transfert des molécules de pesticides des parents aux poussins à travers les œufs dans le cas de cocktail de pesticides. Enfin, les effets transgénérationnels des pesticides (i.e., au-delà d'une seule génération) n'ont encore jamais été explorés. Ainsi, un axe intéressant à développer serait la mise en place d'une technique de prélèvement des composants de l'œuf pour y doser les pesticides sans pour autant impacter la survie de l'embryon. Il serait ensuite intéressant de faire une prise de sang sur l'individu pour étudier sa contamination et faire le lien avec les molécules retrouvées dans les œufs afin de mettre en lumière l'existence ou non d'un tel transfert. Une alternative serait de doser les pesticides dans les œufs non fécondés/non éclos et dans le sang des poussins éclos au sein d'une même couvée. En effet, un couple de perdrix grise maintenu en captivité peut pondre une quarantaine d'œufs, dont 20 à 30% seront non fécondés (communication personnelle de Julien Blandin). En réalisant une prise de sang sur le couple exposé aux pesticides, un dosage dans les

œufs et une prise de sang sur les poussins éclos, il serait possible de mettre en évidence le transfert des molécules à la génération suivante.

### 1.3. Différences de sensibilité dans la réponse à la contamination

Les résultats des différents chapitres démontrent les effets délétères de l'ingestion de grains conventionnels et/ou la contamination sanguine par les pesticides sur plusieurs traits d'histoire de vie des perdrix. Cependant, le croisement de ces résultats entre les chapitres soulève plusieurs interrogations concernant les différences observées dans la réponse à la contamination des oiseaux en fonction de leur lignée génétique (chapitre I) et de leur milieu de vie (chapitre III *versus* chapitre IV). Il existe de plus en plus de preuves que la faune non cible peut évoluer vers une tolérance accrue aux pesticides (Brausch et Smith 2009 ; Jansen et al. 2011 ; Cothran et al. 2013 ; Hua et al. 2017). La théorie suggère que l'évolution de la tolérance aux pesticides peut se faire via deux mécanismes : la sélection pour une tolérance constitutive sur plusieurs générations ou une tolérance au sein d'une seule génération via la plasticité phénotypique (Cothran et al. 2013 ; Hua et al. 2017). L'évolution de la tolérance constitutive est plus probable lorsque les populations sont à proximité immédiate de l'agriculture et/ou exposées de manière constante aux pesticides (Crispo 2007 ; Declerck et al. 2006). En revanche, la tolérance inductible est plus probable lorsque les populations sont éloignées de l'agriculture, plus rarement exposées aux pesticides, et qu'il y a des coûts pour maintenir la tolérance aux pesticides lorsque ceux-ci ne sont pas présents (c'est-à-dire un compromis phénotypique ; Crispo 2007 ; Crispo et al. 2010). Durant la thèse, les expériences ont été réalisées sur deux lignées génétiques de perdrix grises et deux milieux de vie différents, permettant d'aborder ici quelques questionnements autour de la sensibilité interindividuelle aux pesticides. En élevage, on peut supposer que les perdrix vivant en captivité sont moins exposées aux pesticides en comparaison aux perdrix vivant *in natura*. Cette hypothèse est soutenue par la comparaison entre la contamination des perdrix du chapitre III (captives) et celles du chapitre IV (sauvages), où les perdrix captives avaient en moyenne  $5 \pm 2$  molécules de pesticides dans le sang comparé aux sauvages qui avaient en moyenne  $13 \pm 2$  molécules dans le sang. De la même manière, la  $TU_{tot}$  des perdrix captives (moyenne  $\pm$  SE =  $0.56 \pm 0.64$ ) était significativement plus basse que la  $TU_{tot}$  des perdrix sauvages (moyenne  $\pm$  SE =  $8.92 \pm 4.79$ ). Ces différences peuvent avoir des conséquences évolutives, suggérant que les perdrix vivant *in natura* pourraient développer une plus grande tolérance et donc une moins grande sensibilité aux pesticides que les perdrix en captivité depuis plusieurs générations. La capacité de détoxification des oiseaux pourrait ainsi être influencée par la tolérance et la sensibilité des oiseaux aux pesticides. Les résultats du

chapitre I soutiennent cette hypothèse, puisque les perdrix issues de lignée d'élevage, i.e., moins exposées aux pesticides depuis plusieurs générations en comparaison avec leurs congénères issues de lignée sauvage, ont démontré une plus grande sensibilité dans leur réponse aux pesticides (i.e., diminution de la distance de fuite, de l'activité et de l'exploration). De la même façon, si l'on compare les relations entre contamination et altération des traits d'histoire de vie chez les perdrix adultes des chapitres III et IV, on remarque que les perdrix maintenues en captivité sont moins contaminées, mais pourtant plus de traits d'histoire de vie sont altérés par rapport aux perdrix sauvages. Par exemple, l'hématocrite, l'activité de l'AChE et l'haptoglobine ont diminué lorsque la toxicité augmentait dans le chapitre III. Pourtant, ces relations n'ont pas été observées dans le chapitre IV, malgré que les  $TU_{tot}$  soient plus élevées. Collectivement, nos résultats suggèrent que la tolérance aux pesticides diffère en fonction de la lignée génétique et aussi du milieu de vie. Cette sensibilité semble influencer les effets sublétaux des pesticides sur les traits d'histoire des oiseaux soulignant l'importance d'inclure les processus évolutifs dans les études écotoxicologiques.

## **2. Contamination par les mélanges de pesticides : interrogations autour des sources d'exposition et levier d'atténuation**

Le second résultat majeur de cette thèse est la mise en évidence de l'ubiquité de l'exposition et de la contamination des perdrix par les mélanges de pesticides. Les dosages de résidus de pesticides réalisés dans les grains conventionnels pour les chapitres I, II et III ont mis en lumière le risque d'exposition des oiseaux aux mélanges. Les dosages de résidus de pesticides dans le sang des perdrix des chapitres III et IV ont quant à eux mis en évidence la présence des mélanges dans le sang. Cependant, une première interrogation repose sur l'absence de corrélation entre les molécules retrouvées dans les grains et celles retrouvées dans le sang (Chapitre III). De plus, la présence de pesticides dans le sang interdits d'utilisation depuis plusieurs années soulève des questions sur la rémanence de ces molécules et les sources d'exposition des oiseaux (Chapitre III et IV). Plus important encore, la contamination des oiseaux semble être globale, peu importe l'exposition à travers l'alimentation en captivité (grains biologiques) ou le milieu de vie (surfaces cultivées en agriculture conventionnelle). En effet, bien que seuls les traits d'histoire de vie des oiseaux nourris avec du grain conventionnel aient été altérés au cours des trois premiers chapitres, les pesticides retrouvés dans le sang des perdrix du chapitre III (i.e., en captivité) montrent que les oiseaux nourris avec du grain biologique sont tout autant contaminés. De la même manière, dans le chapitre IV, les surfaces

en agriculture biologique disponibles dans les domaines vitaux ne semblent pas être suffisamment étendues pour servir de zones refuges aux pesticides et atténuer la contamination.

### 2.1. Quantification de l'exposition *versus* quantification de la contamination

Avant de pouvoir mettre en place les dosages de pesticides dans le sang des perdrix (Chapitre III et IV, voir **Article VI** pour les méthodes), les seuls repères d'exposition et de potentielle contamination ont pu être déduits à partir du dosage des résidus de pesticides dans les grains donnés aux perdrix et leurs réponses physiologiques et comportementales après plusieurs mois d'exposition (i.e., la technique de dosage dans le sang n'étant effective qu'à partir de 2021 ; Chapitre I et II). Les dosages de résidus dans les grains ont été réalisés uniquement sur les grains conventionnels, car des dosages préliminaires dans les grains biologiques ayant été faits en 2017 et 2018 ont montré que ceux-ci n'étaient pas porteurs de résidus de pesticides (Moreau et al. 2021). Cependant, face à la contamination ubiquitaire de toutes les perdrix adultes du Chapitre III peu importe leur traitement alimentaire, la question de la contamination des grains biologiques s'est posée. Premièrement, il est important de noter que la limite de quantification fixée lors du dosage des grains par le GIRPA (Beaucouzé, France) était fixée à 0.010 mg.kg<sup>-1</sup>. Les dosages de pesticides dans le sang réalisés par l'ICPEES (Strasbourg, France) avaient une limite de quantification fixée à l'échelle du pg.mg<sup>-1</sup>, soit une différence de 10<sup>-6</sup> avec les grains. Par conséquent, on pourrait supposer que les dosages réalisés dans les grains n'ont montré que la surface émergée de l'iceberg, et qu'un dosage à la même échelle que celui réalisé dans le sang aurait pu révéler une contamination supérieure, tant pour les grains conventionnels que les grains biologiques. Toutefois, les quelques molécules détectées dans les grains conventionnels n'ont pas été retrouvées dans le sang des perdrix nourries avec ces grains, excepté le tébuconazole (pour un seul oiseau qui plus est). Cela soulève donc des interrogations sur la provenance des molécules retrouvées, suggérant que la contamination ne s'est pas uniquement faite à travers l'ingestion de grains contaminés. En effet, une partie de la contamination des perdrix peut venir de l'environnement des oiseaux, bien que les perdrix captives soient dans des conditions semi-protégées. Lorsque les pesticides sont pulvérisés, la fraction appliquée qui est dispersée dans l'air est estimée à environ 15-40 % (Soccoro et al. 2016). Le transport des pesticides peut se produire sur de courtes ou longues distances, jusqu'à des milliers de kilomètres dans l'atmosphère (Shen et al. 2005), entraînant le dépôt de pesticides dans les sols, les eaux de surface et pénétrant dans les cours d'eau par ruissellement (Quaglia et al. 2019). Les volières de l'élevage étant entourées de champs en culture conventionnelle, il est possible que l'eau, l'air, les plantes et le sol des enclos aient été contaminés suite à l'application de pesticides

dans les champs alentours. Autrement, ces différences de pesticides retrouvés dans les grains *versus* dans le sang soulignent aussi les limites d'un dosage réalisé dans le sang. En effet, le sang est une matrice sensée refléter une contamination récente et non chronique puisqu'il distribue les molécules dans l'organisme qui vont ensuite être biotransformées, bioaccumulées ou excrétées (Espin et al. 2016). Il peut donc suffire que la perdrix ne se soient pas nourries des grains conventionnels juste avant la prise de sang pour que les molécules dosées dans les grains ne soient pas retrouvées dans l'organisme car excrétées ou métabolisées rapidement. Dans le cas des néonicotinoïdes, dont la toxicocinétique des molécules a été étudiée chez la caille japonaise, les vitesses d'excrétion de l'Imidacloprid (Bean et al. 2019), du Thiametoxam et de la Clothianidine (Pan et al. 2022) montrent que ces molécules n'apparaissent plus dans le sang 24h après ingestion. De la même manière, l'exposition à trois fongicides (i.e., Metalaxyl, Tébuconazole et Fludioxonil) chez la caille a montré que ces molécules n'étaient plus quantifiables dans le sang des oiseaux au bout de 24h (LOQ > 0.01 µg.kg<sup>-1</sup> ; Gross et al. 2020). Ainsi, en fonction du moment où la perdrix a ingéré des grains contaminés et celui où la prise de sang a été réalisée, et en tenant compte des propriétés chimiques des molécules influant sur sa toxicocinétique, il est possible que le sang ne reflète pas entièrement la contamination de l'oiseau.

## 2.2. Rémanence des molécules interdites ou utilisation illégale ?

Les dosages de pesticides dans le sang des perdrix des chapitres III (captives) et IV (sauvages) ont révélé la présence de nombreuses molécules interdites d'utilisation depuis plusieurs années (10 molécules interdites depuis minimum deux ans avant l'expérience dans le chapitre III et 13 molécules interdites depuis minimum deux ans avant les captures pour le chapitre IV). Si le sang est sensé refléter une exposition récente (Espin et al. 2016), cela signifierait que ces molécules sont encore bien présentes dans la nourriture et/ou dans l'environnement des oiseaux. Par exemple, considérant qu'aucun néonicotinoïde n'est sensé avoir été utilisé sur les cultures de la ZAPVS depuis 2018, nous nous attendions à ne pas trouver de résidus ou des résidus très faibles (<LOD) dans les échantillons de sang d'oiseaux. Pourtant, cinq molécules de néonicotinoïdes ont été retrouvés dans les perdrix du chapitre IV. Le Nitempyram et le Dinotefuran (i.e., les deux néonicotinoïdes les plus détectés chez les perdrix) sont des insecticides utilisés uniquement à des fins vétérinaires concernant les animaux domestiques. Cependant, les autorisations françaises de mise sur le marché de ces deux molécules n'incluent pas les espèces d'oiseaux ni aucun animal d'élevage comme cibles (<http://www.ircp.anmv.anses.fr/index.aspx>). Ces molécules sont soit utilisées en application

topique sur la peau (Dinotefuran) soit *per os* (Nitenpyram) pour traiter les infestations par les puces chez les chats et les chiens et sont censées être éliminées en 48h pour le Nitenpyram (Jeschke & Nauen 2005 ; Rust 2017). Dans le cas présent, sauf utilisation frauduleuse de ces molécules, nous ne savons pas comment ces concentrations de Dinotefuran et de Nitenpyram ont pu se retrouver dans le sang des perdrix (mais voir **Article VII** en Annexe C pour des suggestions). De la même manière, de la Clothianidine, du Thiametoxam et du Thiacloprid ont été retrouvés dans le sang des oiseaux (Chapitre III et IV). Ces résultats montrent que de nombreux pesticides interdits sont encore présents dans les zones agricoles et les réseaux alimentaires à des concentrations détectables et quantifiables (Fritsch et al. 2022). Ceux qui persistent dans les sols peuvent être remobilisés en raison des pratiques agricoles actuelles et du changement climatique, comme l'a montré par exemple le DDT stocké dans les sols des vignobles (Sabatier et al. 2014). L'utilisation illégale pourrait aussi être l'une des causes de la contamination des perdrix, des cas ont été signalés dans la ZAPVS pour le Fipronil et le Lindane par exemple (Fritsch et al. 2022). Les pratiques illégales se poursuivent encore de nos jours, entraînant l'exposition d'oiseaux et de mammifères à des pesticides interdits (Ntemiri et al. 2018 ; Di Blasio et al. 2020 ; Badry et al. 2021) ; et mettant même en danger les populations d'animaux sauvages en Europe et dans le monde (Plaza et al. 2019 ; Mateo-Tomas et al. 2020 ; Kitowski et al. 2021).

### 2.3. L'agriculture biologique comme outil d'atténuation des effets sublétaux ?

Curieusement, la détection et la quantification des pesticides dans le sang des perdrix des chapitres III et IV n'ont pas été influencées respectivement par le traitement alimentaire (conventionnel *versus* biologique) et la surface conventionnelle dans le domaine vital. En revanche, seuls les traits d'histoire de vie des perdrix nourries avec du grain conventionnel étaient affectés en captivité (Chapitre III). Pour le chapitre IV, le nombre de pesticides retrouvés dans le sang et la toxicité du mélange étaient aussi corrélés aux traits d'histoire de vie. Ces résultats suggèrent que malgré la contamination, les mélanges de pesticides présents dans l'organisme des perdrix nourries avec du grain biologique n'ont pas affecté leurs traits d'histoire de vie. Une hypothèse pouvant justifier cette observation repose peut-être sur les différences de propriétés calorimétriques qui existent entre les grains issus de l'agriculture biologique et ceux issus de l'agriculture conventionnelle. En effet, plusieurs études ont montré que les propriétés énergétiques des céréales étaient dépendantes de la méthode de production agricole (voir Dangour et al. 2009 pour une review). Les dosages réalisés par bombe calorimétrique en 2017 et 2018 dans Moreau et al. 2021 ont montré qu'il n'y avait pas de



différences énergétiques entre le blé et le maïs biologiques et conventionnels. Cependant, un dosage a été réalisé dans le cadre de cette thèse pour le chapitre III, montrant que le blé, le maïs et le pois biologique était légèrement plus énergétique que les mêmes grains cultivés en conventionnel (voir Annexe E). Au vu des résultats obtenus ici, l'hypothèse selon laquelle les mélanges de pois, blé, maïs et féveroles biologiques aient pu apporter, par exemple, plus d'énergie et ainsi augmenter les capacités de détoxification des perdrix, en comparaison avec celles nourries avec le même mélange issu du conventionnel, reste plausible. Autrement, ce serait la combinaison et les interactions spécifiques entre les molécules absorbées par les oiseaux nourris en conventionnel qui auraient engendré l'altération des traits d'histoire de vie, laissant supposer des interactions différentes et/ou inexistantes pour les molécules absorbées par les oiseaux nourris en biologique. Les résultats préliminaires obtenus dans le chapitre IV sont concomitants avec ceux issus du chapitre III concernant l'ubiquité de la contamination, peu importe si les perdrix ont utilisé préférentiellement ou non les surfaces en agriculture conventionnelle. Les mêmes résultats ont été observés chez deux espèces de grenouilles en Argentine, échantillonnées le long d'un gradient de distance à des cultures contaminées, et dont les fréquences de détection et de quantification des pesticides ne différaient pas (Brodeur et al. 2022). Dans notre étude, l'absence de corrélation significative entre la charge en pesticides et l'utilisation des surfaces conventionnelles pourrait être liée à la mobilité des perdrix et à l'étendue spatiale qu'elles exploitent. Nos résultats suggèrent que les surfaces actuelles en agriculture biologique dans le domaine vital des perdrix sont ainsi insuffisantes pour atténuer leur charge en pesticides. Sur la ZAPVS, plusieurs études analysant les résidus de pesticides dans les sols, les invertébrés et des poils de micromammifères ont démontré que les pesticides sont présents à la fois dans les cultures biologiques et dans les habitats semi-naturels non traités tout au long de l'année (c'est-à-dire au début de la saison des cultures et après la récolte), et qu'ils dépassent parfois les concentrations environnementales prévues même dans les habitats non traités (Bertand et al. 2018 ; Pelosi et al. 2021 ; Fritsch et al. 2022). Des apports directs de pesticides dans les parcelles non traitées à partir des traitements environnants peuvent se produire, par exemple en raison de la dérive, de la volatilisation et du ruissellement, limitant ainsi la capacité des parcelles biologiques à être des refuges pour la faune sauvage au sein de la mosaïque paysagère (Pelosi et al. 2021 ; Fritsch et al. 2022).

### 3. Perspectives de recherche

En combinant des expériences réalisées en conditions contrôlées (e.g., mésocosmes) et en milieux naturels (e.g., biomonitoring), et en testant différents scénarios d'exposition, cette thèse permet d'améliorer la compréhension des effets sublétaux des pesticides sur la perdrix grise. A cela s'ajoute le développement de nouvelles technologies associées à l'évolution de celles existantes (e.g., analyses multi-résidus permettant de screener un large panel de pesticides), permettant de révéler l'ubiquité de la contamination des pesticides sur de la faune captive mais aussi *in natura*. Cependant, les résultats de cette thèse mettent aussi en exergue plusieurs axes de recherches nécessitant de futures investigations, notamment les conséquences évolutives de tels résultats, mais aussi l'urgence de développer des outils pour aborder et anticiper les risques sanitaires liés aux mélanges de pesticides. Enfin, cette thèse promeut l'utilisation du biomonitoring à l'aide d'une espèce sentinelle comme outil de toxicosurveillance à l'échelle locale d'un agrosystème.

#### 3.1. Explorer les conséquences évolutives des effets sublétaux des pesticides

Les approches en condition contrôlées ou semi-contrôlées apportent un complément aux études en milieu naturel pour mieux identifier et caractériser les relations de cause à effet entre l'exposition aux pesticides et les réponses biologiques observées à différentes échelles (sub-individuelle à celle de la communauté). Les expériences réalisées ici ont souligné la nécessité d'approfondir l'étude de certains mécanismes et processus responsables de ces réponses, telles que l'évolution de la sensibilité des espèces aux pesticides et les conséquences transgénérationnelles que cela engendre. En effet, l'étude des effets sublétaux gagnerait à mieux tenir compte des possibles conséquences évolutives, qui sont probablement largement sous-estimées à ce jour et qui posent la question du coût physiologique ou écologique associé à l'adaptation aux pesticides. Les dynamiques évolutives sont impactées par les pesticides du fait de l'avantage sélectif conféré aux individus (Anderson et al. 2014). En effet, les espèces les plus résistantes à la toxicité ou celles adaptées à la pression exercée vont développer des modifications génétiques ou épigénétiques transmises au fil des générations (Kawecki & Ebert 2004 ; Hereford 2009). A l'échelle des communautés, c'est ainsi un système de réponse aux effets des pesticides qui évolue, avec des conséquences encore mal connues sur les vertébrés. Il s'agit d'un domaine de recherche en émergence, avec des études conduites jusqu'à présent essentiellement sur des organismes à cycle de vie court comme les invertébrés ou les plantes. Ainsi, le couplage d'approches moléculaires et génomiques avec des expériences en mésocosmes sur plusieurs générations devrait s'avérer particulièrement informatif pour

comprendre l'évolution des adaptations génétiques dans le cadre de l'exposition chronique des populations naturelles aux stress liés aux pesticides (e.g., exemple des évolutions multiples de résistance aux pyréthriinoïdes chez un crustacés d'eau douce, Weston et al 2013). Le développement de ces champs de recherche sur les phénomènes évolutifs et adaptatifs nécessiterait de renforcer les études intégrant un suivi post-exposition, d'appréhender l'influence des applications successives/répétées sur les capacités de résilience, et de mieux considérer les conséquences transgénérationnelles et les éventuels coûts écologiques qui pourraient être engendrés par ces phénomènes.

### 3.2. Aborder la difficulté des effets cocktails

La question des effets des mélanges de pesticides reste également sous-étudiée à ce jour, alors que de plus en plus de littérature, dont cette thèse, démontre (i) l'exposition de manière simultanée et/ou successive de la faune non-cible mais aussi (ii) la contamination aigüe et/ou chronique à travers différentes matrices biologiques (Brodeur et al. 2022 ; Fritsch et al. 2022). L'exposition environnementale inclut également dans de nombreux cas d'autres types de substances chimiques en plus des pesticides (e.g., métaux lourds, microplastiques, etc). Jusqu'ici, et comme cela a été fait dans cette thèse, les risques associés aux mélanges de pesticides sont principalement abordés à l'aide de modèle considérant l'addition des effets, ne prenant pas en compte ni les effets synergiques, ni les effets antagonistes. La difficulté à aborder la question des effets des mélanges et des stress multiples dans les études expérimentales s'explique en partie par le fait que la communauté scientifique se heurte toujours à des limites conceptuelles et méthodologiques pour faire face à la multiplicité des scénarios possibles. Par conséquent, les approches de modélisation semblent un bon compromis, permettant notamment de prioriser certains scénarios d'évaluation et ainsi limiter les tests sur des organismes. A l'échelle des individus et des populations, l'utilisation de modèles de type toxico-cinétique et toxico-dynamique (TKTD) appliqués à l'étude de l'effet des mélanges semble une approche particulièrement prometteuse (Bart et al. 2021). Ainsi, le développement intégré de modèles couplant quantitativement les aspects d'exposition/contamination aux effets biologiques, et tenant compte des phénomènes de détoxification, de biotransformation et de détoxification est souhaitable si l'on veut rendre l'évaluation des risques plus robustes dans un contexte environnemental réaliste.

### 3.3. La perdrix grise comme espèce sentinelle de la ZAPVS

Les différents résultats de cette thèse ont permis de montrer que la perdrix grise pouvait être une espèce sentinelle de la santé des agroécosystèmes. Dans un premier temps, les différentes réponses à l'exposition aux pesticides soulignées dans les quatre chapitres ont permis de montrer que cette espèce était particulièrement sensible à ces molécules. Dans un second temps, les chapitres III et IV ont montré qu'il était possible de doser un large éventail de pesticides dans le sang des perdrix, et de les relier à certains de leurs traits d'histoire de vie. Ainsi, le biomonitoring de la perdrix grise sur la ZAPVS permet de fournir des informations qualitatives et quantitatives de la contamination en pesticides à une échelle locale, mais aussi d'estimer leurs effets sur les oiseaux spécialistes des milieux agricoles. Poursuivre le biomonitoring de ces oiseaux sur plusieurs années permettraient non seulement de suivre les tendances de contamination sur la ZAPVS mais aussi d'évaluer ses effets sur la dynamique des populations des perdrix. Un suivi de reproduction a d'ailleurs été réalisé sur les oiseaux équipés de GPS dans le chapitre IV. Cependant, le fort taux de prédation dont sont victimes les perdrix, couplé aux risques de fauche et de moisson, ont engendré de lourdes pertes. La plupart des perdrix équipées se sont reproduits, mais seuls cinq nids au total sur les deux printemps ont éclos avec succès. Ainsi, la mise en place d'un système de protection des nids, comme cela est déjà fait pour d'autres espèces d'oiseaux sur cette zone d'étude (e.g., busard cendré, oedicnème criard, outarde canepetière), pourrait permettre une meilleure survie de ces oiseaux. De la même manière, doser les pesticides dans les œufs non éclos serait une bonne manière de coupler l'étude des effets transgénérationnels avec le biomonitoring de cette espèce. Enfin, puisque nos résultats suggèrent qu'une alimentation biologique pourrait être un levier d'atténuation des effets sublétaux des pesticides, le biomonitoring de la perdrix grise sur la ZAPVS pourrait être aussi un outil de développement de zones refuges. En effet, il serait intéressant de savoir à partir de quel pourcentage de cultures biologiques disponibles dans le domaine vital de la perdrix une atténuation de la contamination et des effets associées seraient observés. Ces informations pourraient notamment avoir une importance conservatoire pour plusieurs autres espèces de vertébrés partageant la même niche écologique que la perdrix grise.

#### 4. Conclusion

Les résultats issus de cette thèse permettent de mettre en exergue (1) l'impact délétère des cocktails de pesticides sur les traits d'histoire de vie de la perdrix grise, (2) l'ubiquité de la contamination de ces oiseaux dans différentes conditions (nourriture biologique ou conventionnelle, captivité ou *in natura*), (3) l'importance de prendre en compte les processus évolutifs dans les effet à long terme des pesticides en considérant les effets parentaux et la plasticité phénotypique des individus et enfin (4) le nécessité d'utiliser le biomonitoring des espèces sentinelles pour un meilleur suivi de la contamination des agroécosystèmes à l'échelle locale. Collectivement, ces résultats soutiennent l'hypothèse que les pesticides pourraient avoir une responsabilité dans le déclin de la perdrix grise. Combinés à la pression de chasse et au dérangement anthropique (moisson, fauche), mais aussi aux effets indirects des pesticides (en diminuant les ressources), les effets directs de ces derniers ont vraisemblablement une place importante dans la dynamique de population de ces oiseaux. Cependant, cette thèse suggère aussi que l'agriculture biologique pourrait être un potentiel levier de conservation pour cette espèce. En effet, en plus de contenir des ressources alimentaires plus riches et variées, les cultures biologiques, en surface suffisante, pourraient être une zone refuge pour les perdrix, diminuant leur risque d'exposition et de contamination aux pesticides, mais pouvant aussi atténuer certains de leurs effets délétères.

# REFERENCES

- Abu Zeid, E. H., Alam, R. T. M., Ali, S. A., & Hendawi, M. Y. (2019). Dose-related impacts of imidacloprid oral intoxication on brain and liver of rock pigeon (*Columba livia domestica*), residues analysis in different organs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *167*, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.121>
- Ackerman, J. T., Herzog, M. P., Evers, D. C., Cristol, D. A., Kenow, K. P., Heinz, G. H., Lavoie, R. A., Brasso, R. L., Mallory, M. L., Provencher, J. F., Braune, B. M., Matz, A., Schmutz, J. A., Eagles-Smith, C. A., Savoy, L. J., Meyer, M. W., & Hartman, C. A. (2020). Synthesis of maternal transfer of mercury in birds : implications for altered toxicity risk. *Environmental Science & Technology*, *54*(5), 2878-2891. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b06119>
- Addy-Orduna, L. M., Brodeur, J. C., & Mateo, R. (2019). Oral acute toxicity of imidacloprid, thiamethoxam and clothianidin in eared doves : A contribution for the risk assessment of neonicotinoids in birds. *Science of The Total Environment*, *650*, 1216-1223. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.09.112>
- Aebischer, N. J., & Ewald, J. A. (2004). Population change, reproduction, habitat and shooting: Managing the UK Grey Partridge recovery. *Ibis*, *146*, 181-191. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2004.00345.x>
- Aebischer, N. J., & Kavanagh, B. (1997). Grey partridge. In W.J.M. Hagemeyer, & M.J. Blair (Eds.), *The EBCC Atlas of European breeding birds, their distribution and abundance* (pp. 212–213). London, UK: T&AD Poyser.
- Aebischer, N. J., & Potts, G. R. (1994). Partridge *Perdix perdix*. In M.F. Tucker, & M. F. Heath (Eds.), *Birds in Europe, their conservation status* (Vol. 3, pp. 220–221). Cambridge, UK: BirdLife International.
- Aktar, M. W., Sengupta, D., & Chowdhury, A. (2009). Impact of pesticides use in agriculture : Their benefits and hazards. *Interdisciplinary Toxicology*, *2*(1), 1-12. <https://doi.org/10.2478/v10102-009-0001-7>
- Albayrak, T., & Mor, F. (2011). Comparative tissue distribution of heavy metals in house sparrow (*Passer domesticus*) in polluted and reference sites in Turkey. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *87*(4), 457-462. <https://doi.org/10.1007/s00128-011-0364-2>
- Albert, C. A., Wilson, L. K., Mineau, P., Trudeau, S., & Elliott, J. E. (2010). Anticoagulant rodenticides in three owl species from Western Canada, 1988–2003. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *58*(2), 451-459. <https://doi.org/10.1007/s00244-009-9402-z>
- Alonso-Alvarez, C., Pérez-Rodríguez, L., Ferrero, M. E., García de-Blas, E., Casas, F., & Mougeot, F. (2012). Adjustment of female reproductive investment according to male carotenoid-based ornamentation in a gallinaceous bird. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, *66*(5), 731-742. <https://doi.org/10.1007/s00265-012-1321-8>
- Anderson, J. T., Wagner, M. R., Rushworth, C. A., Prasad, K. V. S. K., & Mitchell-Olds, T. (2014). The evolution of quantitative traits in complex environments. *Heredity*, *112*(1), 4-12. <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.33>
- Angelstam, P., Manton, M., Elbakidze, M., Sijtsma, F., Adamescu, M. C., Avni, N., Beja, P., Bezak, P., Zyablikova, I., Cruz, F., Bretagnolle, V., Díaz-Delgado, R., Ens, B., Fedoriak, M., Flaim, G., Gingrich, S., Lavi-Neeman, M., Medinets, S., Melecis, V., Yamelynets, T. (2019). LTSER platforms as a place-based transdisciplinary research infrastructure : Learning landscape approach through evaluation. *Landscape Ecology*, *34*(7), 1461-1484. <https://doi.org/10.1007/s10980-018-0737-6>
- Annett, R., Habibi, H. R., & Hontela, A. (2014). Impact of glyphosate and glyphosate-based herbicides on the freshwater environment : Impact of glyphosate-based herbicides. *Journal of Applied Toxicology*, *34*(5), 458-479. <https://doi.org/10.1002/jat.2997>

- Badry, A., Schenke, D., Treu, G., & Krone, O. (2021). Linking landscape composition and biological factors with exposure levels of rodenticides and agrochemicals in avian apex predators from Germany. *Environmental Research*, *193*, 110602. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110602>
- Baeta, R., Faivre, B., Motreuil, S., Gaillard, M., & Moreau, J. (2008). Carotenoid trade-off between parasitic resistance and sexual display: An experimental study in the blackbird (*Turdus merula*). *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, *275*(1633), 427-434. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1383>
- Bailey, D. J., & Saldanha, C. J. (2015). The importance of neural aromatization in the acquisition, recall, and integration of song and spatial memories in passerines. *Hormones and Behavior*, *74*, 116-124. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2015.06.007>
- Balthazart, J. (2017). Steroid metabolism in the brain : From bird watching to molecular biology, a personal journey. *Hormones and Behavior*, *93*, 137-150. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2017.05.017>
- Bart, S., Jager, T., Robinson, A., Lahive, E., Spurgeon, D. J., & Ashauer, R. (2021). Predicting mixture effects over time with toxicokinetic–toxicodynamic models (GUTS): Assumptions, experimental testing, and predictive power. *Environmental Science & Technology*, *55*(4), 2430-2439. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c05282>
- Belden, J. B., Gilliom, R. J., & Lydy, M. J. (2007). How well can we predict the toxicity of pesticide mixtures to aquatic life? *Integrated Environmental Assessment and Management*, *3*(3), 364-372. <https://doi.org/10.1002/ieam.5630030307>
- Bellot, P., Brischoux, F., Fritsch, C., Goutte, A., Alliot, F., Rocchi, S., & Angelier, F. (2022). Evidence of environmental transfer of tebuconazole to the eggs in the house sparrow (*Passer domesticus*): An experimental study. *Chemosphere*, *308*, 136469. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2022.136469>
- Bennett, R. S., Dewhurst, I. C., Fairbrother, A., Hart, A. D. M., Hooper, M. J., Leopold, A., Mineau, P., Mortensen, S. R., Shore, R. F., & Springer, T. A. (2005). A new interpretation of avian and mammalian reproduction toxicity test data in ecological risk assessment. *Ecotoxicology*, *14*(8), 801-815. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0029-1>
- Bennett, R. S., & Etterson, M. A. (2006). Estimating pesticide effects on fecundity rates of wild birds using current laboratory reproduction tests. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, *12*(4), 762-781. <https://doi.org/10.1080/10807030500531489>
- Bennett, R. S., & Etterson, M. A. (2007). Incorporating results of avian toxicity tests into a model of annual reproductive success. *Integrated Environmental Assessment and Management*, *3*(4), 498. [https://doi.org/10.1897/IEAM\\_2007-029.1](https://doi.org/10.1897/IEAM_2007-029.1)
- Bennett, R. S., Williams, B. A., Schmedding, D. W., & Bennett, J. K. (1991). Effects of dietary exposure to methyl parathion on egg laying and incubation in mallards. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *10*(4), 501-507. <https://doi.org/10.1002/etc.5620100410>
- Bento, C. P. M., Yang, X., Gort, G., Xue, S., van Dam, R., Zomer, P., Mol, H. G. J., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2016). Persistence of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in loess soil under different combinations of temperature, soil moisture and light/darkness. *Science of The Total Environment*, *572*, 301-311. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.07.215>
- Benton, T. G., Vickery, J. A., & Wilson, J. D. (2003). Farmland biodiversity: Is habitat heterogeneity the key? *Trends in Ecology & Evolution*, *18*(4), 182-188. [https://doi.org/10.1016/S0169-5347\(03\)00011-9](https://doi.org/10.1016/S0169-5347(03)00011-9)
- Berny, P., & Gaillet, J.-R. (2008). Acute poisoning of red kites (*Milvus milvus*) in france : data from the SAGIR network. *Journal of Wildlife Diseases*, *44*(2), 417-426. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-44.2.417>
- Bertrand, C., Zagatti, P., Bonthoux, S., Daniele G., Lafay, F., Vulliet, E., Bretagnolle, V., Fritsch, C., Pelosi, C. (2018) Assessing the impact of farming practices and landscape heterogeneity on

- ground beetles' exposure to pesticides. *International Conference on Ecological Sciences (Sféologie 2018)*, Oct 2018, Rennes, France.
- Beura, L. K., Hamilton, S. E., Bi, K., Schenkel, J. M., Odumade, O. A., Casey, K. A., Thompson, E. A., Fraser, K. A., Rosato, P. C., Filali-Mouhim, A., Sekaly, R. P., Jenkins, M. K., Vezys, V., Haining, W. N., Jameson, S. C., & Masopust, D. (2016). Normalizing the environment recapitulates adult human immune traits in laboratory mice. *Nature*, *532*(7600), 512-516. <https://doi.org/10.1038/nature17655>
- Biard, C., Saulnier, N., Gaillard, M., & Moreau, J. (2010). Carotenoid-based bill colour is an integrative signal of multiple parasite infection in blackbird. *Naturwissenschaften*, *97*(11), 987-995. <https://doi.org/10.1007/s00114-010-0716-5>
- Bichet, C., Moiron, M., Matson, K. D., Vedder, O., & Bouwhuis, S. (2022). Immunosenescence in the wild? A longitudinal study in a long-lived seabird. *Journal of Animal Ecology*, *91*(2), 458-469. <https://doi.org/10.1111/1365-2656.13642>
- Blanchard, D. C., Summers, C. H., & Blanchard, R. J. (2013). The role of behavior in translational models for psychopathology: Functionality and dysfunctional behaviors. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, *37*(8), 1567-1577. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2013.06.008>
- Blount, J. D., Surai, P. F., Nager, R. G., Houston, D. C., Møller, A. P., Trewby, M. L., & Kennedy, M. W. (2002). Carotenoids and egg quality in the lesser black-backed gull *Larus fuscus*: A supplemental feeding study of maternal effects. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *269*(1486), 29-36. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1840>
- Boatman, N. D., Brickle, N. W., Hart, J. D., Milsom, T. P., Morris, A. J., Murray, A. W. A., Murray, K. A., & Robertson, P. A. (2004). Evidence for the indirect effects of pesticides on farmland birds: Indirect effects of pesticides. *Ibis*, *146*, 131-143. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2004.00347.x>
- Bolker, J. A. (2019). Selection of models: evolution and the choice of species for translational research. *Brain, Behavior and Evolution*, *93*(2-3), 82-91. <https://doi.org/10.1159/000500317>
- Bonmatin, J. M., Moineau, I., Charvet, R., Colin, M. E., Fleche, C., & Bengsch, E. R. (2005). Behaviour of imidacloprid in fields. toxicity for honey bees. In E. Lichtfouse, J. Schwarzbauer, & D. Robert (Éds.), *Environmental Chemistry* (p. 483-494). Springer-Verlag. [https://doi.org/10.1007/3-540-26531-7\\_44](https://doi.org/10.1007/3-540-26531-7_44)
- Botías, C., David, A., Hill, E. M., & Goulson, D. (2016). Contamination of wild plants near neonicotinoid seed-treated crops, and implications for non-target insects. *Science of The Total Environment*, *566-567*, 269-278. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.05.065>
- Brausch, J. M., & Smith, P. N. (2009). Development of resistance to cyfluthrin and naphthalene among *Daphnia magna*. *Ecotoxicology*, *18*(5), 600-609. <https://doi.org/10.1007/s10646-009-0318-1>
- Bretagnolle, V., Berthet, E., Gross, N., Gauffre, B., Plumejeaud, C., Houte, S., Badenhauer, I., Monceau, K., Allier, F., Monestiez, P., & Gaba, S. (2018). Towards sustainable and multifunctional agriculture in farmland landscapes: Lessons from the integrative approach of a French LTSER platform. *Science of The Total Environment*, *627*, 822-834. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.142>
- Brickle, N. W., Harper, D. G. C., Aebischer, N. J., & Cockayne, S. H. (2000). Effects of agricultural intensification on the breeding success of corn buntings *Miliaria calandra*. *Journal of Applied Ecology*, *37*(5), 742-755. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2000.00542.x>
- Bro, E., & Crosnier, A. (2012). Grey Partridges *Perdix perdix* in France in 2008: Distribution, abundance, and population change. *Bird Study*, *59*(3), 320-326. <https://doi.org/10.1080/00063657.2012.674099>
- Bro, E., Devillers, J., Millot, F., & Decors, A. (2016). Residues of plant protection products in grey partridge eggs in French cereal ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*, *23*(10), 9559-9573.



- Bro, E. (2016). *La perdrix grise : Biologie, écologie, gestion et conservation*. Biotope éditions.
- Bro, E., Reitz, F., & Landry, P. (2005). Grey partridge *Perdix perdix* population status in central northern France : Spatial variability in density and 1994–2004 trend. *Wildlife Biology*, 11(4), 287-298. [https://doi.org/10.2981/0909-6396\(2005\)11\[287:GPPPPS\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2981/0909-6396(2005)11[287:GPPPPS]2.0.CO;2)
- Bro, E., Sarrazin, F., Clobert, J., & Reitz, F. (2000). Demography and the decline of the grey partridge *Perdix perdix* in France. *Journal of Applied Ecology*, 37(3), 432-448. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2000.00511.x>
- Brodeur, J. C., Damonte, M. J., Rojas, D. E., Cristos, D., Vargas, C., Poliserpi, M. B., & Andriulo, A. E. (2022). Concentration of current-use pesticides in frogs from the Pampa region and correlation of a mixture toxicity index with biological effects. *Environmental Research*, 204, 112354. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.112354>
- Broughton, D. R., Schneider, B. C., McGraw, K. J., & Ardia, D. R. (2017). Carotenoids buffer the acute phase response on fever, sickness behavior, and rapid bill color change in zebra finches. *Journal of Experimental Biology*, jeb.155069. <https://doi.org/10.1242/jeb.155069>
- Brühl, C. A., & Zaller, J. G. (2019). Biodiversity decline as a consequence of an inappropriate environmental risk assessment of pesticides. *Frontiers in Environmental Science*, 7, 177. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2019.00177>
- Burger, J. (1993) Metals in avian feathers: Bioindicators of environmental pollution. *Reviews of Environmental Toxicology*, 5, 203–311
- Burns, F., Eaton, M. A., Burfield, I. J., Klvaňová, A., Šilarová, E., Staneva, A., & Gregory, R. D. (2021). Abundance decline in the avifauna of the European Union reveals cross-continental similarities in biodiversity change. *Ecology and Evolution*, 11(23), 16647-16660. <https://doi.org/10.1002/ece3.8282>
- Byholm, P., Mäkeläinen, S., Santangeli, A., & Goulson, D. (2018). First evidence of neonicotinoid residues in a long-distance migratory raptor, the European honey buzzard (*Pernis apivorus*). *Science of The Total Environment*, 639, 929-933. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.185>
- Carson, R., Shackleton, Huxley, J., & Lear, L. (2000). *Silent spring* (Reprinted). Penguin.
- Casida, J. E. (2009). Pest toxicology : The primary mechanisms of pesticide action. *Chemical Research in Toxicology*, 22(4), 609-619. <https://doi.org/10.1021/tx8004949>
- Casida, J. E. (2011). Curious about pesticide action. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(7), 2762-2769. <https://doi.org/10.1021/jf102111s>
- Casida, J. E. (2018). Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators : Progress and prospects. *Annual Review of Entomology*, 63(1), 125-144. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043042>
- Casida, J. E., & Bryant, R. J. (2017). The ABCs of pesticide toxicology : Amounts, biology, and chemistry. *Toxicology Research*, 6(6), 755-763. <https://doi.org/10.1039/c7tx00198c>
- Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Neuroactive insecticides : Targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58(1), 99-117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>
- Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2017). Pesticide chemical research in toxicology : Lessons from nature. *Chemical Research in Toxicology*, 30(1), 94-104. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrestox.6b00303>
- Casida, J. E., & Quistad, G. B. (1998). Golden age of insecticide research : Past, present, or future? *Annual Review of Entomology*, 43(1), 1-16. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.43.1.1>
- Casida, J. E., & Quistad, G. B. (2004). Organophosphate toxicology : Safety aspects of nonacetylcholinesterase secondary targets. *Chemical Research in Toxicology*, 17(8), 983-998. <https://doi.org/10.1021/tx0499259>
- Castro, M. J. L., Ojeda, C., & Cirelli, A. F. (2014). Advances in surfactants for agrochemicals. *Environmental Chemistry Letters*, 12(1), 85-95. <https://doi.org/10.1007/s10311-013-0432-4>

- Ceballos, G., Ehrlich, P. R., Barnosky, A. D., García, A., Pringle, R. M., & Palmer, T. M. (2015). Accelerated modern human-induced species losses : Entering the sixth mass extinction. *Science Advances*, *1*(5), e1400253. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1400253>
- Cedergreen, N. (2014). Quantifying synergy : A systematic review of mixture toxicity studies within environmental toxicology. *PLoS ONE*, *9*(5), e96580. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096580>
- Chalfin, L., Dayan, M., Levy, D. R., Austad, S. N., Miller, R. A., Iraqi, F. A., Dulac, C., & Kimchi, T. (2014). Mapping ecologically relevant social behaviours by gene knockout in wild mice. *Nature Communications*, *5*(1), 4569. <https://doi.org/10.1038/ncomms5569>
- Chalvet-Monfray, K., Sabatier, P., Belzunces, L. P., Colin, M. E., & Fléché, C. (1996). Synergy between deltamethrin and prochloraz in bees : Modeling approach. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *15*(4), 525-534. <https://doi.org/10.1002/etc.5620150418>
- Chamberlain, D. E., Fuller, R. J., Bunce, R. G. H., Duckworth, J. C., & Shrubbs, M. (2000). Changes in the abundance of farmland birds in relation to the timing of agricultural intensification in England and Wales. *Journal of Applied Ecology*, *37*(5), 771-788. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2000.00548.x>
- Chiron, F., Chargé, R., Julliard, R., Jiguet, F., & Muratet, A. (2014). Pesticide doses, landscape structure and their relative effects on farmland birds. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *185*, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.12.013>
- Colborn, T., vom Saal, F. S., & Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, *101*(5), 378-384. <https://doi.org/10.1289/ehp.93101378>
- Colin, M.-E., & Belzunces, L. P. (1992). Evidence of synergy between prochloraz and deltamethrin in *apis mellifera* L. : A convenient biological approach. *Pesticide Science*, *36*(2), 115-119. <https://doi.org/10.1002/ps.2780360206>
- Comolet-Tirman, J., Siblet, J. P., Witté, I. (2015). Statuts et tendances des populations d'oiseaux nicheurs de France. Bilan simplifié du premier rapportage national au titre de la Directive Oiseaux. *Alauda*, *83*, 35-76.
- Corcellas, C., Andreu, A., Máñez, M., Sergio, F., Hiraldo, F., Eljarrat, E., & Barceló, D. (2017). Pyrethroid insecticides in wild bird eggs from a World Heritage Listed Park : A case study in Doñana National Park (Spain). *Environmental Pollution*, *228*, 321-330. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2017.05.035>
- Costas-Ferreira, C., & Faro, L. R. F. (2021). Neurotoxic effects of neonicotinoids on mammals : What is there beyond the activation of nicotinic acetylcholine receptors?—A systematic review. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(16), 8413. <https://doi.org/10.3390/ijms22168413>
- Cothran, R. D., Brown, J. M., & Relyea, R. A. (2013). Proximity to agriculture is correlated with pesticide tolerance : Evidence for the evolution of amphibian resistance to modern pesticides. *Evolutionary Applications*, *6*(5), 832-841. <https://doi.org/10.1111/eva.12069>
- Cox, C. 1991. Pesticides and birds: from DDT to today's poisons. *Journal of Pesticide Reform*, *11*(4), 2-6
- Crispo, E. (2007). The baldwin effect and genetic assimilation : revisiting two mechanisms of evolutionary change mediated by phenotypic plasticity. *Evolution*, *61*(11), 2469-2479. <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00203.x>
- Crispo, E., J. D. DiBattista, C. Correa, X. Thirbert-Plante, A. E. McKellar, A. K., & Schwartz, D. (2010). The evolution of phenotypic plasticity in response to anthropogenic disturbance. *Evolutionary Ecology Research* *12*, 47-66.
- Crocker, D. R., & Lawrence, A. J. (2018). Estimating the potential effects of pesticide seed treatments on the reproductive success of arable birds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *147*, 124-131. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.08.035>

- Crump, D., Werry, K., Veldhoen, N., Van Aggelen, G., & Helbing, C. C. (2002). Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone-dependent gene expression and metamorphosis in *Xenopus Laevis*. *Environmental Health Perspectives*, *110*(12), 1199-1205. <https://doi.org/10.1289/ehp.021101199>
- Dalkvist, T., Topping, C. J., & Forbes, V. E. (2009). Population-level impacts of pesticide-induced chronic effects on individuals depend more on ecology than toxicology. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *72*(6), 1663-1672. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2008.10.002>
- Dangour, A. D., Dodhia, S. K., Hayter, A., Allen, E., Lock, K., & Uauy, R. (2009). Nutritional quality of organic foods : A systematic review. *The American Journal of Clinical Nutrition*, *90*(3), 680-685. <https://doi.org/10.3945/ajcn.2009.28041>
- Declerck, S., De Bie, T., Ercken, D., Hampel, H., Schrijvers, S., Van Wichelen, J., Gillard, V., Mandiki, R., Losson, B., Bauwens, D., Keijers, S., Vyverman, W., Goddeeris, B., De meester, L., Brendonck, L., & Martens, K. (2006). Ecological characteristics of small farmland ponds : Associations with land use practices at multiple spatial scales. *Biological Conservation*, *131*(4), 523-532. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2006.02.024>
- de Faria, D. B. G., Montalvão, M. F., Chagas, T. Q., Araújo, A. P. C., Souza, J. M. de, Mendes, B. O., Rodrigues, A. S. L., & Malafaia, G. (2018). Behavioral changes in Japanese quails exposed to predicted environmentally relevant abamectin concentrations. *Science of The Total Environment*, *636*, 1553-1564. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.04.293>
- DEFRA. (2021). Wild Bird Populations in the UK, 1970 to 2019. Retrieved June 6, 2022, from <https://www.gov.uk/government/statistics/wild-bird-populations-in-the-uk>
- Dell’Omo, G. (2002) *Behavioral ecotoxicology*. Wiley, New-York
- Di Blasio, A., Bertolini, S., Gili, M., Avolio, R., Leogrande, M., Ostorero, F., Ru, G., Dondo, A., & Zoppi, S. (2020). Local context and environment as risk factors for acute poisoning in animals in northwest Italy. *Science of The Total Environment*, *709*, 136016. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136016>
- Dietrich, M. R., Ankeny, R. A., Crowe, N., Green, S., & Leonelli, S. (2020). How to choose your research organism. *Studies in History and Philosophy of Science Part C: Studies in History and Philosophy of Biological and Biomedical Sciences*, *80*, 101227. <https://doi.org/10.1016/j.shpsc.2019.101227>
- Dingemanse, N. J., Both, C., Drent, P. J., van Oers, K., & van Noordwijk, A. J. (2002). Repeatability and heritability of exploratory behaviour in great tits from the wild. *Animal Behaviour*, *64*(6), 929-938. <https://doi.org/10.1006/anbe.2002.2006>
- Donald, P. F., Green, R. E., & Heath, M. F. (2001). Agricultural intensification and the collapse of Europe’s farmland bird populations. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, *268*(1462), 25-29. <https://doi.org/10.1098/rspb.2000.1325>
- Donoghue, D. J. (2001). Mechanisms regulating drug and pesticide residue uptake by egg yolks : Development of predictive models. *World’s Poultry Science Journal*, *57*(4), 373-380. <https://doi.org/10.1079/WPS20010026>
- Driver, C. J., Drown, D. B., Ligtke, M. W., Van Voris, P., McVeety, B. D., & Greenspan, B. J. (1991). Routes of uptake and their relative contribution to the toxicologic response of Northern bobwhite (*Colinus virginianus*) to an organophosphate pesticide. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *10*(1), 21-33. <https://doi.org/10.1002/etc.5620100104>
- Elliott, J. E., Langelier, K. M., Mineau, P., & Wilson, L. K. (1996). Poisoning of bald eagles and red-tailed hawks by carbofuran and fensulfothion in the Fraser delta of British Columbia, Canada. *Journal of Wildlife Diseases*, *32*(3), 486-491. <https://doi.org/10.7589/0090-3558-32.3.486>
- EFSA. (2009). Guidance of EFSA: Risk assessment for birds and mammals. *EFSA Journal*, *7*, 1438.

- EFSA. (2018). How pesticides are regulated in the EU – EFSA and the assessment of active substances. Retrieved June 6, 2022, from <https://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/pesticides-ebook-180424>
- Eng, M. L., Stutchbury, B. J., & Morrissey, C. A. (2017). Imidacloprid and chlorpyrifos insecticides impair migratory ability in a seed-eating songbird. *Scientific reports*, 7(1), 1-9.
- Eng, M. L., Stutchbury, B. J., & Morrissey, C. A. (2019). A neonicotinoid insecticide reduces fueling and delays migration in songbirds. *Science*, 365(6458), 1177-1180.
- Eraud, C., Cadet, E., Powolny, T., Gaba, S., Bretagnolle, F., & Bretagnolle, V. (2015). Weed seeds, not grain, contribute to the diet of wintering skylarks in arable farmlands of Western France. *European Journal of Wildlife Research*, 61(1), 151-161. <https://doi.org/10.1007/s10344-014-0888-y>
- 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. (2016). Tracking pan-continental trends in environmental contamination using sentinel raptors—What types of samples should we use? *Ecotoxicology*, 25(4), 777-801.
- Etterson, M., Garber, K., & Odenkirchen, E. (2017). Mechanistic modeling of insecticide risks to breeding birds in North American agroecosystems. *PLOS ONE*, 12(5), e0176998. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0176998>
- Ewen, J. G., Acevedo-Whitehouse, K., Alley, M. R., Carraro, C., Sainsbury, A. W., Swinnerton, K., & Woodroffe, R. (2012). Empirical consideration of parasites and health in reintroduction. In J.G. Ewen, D.P. Armstrong, K.A. Parker, & P.J. Seddon (Eds.), *Reintroduction biology: integrating science and management* (pp. 290–335). Chichester, UK: Wiley-Blackwell.
- Fair, J., Whitaker, S., & Pearson, B. (2007). Sources of variation in haematocrit in birds. *Ibis*, 149(3), 535-552. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2007.00680.x>
- FAO, & WHO. (2013). International code of conduct on the distribution and use of pesticides—Guidelines on data requirements for the registration of pesticides, 75p
- Farage-Elawar, M., & Francis, B. M. (1988). Effects of multiple dosing of fenthion, fenitrothion, and desbromoleptophos in young chicks. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 23(2), 217-228. <https://doi.org/10.1080/15287398809531108>
- Felisbino, K., Santos-Filho, R., Piacini, L. D. S., Cestari, M. M., & Leme, D. M. (2018). Mesotrione herbicide does not cause genotoxicity, but modulates the genotoxic effects of Atrazine when assessed in mixture using a plant test system (*Allium cepa*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 150, 83-88. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.07.009>
- Fenner, K., Canonica, S., Wackett, L. P., & Elsner, M. (2013). evaluating pesticide degradation in the environment: Blind spots and emerging opportunities. *Science*, 341(6147), 752-758. <https://doi.org/10.1126/science.1236281>
- Fernández-Vizcaíno, E., Fernández de Mera, I. G., Mougeot, F., Mateo, R., & Ortiz-Santaliestra, M. E. (2020). Multi-level analysis of exposure to triazole fungicides through treated seed ingestion in the red-legged partridge. *Environmental Research*, 189, 109928. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.109928>
- Finlay, B. L. (2019). Generic *Homo sapiens* and unique *Mus musculus*: Establishing the typicality of the modeled and the model species. *Brain, Behavior and Evolution*, 93(2-3), 122-136. <https://doi.org/10.1159/000500111>
- Fitze, P. S., Tschirren, B., Gasparini, J., & Richner, H. (2007). Carotenoid-based plumage colors and immune function : Is there a trade-off for rare carotenoids? *The American Naturalist*, 169(S1), S137-S144. <https://doi.org/10.1086/510094>
- Fox, G. A., & Donald, T. (1980). Organochlorine pollutants, nest-defense behavior and reproductive success in merlins. *The Condor*, 82(1), 81-84. <https://doi.org/10.2307/1366790>
- Franco, R., Sánchez-Olea, R., Reyes-Reyes, E. M., & Panayiotidis, M. I. (2009). Environmental toxicity, oxidative stress and apoptosis : Ménage à trois. *Mutation Research/Genetic Toxicology*

- and *Environmental Mutagenesis*, 674(1-2), 3-22.  
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2008.11.012>
- Frid, A., & Dill, L. M. (2002). Human-caused disturbance stimuli as a form of predation risk. *Conservation Ecology*, 6(1), art11. <https://doi.org/10.5751/ES-00404-060111>
- Fried, G., Petit, S., Dessaint, F., & Reboud, X. (2009). Arable weed decline in Northern France : Crop edges as refugia for weed conservation? *Biological Conservation*, 142(1), 238-243. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2008.09.029>
- Fritsch, C., Appenzeller, B., Burkart, L., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Raoul, F., Driget, V., Powolny, T., Gagnaison, C., Rieffel, D., Afonso, E., Goydadin, A.-C., Hardy, E. M., Palazzi, P., Schaeffer, C., Gaba, S., Bretagnolle, V., Bertrand, C., & Pelosi, C. (2022). Pervasive exposure of wild small mammals to legacy and currently used pesticide mixtures in arable landscapes. *Scientific Reports*, 12(1), 15904. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19959-y>
- Galon, L., Bragagnolo, L., Korf, E. P., dos Santos, J. B., Barroso, G. M., & Ribeiro, V. H. V. (2021). Mobility and environmental monitoring of pesticides in the atmosphere—A review. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(25), 32236-32255. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-14258-x>
- Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W. W., Emmerson, M., Morales, M. B., Ceryngier, P., Liira, J., Tscharrnke, T., Winqvist, C., Eggers, S., Bommarco, R., Pärt, T., Bretagnolle, V., Plantegenest, M., Clement, L. W., Dennis, C., Palmer, C., Oñate, J. J., Inchausti, P. (2010). Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology*, 11(2), 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2009.12.001>
- Ghasemi, E., Gholam Azad, N., Tondar, M., Pariookh, P., & Aval, F. (2015). Tracking the footprint of pesticides in Alzheimer's disease. *Journal of Systems and Integrative Neuroscience*, 1(1), 14-19. <https://doi.org/10.15761/JSIN.1000104>
- Ghilain, A., & Bélisle, M. (2008). Breeding success of tree swallows along a gradient of agricultural intensification. *Ecological Applications*, 18(5), 1140-1154. <https://doi.org/10.1890/07-1107.1>
- Giaquinto, P. C., de Sá, M. B., Sugihara, V. S., Gonçalves, B. B., Delício, H. C., & Barki, A. (2017). Effects of glyphosate-based herbicide sub-lethal concentrations on fish feeding behavior. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 98(4), 460-464. <https://doi.org/10.1007/s00128-017-2037-2>
- Gibbons, D., Morrissey, C., & Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 103-118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>
- Giorio, C., Safer, A., Sánchez-Bayo, F., Tapparo, A., Lentola, A., Girolami, V., van Lexmond, M. B., & Bonmatin, J.-M. (2021). An update of the Worldwide Integrated Assessment (WIA) on systemic insecticides. Part 1 : New molecules, metabolism, fate, and transport. *Environmental Science and Pollution Research*, 28(10), 11716-11748. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-0394-3>
- Girard, J., Mineau, P., & Fahrig, L. (2014). Higher nestling food biomass in organic than conventional soybean fields in eastern Ontario, Canada. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 189, 199-205. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2014.03.033>
- Gómez-Ramírez, P., Shore, R. F., van den Brink, N. W., van Hattum, B., Bustnes, J. O., Duke, G., Fritsch, C., García-Fernández, A. J., Helander, B. O., Jaspers, V., Krone, O., Martínez-López, E., Mateo, R., Movalli, P., & Sonne, C. (2014). An overview of existing raptor contaminant monitoring activities in Europe. *Environment International*, 67, 12-21. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2014.02.004>
- Goulson, D. (2013). Review : An overview of the environmental risks posed by neonicotinoid insecticides. *Journal of Applied Ecology*, 50(4), 977-987. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12111>

- Green, R. E., Rands, M. R. W., & Moreby, S. J. (2008). Species differences in diet and the development of seed digestion in partridge chicks *Perdix perdix* and *Alectoris rufa*. *Ibis*, *129*, 511-514. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1987.tb08238.x>
- 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*(1), 60-76. <https://doi.org/10.3390/birds2010004>
- Gross, M. S., Bean, T. G., Hladik, M. L., Rattner, B. A., & Kuivila, K. M. (2020). Uptake, metabolism, and elimination of fungicides from coated wheat seeds in Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *68*(6), 1514-1524. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.9b05668>
- Grote, K., Niemann, L., Selzsam, B., Haider, W., Gericke, C., Herzler, M., & Chahoud, I. (2008). Epoxiconazole causes changes in testicular histology and sperm production in the Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *27*(11), 2368. <https://doi.org/10.1897/08-048.1>
- Grue, C. E., & Shipley, B. K. (1984). Sensitivity of nestling and adult starlings to dicotophos, an organophosphate pesticide. *Environmental Research*, *35*(2), 454-465. [https://doi.org/10.1016/0013-9351\(84\)90152-X](https://doi.org/10.1016/0013-9351(84)90152-X)
- Grue, C. E., v. N. Powell, G., & McChesney, M. J. (1982). Care of nestlings by wild female starlings exposed to an organophosphate pesticide. *The Journal of Applied Ecology*, *19*(2), 327. <https://doi.org/10.2307/2403470>
- Guitart, R., Croubels, S., Caloni, F., Sachana, M., Davanzo, F., Vandebroucke, V., & Berny, P. (2010a). Animal poisoning in Europe. Part 1 : Farm livestock and poultry. *The Veterinary Journal*, *183*(3), 249-254. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.002>
- Guitart, R., Sachana, M., Caloni, F., Croubels, S., Vandebroucke, V., & Berny, P. (2010b). Animal poisoning in Europe. Part 3 : Wildlife. *The Veterinary Journal*, *183*(3), 260-265. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2009.03.033>
- Guo, Q., Zhao, S., Zhang, J., Qi, K., Du, Z., & Shao, B. (2018). Determination of fipronil and its metabolites in chicken egg, muscle and cake by a modified QuEChERS method coupled with LC-MS/MS. *Food Additives & Contaminants: Part A*, *35*(8), 1543-1552. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1472395>
- Hagemeijer, W. J., & Blair, M. J. (1997). The EBCC Atlas of European breeding birds, their distribution and abundance. London, UK: T&AD Poyser.
- Hamlin, H. J., & Guillelte, L. J. (2010). Birth defects in wildlife : The role of environmental contaminants as inducers of reproductive and developmental dysfunction. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *56*(2), 113-121. <https://doi.org/10.3109/19396360903244598>
- Harmange, C., Bretagnolle, V., Chabaud, N., Sarasa, M., & Pays, O. (2021a). Diel cycle in a farmland bird is shaped by contrasting predation and human pressures. *Biological Journal of the Linnean Society*, *134*(1), 68-84. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blab060>
- Harmange, C., Bretagnolle, V., Pays, O., Sarasa, M., & Moreau, J. (2021b). Linking personality and health to use of space in the gray partridge : Perspectives for management. *European Journal of Wildlife Research*, *67*(5), 81. <https://doi.org/10.1007/s10344-021-01526-x>
- Harmange, C., Bretagnolle, V., Sarasa, M., & Pays, O. (2019). Changes in habitat selection patterns of the gray partridge *Perdix perdix* in relation to agricultural landscape dynamics over the past two decades. *Ecology and Evolution*, *9*(9), 5236-5247. <https://doi.org/10.1002/ece3.5114>
- Hart, J. D., Milsom, T. P., Fisher, G., Wilkins, V., Moreby, S. J., Murray, A. W. A., & Robertson, P. A. (2006). The relationship between yellowhammer breeding performance, arthropod abundance and insecticide applications on arable farmland : Insecticides, arthropods and yellowhammer productivity. *Journal of Applied Ecology*, *43*(1), 81-91. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2005.01103.x>

- Hasenbein, S., Peralta, J., Lawler, S. P., & Connon, R. E. (2017). Environmentally relevant concentrations of herbicides impact non-target species at multiple sublethal endpoints. *Science of The Total Environment*, 607-608, 733-743. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.06.270>
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V. P., Marjua, Y., Parker, J., & Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines : Are we underestimating the impact? *Environmental Health Perspectives*, 114(Suppl 1), 40-50. <https://doi.org/10.1289/ehp.8051>
- Hayhow, D. B., Audsen, M. A., Bradbury, R. B., Burnell, D., Copeland, A. I., Crick, H. Q. P., Williams, J. M. (2017). *The State of the UK's Birds 2017*. Sandy, Bedfordshire
- Heine-Fuster, I., Aránguiz-Acuña, A., & Ramos-Jiliberto, R. (2017). Pesticide increases transgenerational cost of inducible defenses in a freshwater rotifer. *Hydrobiologia*, 799(1), 249-260. <https://doi.org/10.1007/s10750-017-3221-4>
- Hellou, J. (2011). Behavioural ecotoxicology, an « early warning » signal to assess environmental quality. *Environmental Science and Pollution Research International*, 18(1), 1-11. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0367-2>
- Hellou, J., Cheeseman, K., Desnoyers, E., Johnston, D., Jouvenelle, M.-L., Leonard, J., Robertson, S., & Walker, P. (2008). A non-lethal chemically based approach to investigate the quality of harbour sediments. *Science of The Total Environment*, 389(1), 178-187. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.08.010>
- Hellou, J., Cook, A., Lalonde, B., Walker, P., Dunphy, K., & MacLeod, S. (2009). Escape and survival of *Corophium volutator* and *Ilyanassa obsoleta* exposed to freshwater and chlorothalonil. *Journal of Environmental Science and Health, Part A*, 44(8), 778-790. <https://doi.org/10.1080/10934520902928404>
- Henry, M., Cerrutti, N., Aupinel, P., Decourtye, A., Gayraud, M., Odoux, J.-F., Pissard, A., Rüger, C., & Bretagnolle, V. (2015). Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. *Proceedings. Biological Sciences*, 282(1819), 20152110. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2110>
- Hereford, J. (2009). A quantitative survey of local adaptation and fitness trade-offs. *The American Naturalist*, 173(5), 579-588. <https://doi.org/10.1086/597611>
- Hernández, A. F., Gil, F., & Lacasaña, M. (2017). Toxicological interactions of pesticide mixtures : An update. *Archives of Toxicology*, 91(10), 3211-3223. <https://doi.org/10.1007/s00204-017-2043-5>
- Hernández, M., González, L. M., Oria, J., Sánchez, R., & Arroyo, B. (2008). Influence of contamination by organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls on the breeding of the Spanish imperial eagle (*Aquila adalberti*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(2), 433. <https://doi.org/10.1897/07-308R.1>
- Hilbers, J. P., Hoondert, R. P. J., Schipper, A. M., & Huijbregts, M. A. J. (2018). Using field data to quantify chemical impacts on wildlife population viability. *Ecological Applications*, 28(3), 771-785. <https://www.jstor.org/stable/26623184>
- Hladik, M. L., Main, A. R., & Goulson, D. (2018). Environmental risks and challenges associated with neonicotinoid insecticides. *Environmental Science & Technology*, 52(6), 3329-3335. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b06388>
- Hladik, M. L., Vandever, M., & Smalling, K. L. (2016). Exposure of native bees foraging in an agricultural landscape to current-use pesticides. *Science of The Total Environment*, 542, 469-477. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.10.077>
- Homberger, B., Jenni-Eiermann, S., Roulin, A., & Jenni, L. (2013). The impact of pre- and post-natal contexts on immunity, glucocorticoids and oxidative stress resistance in wild and domesticated grey partridges. *Functional Ecology*, 27(4), 1042-1054. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12092>

- Hopkins, W. A., Mendonça, M. T., & Congdon, J. D. (1997). Increased circulating levels of testosterone and corticosterone in southern toads, *Bufo terrestris*, exposed to coal combustion waste. *General and Comparative Endocrinology*, 108(2), 237-246. <https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6969>
- Hoshi, N., Hirano, T., Omotehara, T., Tokumoto, J., Umemura, Y., Mantani, Y., Tanida, T., Warita, K., Tabuchi, Y., Yokoyama, T., & Kitagawa, H. (2014). Insight into the mechanism of reproductive dysfunction caused by neonicotinoid pesticides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(9), 1439-1443. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00359>
- Hua, J., Jones, D. K., Mattes, B. M., Cothran, R. D., Relyea, R. A., & Hoverman, J. T. (2015). The contribution of phenotypic plasticity to the evolution of insecticide tolerance in amphibian populations. *Evolutionary Applications*, 8(6), 586-596. <https://doi.org/10.1111/eva.12267>
- Hua, J., Wuerthner, V. P., Jones, D. K., Mattes, B., Cothran, R. D., Relyea, R. A., & Hoverman, J. T. (2017). Evolved pesticide tolerance influences susceptibility to parasites in amphibians. *Evolutionary Applications*, 10(8), 802-812. <https://doi.org/10.1111/eva.12500>
- Hudson, R. H., Haegele, M. A., & Tucker, R. K. (1979). Acute oral and percutaneous toxicity of pesticides to mallards : Correlations with mammalian toxicity data. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 47(3), 451-460. [https://doi.org/10.1016/0041-008X\(79\)90515-5](https://doi.org/10.1016/0041-008X(79)90515-5)
- Humann-Guilleminot, S., Binkowski, \Lukasz J., Jenni, L., Hilke, G., Glauser, G., & Helfenstein, F. (2019a). A nation-wide survey of neonicotinoid insecticides in agricultural land with implications for agri-environment schemes. *Journal of Applied Ecology*, 56(7), 1502-1514.
- Humann-Guilleminot, S., Laurent, S., Bize, P., Roulin, A., Glauser, G., & Helfenstein, F. (2021). Contamination by neonicotinoid insecticides in barn owls (*Tyto alba*) and Alpine swifts (*Tachymarptis melba*). *Science of the Total Environment*, 785, 147403. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147403>
- Humann-Guilleminot, S., Tassin de Montaigu, C., Sire, J., Grünig, S., Gning, O., Glauser, G., Vallat, A., & Helfenstein, F. (2019b). 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, K. A., Bird, D. M., Mineau, P., & Shutt, L. (1992). Selective predation of organophosphate-exposed prey by American kestrels. *Animal Behaviour*, 43(6), 971-976. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(06\)80010-2](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(06)80010-2)
- Hussein, M., Singh, V., Sethi, R., Singh, A. K., & Hassan, M. A. (2014). Study on embryonic effects of neonicotinoid insecticide on chick embryos. *Journal of the Anatomical Society of India*, 63(2), 125-129. <https://doi.org/10.1016/j.jasi.2014.11.006>
- Ishaaya, I., & Degheele, D. (Éds.). (1998). *Insecticides with Novel Modes of Action : Mechanisms and Application*. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-662-03565-8>
- Jagannath, A., Shore, R. F., Walker, L. A., Ferns, P. N., & Gosler, A. G. (2007). Eggshell pigmentation indicates pesticide contamination : Eggshell colour and pesticides. *Journal of Applied Ecology*, 45(1), 133-140. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2007.01386.x>
- Jansen, M., Coors, A., Stoks, R., & De Meester, L. (2011). Evolutionary ecotoxicology of pesticide resistance : A case study in *Daphnia*. *Ecotoxicology*, 20(3), 543-551. <https://doi.org/10.1007/s10646-011-0627-z>
- Jeschke, P., & Nauen, R. (2005). Neonicotinoid insecticides, 53-105. In: *Comprehensive Molecular Insect Science* (Eds. L. I. Gilbert, L. Iatrou & S. S. Gill). Elsevier, Oxford, UK, 459 pp.
- Jonker, M. J., Svendsen, C., Bedaux, J. J. M., Bongers, M., & Kammenga, J. E. (2005). Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(10), 2701. <https://doi.org/10.1897/04-431R.1>
- Jouanneau, W., Léandri-Breton, D.-J., Corbeau, A., Herzke, D., Moe, B., Nikiforov, V. A., Gabrielsen, G. W., & Chastel, O. (2022). A bad start in life? Maternal transfer of legacy and



- emerging poly- and perfluoroalkyl substances to eggs in an Arctic seabird. *Environmental Science & Technology*, 56(10), 6091-6102. <https://doi.org/10.1021/acs.est.1c03773>
- Katagi, T., & Fujisawa, T. (2021). Acute toxicity and metabolism of pesticides in birds. *Journal of Pesticide Science*, 46(4), 305-321. <https://doi.org/10.1584/jpestics.D21-028>
- Kawecki, T. J., & Ebert, D. (2004). Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, 7(12), 1225-1241. <https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2004.00684.x>
- Keller, L. F., Biebach, I., Ewing, S. R., & Hoeck, P. E. (2012). The genetics of reintroductions: Inbreeding and genetic drift. In J.G. Ewen, D.P. Armstrong, K.A. Parker, & P.J. Seddon (Eds.), *Reintroduction biology: integrating science and management* (pp. 360–394). Chichester, UK: Wiley-Blackwell.
- Khalil, S. R., Awad, A., & Mohammed, H. H. (2017). Behavioral response and gene expression changes in fipronil-administered male Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Environmental Pollution*, 223, 51-61. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.12.027>
- Kitowski, I., Łopucki, R., Stachniuk, A., & Fornal, E. (2021). Banned pesticide still poisoning EU raptors. *Science*, 371(6536), 1319-1320. <https://doi.org/10.1126/science.abh0840>
- Kobiela, M. E., Cristol, D. A., & Swaddle, J. P. (2015). Risk-taking behaviours in zebra finches affected by mercury exposure. *Animal Behaviour*, 103, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2015.02.024>
- Köhler, H.-R., & Triebkorn, R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides : Can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341(6147), 759-765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>
- Krone, O., Auls, S., & Neurath, H. (2017). Case report : Secondary poisoning in a white-tailed sea eagle caused by carbofuran. *European Journal of Wildlife Research*, 63(6), 91. <https://doi.org/10.1007/s10344-017-1148-8>
- Kuijper, D. P. J., Oosterveld, E., & Wymenga, E. (2009). Decline and potential recovery of the European grey partridge (*Perdix perdix*) population—A review. *European Journal of Wildlife Research*, 55(5), 455-463. <https://doi.org/10.1007/s10344-009-0311-2>
- Kuzukiran, O., Simsek, I., Yorulmaz, T., Yurdakok-Dikmen, B., Ozkan, O., & Filazi, A. (2021). Multiresidues of environmental contaminants in bats from Turkey. *Chemosphere*, 282, 131022. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131022>
- Larras, F., Charles, S., Chaumot, A., Pelosi, C., Le Gall, M., Mamy, L., & Beaudouin, R. (2022). A critical review of effect modeling for ecological risk assessment of plant protection products. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(29), 43448-43500. <https://doi.org/10.1007/s11356-022-19111-3>
- Leenhardt, S., Mamy L., Pesce, S., Sanchez, W., et al. (2022). Impacts des produits phytopharmaceutiques sur la biodiversité et les services écosystémiques, Synthèse du rapport d'ESCo, INRAE - Ifremer (France)
- Lewis, K. A., Tzilivakis, J., Warner, D. J., & Green, A. (2016). An international database for pesticide risk assessments and management. *Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal*, 22(4), 1050-1064. <https://doi.org/10.1080/10807039.2015.1133242>
- Li, Y., Miao, R., & Khanna, M. (2020). Neonicotinoids and decline in bird biodiversity in the United States. *Nature Sustainability*, 3(12), 1027-1035. <https://doi.org/10.1038/s41893-020-0582-x>
- Liess, M., Liebmann, L., Vormeier, P., Weisner, O., Altenburger, R., Borchardt, D., Brack, W., Chatzinotas, A., Escher, B., Foit, K., Gunold, R., Henz, S., Hitzfeld, K. L., Schmitt-Jansen, M., Kamjunke, N., Kaske, O., Knillmann, S., Krauss, M., Küster, E., ... Reemtsma, T. (2021). Pesticides are the dominant stressors for vulnerable insects in lowland streams. *Water Research*, 201, 117262. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117262>
- Liu, X., Liu, C., Wang, P., Liang, Y., Zhan, J., Zhou, Z., & Liu, D. (2019). Distribution, metabolism and metabolic disturbances of alpha-cypermethrin in embryo development, chick growth and

- adult hens. *Environmental Pollution*, 249, 390-397.  
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2019.03.017>
- Lopez-Antia, A., Feliu, J., Camarero, P. R., Ortiz-Santaliestra, M. E., & Mateo, R. (2016). Risk assessment of pesticide seed treatment for farmland birds using refined field data. *Journal of Applied Ecology*, 53(5), 1373-1381.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M. E., Blas, E. G., Camarero, P. R., Mougeot, F., & Mateo, R. (2015b). Adverse effects of thiram-treated seed ingestion on the reproductive performance and the offspring immune function of the red-legged partridge. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 34(6), 1320-1329.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M. E., Camarero, P. R., Mougeot, F., & Mateo, R. (2015a). Assessing the risk of fipronil-treated seed ingestion and associated adverse effects in the red-legged partridge. *Environmental science & technology*, 49(22), 13649-13657.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M. E., & Mateo, R. (2014). Experimental approaches to test pesticide-treated seed avoidance by birds under a simulated diversification of food sources. *Science of the Total Environment*, 496, 179-187.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M. E., Mougeot, F., Camarero, P. R., & Mateo, R. (2018). Brood size is reduced by half in birds feeding on flutriafol-treated seeds below the recommended application rate. *Environmental Pollution*, 243, 418-426.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M. E., Mougeot, F., Camarero, P. R., & Mateo, R. (2021). Birds feeding on tebuconazole treated seeds have reduced breeding output. *Environmental Pollution*, 271, 116292. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2020.116292>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M. E., Mougeot, F., & Mateo, R. (2013). Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology*, 22(1), 125-138.
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M. E., Mougeot, F., & Mateo, R. (2015c). Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environmental research*, 136, 97-107.
- Luzardo, O. P., Ruiz-Suárez, N., Henríquez-Hernández, L. A., Valerón, P. F., Camacho, M., Zumbado, M., & Boada, L. D. (2014). Assessment of the exposure to organochlorine pesticides, PCBs and PAHs in six species of predatory birds of the Canary Islands, Spain. *Science of The Total Environment*, 472, 146-153. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.11.021>
- Lv, Y., Bing, Q., Lv, Z., Xue, J., Li, S., Han, B., Yang, Q., Wang, X., & Zhang, Z. (2020). Imidacloprid-induced liver fibrosis in quails via activation of the TGF- $\beta$ 1/Smad pathway. *Science of The Total Environment*, 705, 135915. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135915>
- MacLachlan, D. J. (2008). Transfer of fat-soluble pesticides from contaminated feed to poultry tissues and eggs. *British Poultry Science*, 49(3), 290-298. <https://doi.org/10.1080/00071660802123344>
- Major, A. T., & Smith, C. A. (2016). Sex Reversal in Birds. *Sexual Development*, 10(5-6), 288-300. <https://doi.org/10.1159/000448365>
- Mallard, F., Nolte, V., & Schlötterer, C. (2020). The evolution of phenotypic plasticity in response to temperature stress. *Genome Biology and Evolution*, 12(12), 2429-2440. <https://doi.org/10.1093/gbe/evaa206>
- Mañosa, S., Mateo, R., & Guitart, R. (2001). A review of the effects of agricultural and industrial contamination on the Ebro delta biota and wildlife. *Environmental Monitoring and Assessment*, 71(2), 187-205. <https://doi.org/10.1023/A:1017545932219>
- Maroni, M., Colosio, C., Ferioli, A., & Fait, A. (2000). Introduction. *Toxicology*, 143(1), 5-118. [https://doi.org/10.1016/S0300-483X\(99\)00152-3](https://doi.org/10.1016/S0300-483X(99)00152-3)
- Martin, T. J. (1987). Broad versus narrow-spectrum herbicides and the future of mixtures. *Pesticide Science*, 20(4), 289-299. <https://doi.org/10.1002/ps.2780200405>

- Martinez-Lopez, E., Maria-Mojica, P., Martinez, J. E., Calvo, J. F., Wright, J., Shore, R. F., Romero, D., & Garcia-Fernandez, A. J. (2007). Organochlorine residues in booted eagle (*Hieraaetus pennatus*) and goshawk (*Accipiter gentilis*) eggs from southeastern Spain. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(11), 2373. <https://doi.org/10.1897/07-057R.1>
- Mateo-Tomás, P., Olea, P. P., Mínguez, E., Mateo, R., & Viñuela, J. (2020). Direct evidence of poison-driven widespread population decline in a wild vertebrate. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 117(28), 16418-16423. <https://doi.org/10.1073/pnas.1922355117>
- Matthews, B. J., & Vosshall, L. B. (2020). How to turn an organism into a model organism in 10 ‘easy’ steps. *Journal of Experimental Biology*, 223(Suppl\_1), jeb218198. <https://doi.org/10.1242/jeb.218198>
- Maul, J. D., Blackstock, C., & Brain, R. A. (2018). Derivation of avian dermal LD50 values for dermal exposure models using in vitro percutaneous absorption of [14C]-atrazine through rat, mallard, and northern bobwhite full thickness skin. *Science of The Total Environment*, 630, 517-525. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.02.206>
- Maxwell, S. L., Fuller, R. A., Brooks, T. M., & Watson, J. E. M. (2016). Biodiversity : The ravages of guns, nets and bulldozers. *Nature*, 536(7615), 143-145. <https://doi.org/10.1038/536143a>
- McEwen, L. C., & Brown, R. L. (1966). Acute toxicity of dieldrin and malathion to wild sharp-tailed grouse. *The Journal of Wildlife Management*, 30(3), 604. <https://doi.org/10.2307/3798755>
- McGraw, K. J., & Ardia, D. R. (2003). Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors : An experimental test. *The American Naturalist*, 162(6), 704-712. <https://doi.org/10.1086/378904>
- McKenzie, A. J., Vickery, J. A., Leifert, C., Shotton, P., & Whittingham, M. J. (2011). Disentangling the effects of fertilisers and pesticides on winter stubble use by farmland birds. *Basic and Applied Ecology*, 12(1), 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2010.10.007>
- McNab, B.K. (2002). *The physiological ecology of vertebrates: a view from energetics*. Cornell University Press.
- Meled, M., Thrasyvoulou, A., & Belzunces, L. P. (1998). Seasonal variations in susceptibility of *Apis mellifera* to the synergistic action of prochloraz and deltamethrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 17(12), 2517-2520. <https://doi.org/10.1002/etc.5620171220>
- Millot, F., Decors, A., Mastain, O., Quintaine, T., Berny, P., Vey, D., Lasseur, R., & Bro, E. (2017). Field evidence of bird poisonings by imidacloprid-treated seeds : A review of incidents reported by the French SAGIR network from 1995 to 2014. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(6), 5469-5485. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-8272-y>
- Mineau, P. (2002). Estimating the probability of bird mortality from pesticide sprays on the basis of the field study record. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(7), 1497-1506.
- Mineau, P. (2005). A review and analysis of study endpoints relevant to the assessment of “long term” pesticide toxicity in avian and mammalian wildlife. *Ecotoxicology*, 14(8), 775-799. <https://doi.org/10.1007/s10646-005-0028-2>
- Mineau, P. (2011). Barking up the wrong perch : Why we should stop ignoring non dietary routes of pesticide exposure in birds. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 7(2), 297-299. <https://doi.org/10.1002/ieam.174>
- Mineau, P. (2012). A comprehensive re-analysis of pesticide dermal toxicity data in birds and comparison with the rat. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 34(2), 416-427. <https://doi.org/10.1016/j.etap.2012.05.010>
- Mineau, P. (2013). Avian mortality from pesticides used in agriculture in Canada. *Avian Conservation and Ecology*, 8, 126–152
- Mineau, P., Boersma, D. C., & Collins, B. (1994). An analysis of avian reproduction studies submitted for pesticide registration. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 29(3), 304-329. [https://doi.org/10.1016/0147-6513\(94\)90005-1](https://doi.org/10.1016/0147-6513(94)90005-1)

- Mineau, P., Collins, B. T., & Baril, A. (1996). On the use of scaling factors to improve interspecies extrapolation of acute toxicity in birds. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 24(1), 24-29. <https://doi.org/10.1006/rtp.1996.0061>
- Mineau, P., Fletcher, M. R., Glazer, L. C., et al. (1999). Poisoning of raptors with organophosphorous and carbamates pesticides with emphasis on Canada, U.S. & U.K. *Journal of Raptor Research*, 33, 1–37.
- Mineau, P., & Palmer, C. (2013). *The impact of the nation's most widely used insecticides on birds*. American Bird Conservancy, The Plains, Virginia, USA.
- Mineau, P., & Tucker, K. R. 2002. Improving detection of pesticide poisoning in birds. *Journal of Wildlife Rehabilitation*, 25(2), 4–13.
- Mineau, P., & Whiteside, M. (2006). Lethal risk to birds from insecticide use in the United States—a spatial and temporal analysis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(5), 1214. <https://doi.org/10.1897/05-035R.1>
- Mineau, P., & Whiteside, M. (2005). Ability to predict effects in birds: linking tiers and extrapolation. In Liess, M., Brown, C., Dohmen, G. P., Duquesne, S., Hart, A., Heimbach, F., Kreuger, J., Lagadic, L., Maund, S., Streloke, M., & Tarazona, J. V. (Eds.), *Effects of Pesticides in the Field Workshop* (pp. 95–97). SETAC Press.
- Mineau, P., & Whiteside, M. (2013). Pesticide acute toxicity is a better correlate of U.S. grassland bird declines than agricultural intensification. *PLoS ONE*, 8(2), e57457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057457>
- Mirtl, M., T. Borer, E., Djukic, I., Forsius, M., Haubold, H., Hugo, W., Jourdan, J., Lindenmayer, D., McDowell, W. H., Muraoka, H., Orenstein, D. E., Pauw, J. C., Peterseil, J., Shibata, H., Wohner, C., Yu, X., & Haase, P. (2018). Genesis, goals and achievements of Long-Term Ecological Research at the global scale: A critical review of ILTER and future directions. *Science of The Total Environment*, 626, 1439-1462. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.001>
- Mitra, A., Chatterjee, C., & Mandal, F. B. (2011). Synthetic chemical pesticides and their effects on birds. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5(2), 81-96.
- Mohanty, B., Pandey, S. P., & Tsutsui, K. (2017). Thyroid disrupting pesticides impair the hypothalamic-pituitary-testicular axis of a wildlife bird, *Amandava amandava*. *Reproductive Toxicology*, 71, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.04.006>
- Møller, A. P., Biard, C., Blount, J. D., et al. (2000). Carotenoid dependent signals indicators of foraging efficiency immunocompetence or detoxification ability. *Avian and Poultry Biology Reviews*, 11, 137–159
- Monclús, L., Ballesteros-Cano, R., De La Puente, J., Lacorte, S., & Lopez-Bejar, M. (2018). Influence of persistent organic pollutants on the endocrine stress response in free-living and captive red kites (*Milvus milvus*). *Environmental Pollution*, 242, 329-337. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.06.086>
- Moorcroft, D., Whittingham, M. J., Bradbury, R. B., & Wilson, J. D. (2002). The selection of stubble fields by wintering granivorous birds reflects vegetation cover and food abundance. *Journal of Applied Ecology*, 39(3), 535-547. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2002.00730.x>
- Moreau, J., Monceau, K., Crépin, M., Tochon, F. D., Mondet, C., Fraikin, M., Teixeira, M., & Bretagnolle, V. (2021). Feeding partridges with organic or conventional grain triggers cascading effects in life-history traits. *Environmental Pollution*, 278, 116851. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116851>
- Moreau, J., Monceau, K., Gonnet, G., Pfister, M., & Bretagnolle, V. (2022). Organic farming positively affects the vitality of passerine birds in agricultural landscapes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 336, 108034. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108034>
- Mostafalou, S., & Abdollahi, M. (2017). Pesticides : An update of human exposure and toxicity. *Archives of Toxicology*, 91(2), 549-599. <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1849-x>

- Ntemiri, K., Saravia, V., Angelidis, C., Baxevani, K., Probonas, M., Kret, E., Mertzanis, Y., Iliopoulos, Y., Georgiadis, L., Skartsi, D., Vavylis, D., Manolopoulos, A., Michalopoulou, P., & Xirouchakis, S. M. (2018). Animal mortality and illegal poison bait use in Greece. *Environmental Monitoring and Assessment*, *190*(8), 488. <https://doi.org/10.1007/s10661-018-6838-5>
- Odsjö, T., & Sondell, J. (2014). Eggshell thinning of osprey (*Pandion haliaetus*) breeding in Sweden and its significance for egg breakage and breeding outcome. *Science of The Total Environment*, *470-471*, 1023-1029. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2013.10.051>
- OECD. (2016). Test No. 223: Avian acute oral toxicity Test in OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Editions OCDE, Paris, France
- ONCFS. (2014). Au chevet de la perdrix grise de plaine. Réflexion sur la situation actuelle. 1– 8.
- Ortiz-Santaliestra, M. E., Alcaide, V., Camarero, P. R., Mateo, R., & Mougeot, F. (2020). Egg overspray with herbicides and fungicides reduces survival of red-legged partridge chicks. *Environmental Science & Technology*, *54*(19), 12402-12411. <https://doi.org/10.1021/acs.est.0c04203>
- Ortiz-Santaliestra, M. E., Resano-Mayor, J., Hernández-Matías, A., Rodríguez-Estival, J., Camarero, P. R., Moleón, M., Real, J., & Mateo, R. (2015). Pollutant accumulation patterns in nestlings of an avian top predator : Biochemical and metabolic effects. *Science of The Total Environment*, *538*, 692-702. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.053>
- Ots, I., Murumägi, A., & Hõrak, P. (1998). Haematological health state indices of reproducing great tits : Methodology and sources of natural variation: great tit health state indices. *Functional Ecology*, *12*(4), 700-707. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2435.1998.00219.x>
- Ottinger, M. A., Lavoie, E. T., Abdelnabi, M., Quinn, M. J., Marcell, A., & Dean, K. (2009). An overview of dioxin-like compounds, pcb, and pesticide exposures associated with sexual differentiation of neuroendocrine systems, fluctuating asymmetry, and behavioral effects in birds. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, *27*(4), 286-300. <https://doi.org/10.1080/10590500903310229>
- Ottinger, M. A., Lavoie, E., Thompson, N., Barton, A., Whitehouse, K., Barton, M., Abdelnabi, M., Quinn, M., Panzica, G., & Viglietti-Panzica, C. (2008). Neuroendocrine and behavioral effects of embryonic exposure to endocrine disrupting chemicals in birds. *Brain Research Reviews*, *57*(2), 376-385. <https://doi.org/10.1016/j.brainresrev.2007.08.011>
- Ottinger, M. A., Wu, J. M., Hazelton, J. L., Abdelnabi, M. A., Thompson, N., Quinn, M. L., Donoghue, D., Schenck, F., Ruscio, M., Beavers, J., & Jaber, M. (2005). Assessing the consequences of the pesticide methoxychlor : Neuroendocrine and behavioral measures as indicators of biological impact of an estrogenic environmental chemical. *Brain Research Bulletin*, *65*(3), 199-209. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2004.11.019>
- Pacyna-Kuchta, A. D. (2022). What should we know when choosing feather, blood, egg or preen oil as biological samples for contaminants detection? A non-lethal approach to bird sampling for PCBs, OCPs, PBDEs and PFASs. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 1-25.
- Pan, Y., Chang, J., Xu, P., Xie, Y., Yang, L., Hao, W., Li, J., & Wan, B. (2022). Twenty-four hours of Thiamethoxam : In vivo and molecular dynamics simulation study on the toxicokinetic and underlying mechanisms in quails (*Coturnix japonica*). *Journal of Hazardous Materials*, *427*, 128159. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128159>
- Pandey, S. P., Tsutsui, K., & Mohanty, B. (2017). Endocrine disrupting pesticides impair the neuroendocrine regulation of reproductive behaviors and secondary sexual characters of red munia (*Amandava amandava*). *Physiology & behavior*, *173*, 15-22.
- Panizzi, S., Suci, N. A., & Trevisan, M. (2017). Combined ecotoxicological risk assessment in the frame of European authorization of pesticides. *Science of The Total Environment*, *580*, 136-146. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2016.10.154>

- Park, S., Song, G., & Lim, W. (2020). Anti-developmental effects of imazosulfuron on zebrafish embryos during development. *Journal of Animal Reproduction and Biotechnology*, 35(1), 28-34. <https://doi.org/10.12750/JARB.35.1.28>
- Patnode, K. A., & White, D. H. (1991). Effects of pesticides on songbird productivity in conjunction with pecan cultivation in southern Georgia: A multiple-exposure experimental design. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10(11), 1479-1486. <https://doi.org/10.1002/etc.5620101113>
- Peakall, D. B. (1985). Behavioral responses of birds to pesticides and other contaminants. In F. A. Gunther (Ed.), *Residue Reviews* (p. 45-77). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5140-8\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4612-5140-8_3)
- Peig, J., & Green, A. J. (2009). New perspectives for estimating body condition from mass/length data: The scaled mass index as an alternative method. *Oikos*, 118(12), 1883-1891. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0706.2009.17643.x>
- Pelosi, C., Bertrand, C., Daniele, G., Coeurdassier, M., Benoit, P., Néliu, S., Lafay, F., Bretagnolle, V., Gaba, S., Vulliet, E., & Fritsch, C. (2021). Residues of currently used pesticides in soils and earthworms: A silent threat? *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 305, 107167. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2020.107167>
- Peraica, M., Capodicasa, E., Moretto, A., & Lotti, M. (1993). Organophosphate polyneuropathy in chicks. *Biochemical Pharmacology*, 45(1), 131-135. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(93\)90385-A](https://doi.org/10.1016/0006-2952(93)90385-A)
- Plaza, P. I., Martínez-López, E., & Lambertucci, S. A. (2019). The perfect threat: Pesticides and vultures. *Science of The Total Environment*, 687, 1207-1218. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.06.160>
- Poliserpi, M. B., Cristos, D. S., & Brodeur, J. C. (2021). Imidacloprid seed coating poses a risk of acute toxicity to small farmland birds: A weight-of-evidence analysis using data from the grayish baywing *Agelaioides badius*. *Science of The Total Environment*, 763, 142957. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.142957>
- Ponce-Boutin, F., Brun, J.-C., Mathon, J.-F., & Ricci, J.-C. (2006). Propositions pour une gestion durable des populations de perdrix rouges. Quelle place pour les lâchers? *Faune Sauvage*, 274, 48-55.
- Potts, G. R. (1980). The effects of modern agriculture, nest predation and game management on the population ecology of partridges (*Perdix perdix* and *Alectoris rufa*). In *Advances in Ecological Research* (Vol. 11, p. 1-79). Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0065-2504\(08\)60266-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2504(08)60266-4)
- Potts, G. R., & Aebischer, N. J. (2008). Population dynamics of the Grey Partridge *Perdix perdix* 1793-1993: Monitoring, modelling and management. *Ibis*, 137, S29-S37. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.1995.tb08454.x>
- Putala, A., & Hissa, R. (1995). Effects of hand-rearing on physiology and anatomy in the grey partridge. *Wildlife Biology*, 1(1), 27-31. <https://doi.org/10.2981/wlb.1995.006>
- Putala, A., & Hissa, R. (1998). Breeding dispersal and demography of wild and hand-reared grey partridges *Perdix perdix* in Finland. *Wildlife Biology*, 4(3), 137-145. <https://doi.org/10.2981/wlb.1998.016>
- Quaglia, G., Joris, I., Broekx, S., Desmet, N., Koopmans, K., Vandaele, K., & Seuntjens, P. (2019). A spatial approach to identify priority areas for pesticide pollution mitigation. *Journal of Environmental Management*, 246, 583-593. <https://doi.org/10.1016/j.jenvman.2019.04.120>
- Rabdeau, J., Badenhauer, I., Gaffard, A., Mangelinck, C., Moreau, J., Bretagnolle, V., & Monceau, K. (2021). Assortative pairing for boldness and consequences for reproductive success in Montagu's harrier. *Biological Journal of the Linnean Society*, 132(4), 759-773. <https://doi.org/10.1093/biolinnean/blaa233>
- Rantanen, E. M., Buner, F., Riordan, P., Sotherton, N., & Macdonald, D. W. (2010a). Habitat preferences and survival in wildlife reintroductions: An ecological trap in reintroduced grey

- partridges: Ecological traps in wildlife reintroductions. *Journal of Applied Ecology*, 47(6), 1357-1364. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2010.01867.x>
- Rantanen, E. M., Buner, F., Riordan, P., Sotherton, N., & Macdonald, D. W. (2010b). Vigilance, time budgets and predation risk in reintroduced captive-bred grey partridges *Perdix perdix*. *Applied Animal Behaviour Science*, 127(1-2), 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2010.08.002>
- Rawi, S. M., Al-Logmani, A. S., & Hamza, R. Z. (2019). Neurological alterations induced by formulated imidacloprid toxicity in Japanese quails. *Metabolic Brain Disease*, 34(2), 443-450.
- Reese, T. A., Bi, K., Kambal, A., Filali-Mouhim, A., Beura, L. K., Bürger, M. C., Pulendran, B., Sekaly, R.-P., Jameson, S. C., Masopust, D., Haining, W. N., & Virgin, H. W. (2016). Sequential infection with common pathogens promotes human-like immune gene expression and altered vaccine response. *Cell Host & Microbe*, 19(5), 713-719. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.003>
- Rinaud, T., Harmange, C., Pays, O., Sarasa, M., Saillard, M., & Bretagnolle, V. (2020). Interspecific competition between two partridges in farmland landscapes. *Animal Behaviour*, 165, 23-34. <https://doi.org/10.1016/j.anbehav.2020.04.018>
- Ripple, W. J., Wolf, C., Newsome, T. M., Betts, M. G., Ceballos, G., Courchamp, F., Hayward, M. W., Valkenburgh, B., Wallach, A. D., & Worm, B. (2019). Are we eating the world's megafauna to extinction? *Conservation Letters*, 12(3). <https://doi.org/10.1111/conl.12627>
- Rizzati, V., Briand, O., Guillou, H., & Gamet-Payrastre, L. (2016). Effects of pesticide mixtures in human and animal models : An update of the recent literature. *Chemico-Biological Interactions*, 254, 231-246. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2016.06.003>
- Robinson, R. (1965). *Genetics of the Norway rat*. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2013-0-05370-4>
- Robinson, R. A., & Sutherland, W. J. (2002). Post-war changes in arable farming and biodiversity in Great Britain. *Journal of Applied Ecology*, 39(1), 157-176. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2002.00695.x>
- Rodrigues, A., Gaffard, A., Moreau, J., Monceau, K., Delhomme, O., & Millet, M. (2023). Analytical development for the assessment of pesticide contaminations in blood and plasma of wild birds : The case of grey partridges (*Perdix perdix*). *Journal of Chromatography A*, 1687, 463681. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463681>
- Rowe, M., Czirják, G. Á., McGraw, K. J., & Giraudeau, M. (2011). Sexual ornamentation reflects antibacterial activity of ejaculates in mallards. *Biology Letters*, 7(5), 740-742. <https://doi.org/10.1098/rsbl.2011.0276>
- Rust, M. (2017). The biology and ecology of cat fleas and advancements in their pest management : A review. *Insects*, 8(4), 118. <https://doi.org/10.3390/insects8040118>
- Ruuskanen, S., Rainio, M. J., Uusitalo, M., Saikkonen, K., & Helander, M. (2020). Effects of parental exposure to glyphosate-based herbicides on embryonic development and oxidative status: A long-term experiment in a bird model. *Scientific Reports*, 10(1), 6349. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63365-1>
- Ruzzin, J., Petersen, R., Meugnier, E., Madsen, L., Lock, E.-J., Lillefosse, H., Ma, T., Pesenti, S., Sonne, S. B., Marstrand, T. T., Malde, M. K., Du, Z.-Y., Chavey, C., Fajas, L., Lundebye, A.-K., Brand, C. L., Vidal, H., Kristiansen, K., & Frøylund, L. (2010). Persistent organic pollutant exposure leads to insulin resistance syndrome. *Environmental Health Perspectives*, 118(4), 465-471. <https://doi.org/10.1289/ehp.0901321>
- Rymešová, D., Šmilauer, P., & Šálek, M. (2012). Sex- and age-biased mortality in wild Grey Partridge *Perdix perdix* populations. *Ibis*, 154(4), 815-824. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2012.01259.x>
- Rymešová, D., Tomášek, O., & Šálek, M. (2013). Differences in mortality rates, dispersal distances and breeding success of commercially reared and wild grey partridges in the Czech agricultural

- landscape. *European Journal of Wildlife Research*, 59(2), 147-158. <https://doi.org/10.1007/s10344-012-0659-6>
- Sabatier, P., Poulenard, J., Fanget, B., Reyss, J.-L., Develle, A.-L., Wilhelm, B., Ployon, E., Pignol, C., Naffrechoux, E., Dorioz, J.-M., Montuelle, B., & Arnaud, F. (2014). Long-term relationships among pesticide applications, mobility, and soil erosion in a vineyard watershed. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(44), 15647-15652. <https://doi.org/10.1073/pnas.1411512111>
- Sánchez-Bayo, F., & Wyckhuys, K. A. G. (2019). Worldwide decline of the entomofauna : A review of its drivers. *Biological Conservation*, 232, 8-27. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2019.01.020>
- Saxena, A. K., Devillers, J., Bhunia, S. S., & Bro, E. (2015). Modelling inhibition of avian aromatase by azole pesticides. *SAR and QSAR in Environmental Research*, 26(7-9), 757-782. <https://doi.org/10.1080/1062936X.2015.1090749>
- Schäfer, R. B., von der Ohe, P. C., Rasmussen, J., Kefford, B. J., Beketov, M. A., Schulz, R., & Liess, M. (2012). Thresholds for the effects of pesticides on invertebrate communities and leaf breakdown in stream ecosystems. *Environmental Science & Technology*, 46(9), 5134-5142. <https://doi.org/10.1021/es2039882>
- Schell, T., Goedkoop, W., Zubrod, J. P., Feckler, A., Lüderwald, S., Schulz, R., & Bundschuh, M. (2018). Assessing the effects of field-relevant pesticide mixtures for their compliance with the concentration addition model – An experimental approach with *Daphnia magna*. *Science of The Total Environment*, 644, 342-349. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.334>
- Scientific Committee on Health and Environmental Risks (SCHER), Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR) and Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS), (2012), Opinion on the Toxicity and Assessment of Chemical Mixtures, 50 pp
- Segner, H., & Baumann, L. (2016). What constitutes a model organism in ecotoxicology? *Integrated Environmental Assessment and Management*, 12(1), 199-200. <https://doi.org/10.1002/ieam.1727>
- Shen, L., Wania, F., Lei, Y. D., Teixeira, C., Muir, D. C. G., & Bidleman, T. F. (2005). Atmospheric distribution and long-range transport behavior of organochlorine pesticides in North America. *Environmental Science & Technology*, 39(2), 409-420. <https://doi.org/10.1021/es049489c>
- Shore, R. F., & Douben, P. E. T. (1994). Predicting ecotoxicological impacts of environmental contaminants on terrestrial small mammals. In G. W. Ware (Ed.), *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* (Vol. 134, p. 49-89). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7068-0\\_3](https://doi.org/10.1007/978-1-4684-7068-0_3)
- Siddig, A. A. H., Ellison, A. M., Ochs, A., Villar-Leeman, C., & Lau, M. K. (2016). How do ecologists select and use indicator species to monitor ecological change? Insights from 14 years of publication in Ecological Indicators. *Ecological Indicators*, 60, 223-230. <https://doi.org/10.1016/j.ecolind.2015.06.036>
- Sih, A., Bell, A., & Johnson, J. C. (2004). Behavioral syndromes : An ecological and evolutionary overview. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(7), 372-378. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.04.009>
- Silva, V., Mol, H. G. J., Zomer, P., Tienstra, M., Ritsema, C. J., & Geissen, V. (2019). Pesticide residues in European agricultural soils – A hidden reality unfolded. *Science of The Total Environment*, 653, 1532-1545. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.10.441>
- Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C. H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E. A. D., Morrissey, C. A., ... Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil) : Trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(1), 5-34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>



- Smith, B. R., & Blumstein, D. T. (2008). Fitness consequences of personality : A meta-analysis. *Behavioral Ecology*, *19*(2), 448-455. <https://doi.org/10.1093/beheco/arm144>
- Smith, H. G., Dänhardt, J., Lindström, Å., & Rundlöf, M. (2010). Consequences of organic farming and landscape heterogeneity for species richness and abundance of farmland birds. *Oecologia*, *162*(4), 1071-1079. <https://doi.org/10.1007/s00442-010-1588-2>
- Socorro, J., Durand, A., Temime-Roussel, B., Gligorovski, S., Wortham, H., & Quivet, E. (2016). The persistence of pesticides in atmospheric particulate phase : An emerging air quality issue. *Scientific Reports*, *6*(1), 33456. <https://doi.org/10.1038/srep33456>
- Sotherton, N. W., Aebischer, N. J., & Ewald, J. A. (2014). Research into action : Grey partridge conservation as a case study. *Journal of Applied Ecology*, *51*(1), 1-5.
- Spooner, F. E. B., Pearson, R. G., & Freeman, R. (2018). Rapid warming is associated with population decline among terrestrial birds and mammals globally. *Global Change Biology*, *24*(10), 4521-4531. <https://doi.org/10.1111/gcb.14361>
- Stanton, R. L., Morrissey, C. A., & Clark, R. G. (2018). Analysis of trends and agricultural drivers of farmland bird declines in North America : A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *254*, 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.11.028>
- Stephen, C., Duff, J. P., Gavier-Widen, D., Ryser-Degiorgis, M. P., Uhart, M. M., Sleeman, J., Nguyen, N., Zimmer, P., Grillo, T., Lee, H., Rijks, J., & Tana, T. (2018). Proposed attributes of national wildlife health programmes. *Revue Scientifique et Technique de l'OIE*, *37*(3), 925-936. <https://doi.org/10.20506/37.3.2896>
- Steyn, L., Bouwman, H., & Maina, J. N. (2018). Associations between DDT and egg parameters of the House Sparrow *Passer domesticus* from the Thohoyandou area of South Africa. *Chemosphere*, *198*, 249-256. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.01.125>
- Story, P., & Cox, M. (2001). Review of the effects of organophosphorus and carbamate insecticides on vertebrates. Are there implications for locust management in Australia? *Wildlife Research*, *28*(2), 179. <https://doi.org/10.1071/WR99060>
- Taylor, R. L., Maxwell, B. D., & Boik, R. J. (2006). Indirect effects of herbicides on bird food resources and beneficial arthropods. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, *116*(3-4), 157-164. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2006.01.012>
- Teillard, F., Jiguet, F., & Tichit, M. (2015). The response of farmland bird communities to agricultural intensity as influenced by its spatial aggregation. *PLOS ONE*, *10*(3), e0119674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119674>
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, *48*(1), 339-364. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112731>
- Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology : mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, *45*(1), 247-268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>
- Topping, C. J., Aldrich, A., & Berny, P. (2020). Overhaul environmental risk assessment for pesticides. *Science*, *367*(6476), 360-363. <https://doi.org/10.1126/science.aay1144>
- Tsui, M. T. K., & Chu, L. M. (2003). Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations : Comparison between different organisms and the effects of environmental factors. *Chemosphere*, *52*(7), 1189-1197. [https://doi.org/10.1016/S0045-6535\(03\)00306-0](https://doi.org/10.1016/S0045-6535(03)00306-0)
- Tucker, G. M., & Heath, M. F. (1994). *Birds in Europe: their conservation status*. Cambridge, UK: BirdLife International.
- Ubuka, T., & Tsutsui, K. (2014). Review : Neuroestrogen regulation of socio-sexual behavior of males. *Frontiers in Neuroscience*, *8*, 323. <https://doi.org/10.3389/fnins.2014.00323>
- UICN France, MNHN, LPO, SEOF and ONCFS. 2019. La Liste rouge des espèces menacées en France - Chapitre Oiseaux de France métropolitaine. Paris, France

- United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division. 2019. World Urbanization Prospects: The 2019 Revision, Online Edition.
- Valverde, I., Espín, S., Gómez-Ramírez, P., Sánchez-Virosta, P., García-Fernández, A. J., & Berny, P. (2022). Developing a European network of analytical laboratories and government institutions to prevent poisoning of raptors. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194(2), 113. <https://doi.org/10.1007/s10661-021-09719-2>
- Van den Steen, E., Pinxten, R., Jaspers, V. L. B., Covaci, A., Barba, E., Carere, C., Cichoń, M., Dubiec, A., Eeva, T., Heeb, P., Kempenaers, B., Lifjeld, J. T., Lubjuhn, T., Mänd, R., Massa, B., Nilsson, J.-Å., Norte, A. C., Orell, M., Podzemny, P., ... Eens, M. (2009). Brominated flame retardants and organochlorines in the European environment using great tit eggs as a biomonitoring tool. *Environment International*, 35(2), 310-317. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2008.08.002>
- Vandegheuchte, M. B., & Janssen, C. R. (2014). Epigenetics in an ecotoxicological context. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 764-765, 36-45. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2013.08.008>
- van Drooge, B., Mateo, R., Vives, Í., Cardiel, I., & Guitart, R. (2008). Organochlorine residue levels in livers of birds of prey from Spain: Inter-species comparison in relation with diet and migratory patterns. *Environmental Pollution*, 153(1), 84-91. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2007.07.029>
- van Oers, K., Drent, P. J., de Goede, P., & van Noordwijk, A. J. (2004). Realized heritability and repeatability of risk-taking behaviour in relation to avian personalities. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 271(1534), 65-73. <https://doi.org/10.1098/rspb.2003.2518>
- Vigie-Nature. (2018). Vigie-Nature. Un réseau de citoyens qui fait avancer la science. Available at <http://www2.mnhn.fr/vigie-nature/>
- Vyas, N. B. (2017). Rodenticide incidents of exposure and adverse effects on non-raptor birds. *Science of The Total Environment*, 609, 68-76. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.07.004>
- Walker, C. H. (2006). Ecotoxicity testing of chemicals with particular reference to pesticides. *Pest Management Science*, 62(7), 571-583. <https://doi.org/10.1002/ps.1218>
- Warner, G. R., Mourikes, V. E., Neff, A. M., Brehm, E., & Flaws, J. A. (2020). Mechanisms of action of agrochemicals acting as endocrine disrupting chemicals. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 502, 110680. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2019.110680>
- Watters, J. V., & Meehan, C. L. (2007). Different strokes : Can managing behavioral types increase post-release success? *Applied Animal Behaviour Science*, 102(3-4), 364-379. <https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.05.036>
- Weston, D. P., Poynton, H. C., Wellborn, G. A., Lydy, M. J., Blalock, B. J., Sepulveda, M. S., & Colbourne, J. K. (2013). Multiple origins of pyrethroid insecticide resistance across the species complex of a nontarget aquatic crustacean, *Hyalella azteca*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(41), 16532-16537. <https://doi.org/10.1073/pnas.1302023110>
- White, D. H., Mitchell, C. A., & Hill, E. F. (1983). Parathion alters incubation behavior of laughing gulls. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 31(1), 93-97. <https://doi.org/10.1007/BF01608772>
- Wood, T. J., & Goulson, D. (2017). The environmental risks of neonicotinoid pesticides : A review of the evidence post 2013. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(21), 17285-17325. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9240-x>
- Woodruff, T. J. (2011). Bridging epidemiology and model organisms to increase understanding of endocrine disrupting chemicals and human health effects. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), 108-117. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2010.11.007>
- Wretenberg, J., Lindström, Å., Svensson, S., Thierfelder, T., & Pärt, T. (2006). Population trends of farmland birds in Sweden and England : Similar trends but different patterns of agricultural

- intensification: Farmland bird trends in Sweden. *Journal of Applied Ecology*, 43(6), 1110-1120. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2006.01216.x>
- WWF. Living Planet Report 2016. Risk and resilience in a new era. Gland, Switzerland: World Wildlife Fund International
- Xu, C., Niu, L., Liu, J., Sun, X., Zhang, C., Ye, J., & Liu, W. (2019). Maternal exposure to fipronil results in sulfone metabolite enrichment and transgenerational toxicity in zebrafish offspring : Indication for an overlooked risk in maternal transfer? *Environmental Pollution*, 246, 876-884. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.12.096>
- Yang, C., Hamel, C., Vujanovic, V., & Gan, Y. (2011). Fungicide : modes of action and possible impact on nontarget microorganisms. *ISRN Ecology*, 2011, 1-8. <https://doi.org/10.5402/2011/130289>
- Yang, J.-D., Liu, S.-H., Liao, M.-H., Chen, R.-M., Liu, P.-Y., & Ueng, T.-H. (2018). Effects of tebuconazole on cytochrome P450 enzymes, oxidative stress, and endocrine disruption in male rats. *Environmental Toxicology*, 33(8), 899-907. <https://doi.org/10.1002/tox.22575>
- Yu, S. J. (2015). *The toxicology and biochemistry of insecticides* (2. ed). CRC Press.
- Zaller, J. G., Kruse-Platz, M., Schlechtriemen, U., Gruber, E., Peer, M., Nadeem, I., Formayer, H., Hutter, H.-P., & Landler, L. (2022). Pesticides in ambient air, influenced by surrounding land use and weather, pose a potential threat to biodiversity and humans. *Science of The Total Environment*, 838, 156012. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2022.156012>
- Zolfaghari, P. S., Pinto, B. B., Dyson, A., & Singer, M. (2013). The metabolic phenotype of rodent sepsis: Cause for concern? *Intensive Care Medicine Experimental*, 1(1), 6. <https://doi.org/10.1186/2197-425X-1-6>

# ANNEXE A

## ARTICLE V: Pesticide impacts on avian species with special reference to farmland birds: a review

Publié dans *Environmental Monitoring and Assessment*

(DOI : <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10394-0>)

Jérôme Moreau<sup>1,2</sup>, Juliette Rabdeau<sup>2</sup>, Isabelle Badenhauer<sup>3</sup>, Mathieu Giraudeau<sup>4,5,6</sup>, Tuul Sepp<sup>7</sup>, Malaury Crépin<sup>2</sup>, **Agathe Gaffard<sup>2</sup>**, Vincent Bretagnolle<sup>2,8</sup>, and Karine Monceau<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup> Université Bourgogne Franche-Comté, Equipe Ecologie Evolutive, UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Dijon, France

<sup>2</sup> UMR CNRS 7372 Centre d'Etudes Biologiques de Chizé, Université de la Rochelle, 79360 Villiers-en-bois, France

<sup>3</sup> INRA, Unité de Recherche Pluridisciplinaire Prairies Plantes Fourragères, 86600 Lusignan, France

<sup>4</sup> CREEC, UMR IRD 224-CNRS 5290-Université de Montpellier, Montpellier, France

<sup>5</sup> Centre de recherche en Écologie et Évolution de la sante (CREES), Montpellier, France.

<sup>6</sup> Littoral Environnement et Sociétés (LIENSs), UMR 7266 CNRS-Université de La Rochelle, La Rochelle, France.

<sup>7</sup> Department of Zoology, University of Tartu, Tartu, Estonia.

<sup>8</sup> LTSER “Zone Atelier Plaine & Val de Sèvre”, CNRS, 79360 Villiers-en-Bois, France

\* Corresponding author: [karine.monceau@univ-lr.fr](mailto:karine.monceau@univ-lr.fr)















































































































# ANNEXE B

## **Article VI: Analytical development for the assessment of pesticide contaminations in blood and plasma of wild birds: the case of grey partridges (*Perdix perdix*)**

Publié dans *Journal of Chromatography A*

(DOI : <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2022.463681>)

Rodrigues A.<sup>1,\*</sup>, **Gaffard A.**<sup>2</sup>, Moreau J.<sup>2,3</sup>, Monceau K.<sup>3</sup>, Delhomme O.<sup>1,4</sup>, Millet M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Université de Strasbourg, CNRS-UMR 7515, ICPEES, 67087 Strasbourg cedex 2, France

<sup>2</sup> Centre d'Études Biologiques de Chizé, UMR 7372, CNRS & La Rochelle Université, 79360 Villiers-en-Bois, France

<sup>3</sup> UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Université Bourgogne Franche-Comté, 6 Boulevard Gabriel, 21000 Dijon, France

<sup>4</sup> UFR Sciences fondamentales et appliquées, Université de Lorraine, Campus Bridoux, 57070 Metz, France

\*Corresponding author: Anaïs Rodrigues, [anaisrodrigues@unistra.fr](mailto:anaisrodrigues@unistra.fr)































# ANNEXE C

## **Article VII: Neonicotinoids: Still present in farmland birds despite their ban**

Soumis dans *Science of the Total Environment*

Elva Fuentes<sup>1‡</sup>, **Agathe Gaffard**<sup>1‡</sup>, Anaïs Rodrigues<sup>2</sup>, Maurice Millet<sup>2</sup>, Vincent Bretagnolle<sup>1,3</sup>, Jérôme Moreau<sup>4</sup> and Karine Monceau<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> UMR 7372, Centre d'Études Biologiques de Chizé, La Rochelle Université & CNRS, 79360 Villiers en Bois, France

<sup>2</sup> Université de Strasbourg, CNRS-UMR 7515, ICPEES, 67087 Strasbourg cedex 2, France

<sup>3</sup> LTSER “Zone Atelier Plaine & Val de Sèvre”, CNRS, 79360 Villiers-en-Bois, France

<sup>4</sup> UMR CNRS 6282 Biogéosciences, Équipe Écologie Évolutive, Université de Bourgogne-Franche-Comté, 21000 Dijon, France

‡ Authors contributed equally (in alphabetical order)

\*Corresponding author: [karine.monceau@univ-lr.fr](mailto:karine.monceau@univ-lr.fr)

**Abstract**

Neonicotinoids (neonics) are the most widely used insecticides worldwide and are considered to be of low risk to non-target organisms such as vertebrates. Further, they are reported to be rapidly excreted and metabolized, reducing their potential toxicity. Nevertheless, growing evidence of adverse effects of neonics on farmland bird species raise questions about the purported harmless nature of these pesticides. We attempted to search for pesticide residues in species of different trophic levels and at different life stages, by using multiple bird monitoring programs on a Long-Term Socio-Ecological Research (LTSER) platform. Three passerine birds—the blackbird (*Turdus merula*), ciril bunting (*Emberiza cirilus*), and common nightingale (*Luscinia megarhynchos*)—that feed on seeds and invertebrates were monitored during their reproductive period, and the grey partridge (*Perdix perdix*) that feeds on seeds was monitored during its wintering period. We also monitored chicks of an apex predator—the Montagu's harrier (*Circus pygargus*)—that preys mostly upon common voles but also upon insects. We found that the birds' blood samples showed presence of residues of five neonics: three banned since 2018 in France—clothianidin, thiacloprid, and thiamethoxam—and two—dinotefuran and nitenpyram—used for veterinary purposes only. While none of these neonics was detected in blackbirds, all were present in grey partridges. Clothianidin was detected in all species, except blackbirds. Concentrations of the three banned neonics were similar or higher than concentrations found in birds monitored elsewhere before the ban. These findings raise questions about the persistence of neonics within the environment and the mode of exposure to wild fauna. Future investigations on the sublethal effects of these neonics on life-history traits of these farmland birds may help in providing a better understanding of the effects of exposure of bird populations to these insecticides, and also to the consequent effect on human health.

**Keywords:**

Biomonitoring, farmland birds, passerines, pesticides, raptors.

## 1. Introduction

During the last century, the need for feeding the growing human population worldwide has led to an intensification of agricultural practices, including the extensive use of pesticides. Despite their use for millennia, several pieces of evidence implicate pesticides in the global decline in biodiversity (Wood & Goulson, 2017; Stanton et al., 2018; Moreau et al., 2022a). Moreover, other studies identify them as the cause of certain diseases in humans (Köhler & Triebkorn, 2013). As all living organisms in a given area share the same environment, protecting biodiversity by reducing pesticides inputs means also reducing humans' exposure to pesticides, and this is necessary to ensure our own health and safety (*One Health* concept). One way is thus to capitalize on wildlife monitoring schemes to better understand the risk of pesticide exposure for humans (Moreau et al., 2022a). In that respect, wild bird species are valuable candidates as they are well-monitored worldwide, being involved in long-term banding programs over decades or more, which have highlighted a global declining trend in several taxa and especially in farmland birds, e.g., in France, Sweden, United Kingdom, US, Europe, and North America (Wretenberg et al., 2006; Comolet-Tirman et al., 2015; Stanton et al., 2018; Rosenberg et al., 2019; Li et al., 2020; Burns et al., 2021; DEFRA, 2021). Pesticide use has been often identified as a major component responsible for this decline (Campbell et al., 1997; Geiger et al., 2010; Mineau & Whiteside, 2013; Chiron et al., 2014; Tassin de Montaignu & Goulson, 2020). Recent studies, for instance, showed a negative relationship between the abundance of northern bobwhites (*Colinus virginianus*) and their exposure to neonicotinoid insecticides (neonics) from 1978 to 2012 (Ertl et al., 2018a). Similarly, a wide-panel dataset regarding neonics use and birds' population trends revealed a significant negative impact of this family of pesticides on avian biodiversity from 2003 to 2010 in the Netherlands (Hallmann et al., 2014) and from 2008 to 2014 in USA (Li et al., 2020).

Neonics are insecticides developed in the 1970s, with the first patent dating back to 1977 for nithiazine (rapidly abandoned due to its poor stability), followed by patents for imidacloprid and thiacloprid in 1985, nitenpyram in 1988, acetamiprid and clothianidin in 1989, thiamethoxam in 1992, and dinotefuran in 1994 (Tomizawa & Casida, 2005). Neonics target the neural function and are competitive agonists of nicotinic acetylcholine receptors (nAChR), which increase specificity to insects and not vertebrates (Tomizawa & Casida, 2003). In fact, in contrast to other insecticides such as carbamates and organophosphorous that also target the neural function by inhibiting the acetylcholinesterase (AChE) enzyme—an ubiquitous enzyme in the animal kingdom (review in Grue et al., 1997; Story & Cox, 2001; Walker, 2003; Mitra et al., 2011)—neonics were supposed to have minimal effects and a low toxicological impact

on vertebrates and consequently on birds, due to the lower number of nAChRs they have and the lower sensitivity of their nAChRs compared to those of insects (Tomizawa & Casida, 2003, 2005; Ihara et al., 2017; Casida, 2018). Moreover, they might be rapidly metabolized and excreted in few hours (Bishop et al., 2018, 2020; Casida, 2018; Bean et al., 2019; English et al., 2021; Pan et al., 2022), but some reports question their fate along the trophic chain as they have been found in insectivorous birds, granivorous birds, piscivorous birds, and birds of prey (see references in Table S1). Under experimental conditions, they seem to accumulate in the liver (Lopez-Antia et al., 2015a) and to be detectable in different organs and tissues, although they (at least for imidacloprid and thiamethoxam) seem to be rapidly cleared (Bean et al., 2019; Pan et al., 2022). Several studies showed various effects of neonics exposure on birds at different physiological levels (review in Gibbons et al., 2015 and Moreau et al., 2022a). Although neonics do not act directly on AChE, they may induce neuronal degeneration, which affects AChE activity (Abu Zeid et al., 2019; Rawi et al., 2019), altering more complex functions such as learning and migration behaviour (Eng. et al., 2017) but also having sublethal effects on important functions of the organism such as the haematocrit, antioxidant defences, immunity, or fecundity (Lopez-Antia et al., 2013, 2015a, 2015b; Tokumoto et al., 2013; Hoshi et al., 2014; Mohanty et al., 2017; Humann-Guilleminot et al., 2019; Lv et al., 2020).

Since the 1990s, the use of neonics has become widespread, making them the most widely used class of insecticide worldwide, mostly for coating seeds, despite being shown to impact non-target species, including humans (Tomizawa & Casida, 2005; Casida & Durkin, 2013; Gibbons et al., 2015; Simon-Delso et al., 2015; Henry et al., 2015; Wood & Goulson, 2017; Casida, 2018; Thompson et al., 2020; Zhang et al., 2022). In Europe, despite an EU moratorium in 2014, neonics were still detectable in bee-attractive crop nectar until 2018 at least (Wintermantel et al., 2020). Indeed, their degradation in soil (measured by DT<sub>50</sub> which is the Detection Time 50% representing the time to detect a 50% decrease in pesticide concentration) can take quite a long time, up to more than 6900 days (i.e., 19 years for clothianidin; see Table 2 in Thompson et al., 2020). Therefore, banning harmful neonics does not necessarily eradicate the problem of exposure. In EU, dinotefuran and nitenpyram have never been considered for use in phytopharmaceutical products (PPP; July 2022, EU Pesticides database: [https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides\\_en](https://food.ec.europa.eu/plants/pesticides_en)) but are commonly used in veterinary medicine. In France, neonics are banned for outdoor use and in PPP since September 2018 (Décret n° 2018-675, July 2018), except for emergency authorized use of thiamethoxam and imidacloprid on sugar beet crops in production areas (EFSA, 2021). Nonetheless, the use of neonics is still allowed in veterinary medicine.

In the present study, we use different bird monitoring programs on a long-term socio-ecological research (LTSER) platform and a multiresidue analysis (Rodrigues et al., in press) to evaluate the presence of neonics in an intensive farmland area where acetamiprid, clothianidin, imidacloprid, thiacloprid, and thiamethoxam are banned for 3 years for agricultural use. Nitenpyram and dinotefuran were also included in the screening to control for potential exposure of wild fauna to veterinary products. As the method was not specifically developed for neonics detection, acetamiprid and imidacloprid, were not detectable among the other 104 pesticide compounds. We selected five different species for their different ecology: (i) three passerine birds during their reproductive period: the blackbird (*Turdus merula*), ciril bunting (*Emberiza cirilus*), and common nightingale (*Luscinia megarhynchos*) that feed on seeds and invertebrates; (ii) the grey partridge (*Perdix perdix*) caught during its wintering period when it feeds only seeds; and (iii) an apex predator species, namely, the Montagu's harrier (*Circus pygargus*) that preys mostly upon common voles but also upon orthopterans. For this fifth species, we focused on chicks that are fed by their parents during the rearing period. We collected blood samples from all individuals to determine the presence and measure the level of exposure to neonics. We selected blood (whole blood, i.e., red blood cells and plasma) for the analyses in order to focus on the effects of short-term exposure only (Espín et al., 2016), so that potential exposure of the migratory species (i.e., common nightingales, Montagu's harriers, and blackbirds) at wintering areas can be neglected.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Ethics statement

The methods described hereafter conform to the French guidelines for the ethical use of animals in research (APAFIS#18557-2019010822312199v2, APAFIS#9465e201703101551625). We are grateful to the Nouvelle-Aquitaine Regional Agency of the Environment, Development and Housing for the official authorizations for the capture of passerines birds (DREAL/2019D/2323). Because Montagu's harrier is a protected raptor species, its handling was allowed and licensed by the Centre de Recherches sur la Biologie des Populations d'Oiseaux – Museum National d'Histoire Naturelle (license #1308 for Montagu's harriers).

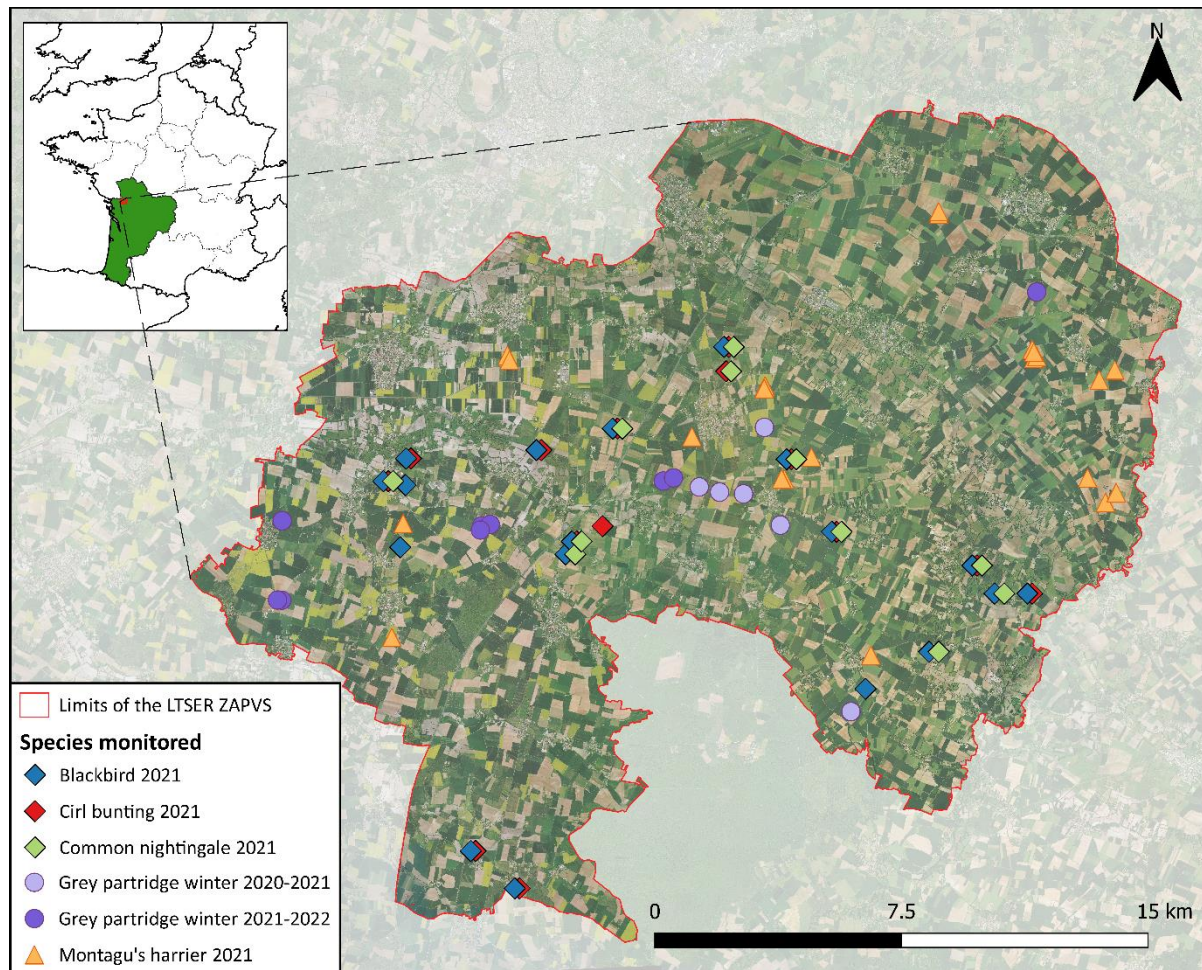
### 2.2. Study area

The study site is located in southwestern France (46°11'N, 0°28'W, Figure 1), in the Long-Term Socio-Ecological Research Zone Atelier Plaine & Val de Sèvres (LTSER ZAPVS), a 450 km<sup>2</sup>



area where the soil occupancy and the agricultural practices are monitored each year since 1994 (Bretagnolle et al., 2018). In this intensive farming area, winter cereal crops accounted for ~41% (wheat: 33.8% and corn: 9.6%) of the area under cultivation; in addition, there were sunflower (10.4%), oilseed rape (8.3%), pea (2%), and meadows (13.5%) (average coverage between 2009 and 2016, Bretagnolle et al., 2018). In this area, organic farming (no pesticide use) is carried out in 18% of the area. Sugar beet crops are only present in this area for their first year (seed production), and the use of neonics is banned for this purpose. Therefore, at the moment when birds were caught (2020–2022, see section 2.3.1), no neonics were being used for agricultural purposes. However, imidacloprid, dinotefuran, and nitenpyram may be in domestic use as veterinary treatment for domestic animals (cats, dogs, ferrets, and bunnies).

### 2.3. Model species and blood collection



**Figure 1.** Spatial distribution of birds' catching sites across the Long-Term Socio-Ecological Research Zone Atelier Plaine & Val de Sèvres (LTSER ZAPVS). The five bird species monitored in the study area are blackbird (*Turdus merula*,  $N_{2021} = 64$ ), cirl bunting (*Emberiza cirlus*,  $N_{2021} = 31$ ), common nightingale (*Luscinia megarhynchos*,  $N_{2021} = 34$ ), grey partridge

(*Perdix perdix*,  $N_{2020-2021} = 23$  and  $N_{2021-2022} = 31$ ), and chicks of Montagu's harrier (*Circus pygargus*,  $N_{2021} = 55$ ). N corresponds to the number of adults sampled, except in the case of Montagu's harrier where N corresponds to the number of chicks sampled.

### 2.3.1. Model species

#### 2.3.1.1. Adult passerine birds

The passerine species were sampled during the reproductive period from mid-April to end of June 2021. Birds were caught using net-trapping, following the same methodology as Moreau et al. (2022b). Among the 17 species trapped in this area, we selected three, namely, circl buntings ( $N = 31$ ), blackbirds ( $N = 64$ ), and common nightingales ( $N = 34$ ) because these species were among the biggest of those captured, which allowed us to draw enough blood for analysis without risking any individual's health. They were also the most caught in the study area allowing us to make a large spatial screening.

#### 2.3.1.2. Adult grey partridges

Grey partridges were caught during two consecutive years from November 2020 to February 2021 (winter 2020–2021) and from December 2021 to March 2022 (winter 2021–2022) in the study area. These individuals, even when caught in the wild, are gamebirds and have been probably raised in captivity before being released for hunting purposes; however, knowing the proportion of captive-born vs. wild-born partridges is almost impossible as banding before release is not mandatory. In winter, grey partridges are mostly herbivorous and granivorous, living in large coveys in winter crops and sleeping in ploughed fields at night. Thermal binoculars were used to spot them at nightfall and birds were then captured in the dark by dazzling them and using a landing net (i.e., a method inspired by Eurasian Woodcock catching technique; Williams, 2015). Blood samples were then collected, and birds were immediately released. A total of 23 and 31 partridges were caught during the 2020–2021 and 2021–2022 winters, respectively.

#### 2.3.1.3. Montagu's harrier chicks

The Montagu's harrier has been monitored in the ZAPVS since 1994 (Bretagnolle et al., 2018). In this intensive agricultural area, they nest mainly on the ground of cereal crops and lay up to eight eggs (Arroyo et al., 1998; Millon et al., 2008). The incubation period lasts 29 days, and the rearing period is between 30 and 35 days (Arroyo et al., 2007). The mean productivity in

this site is 2.05 fledglings per breeding attempt (Arroyo et al., 2004), this success depending mainly on the availability of its main prey, the common vole (*Microtus arvalis*) although in case of poor vole availability, harriers may also feed on orthopterans (Salamolard et al., 2000; Butet & Leroux, 2001). Blood samples of chicks that were  $26 \pm 2$  days old were collected from June 2021 to early August 2021. Fifty-five chicks from 22 nests were sampled.

### 2.3.2. Blood sampling procedure

For all species, blood samples were collected in 2021, and in 2020 and 2022 for grey partridges, on wild individuals included in different monitoring programs (see details in section 2.3.1). For all of them, blood sampling was conducted by puncturing the brachial vein using a sterile needle and using heparinized capillaries to collect 50  $\mu$ L of blood. Blood samples were placed in Eppendorf tubes and kept refrigerated (0–5°C), before being returned to the laboratory where they were stored at -20°C for further analyses.

## 2.4. Neonics analysis

Neonic extractions were conducted following the method reported by Rodrigues *et al.* (in press; see also Table S2 for a description of the neonics). Briefly, blood samples were defrosted and weighed, and a mixture of 2 mL of dichloromethane and ethyl acetate (1:1) was added to each sample, followed by homogenisation by using a vortex for 1 min. Extracts were then sonicated for 10 min. This sonication step was repeated three successive times. After each sonication step, a centrifugation step of 5 min was performed, and supernatants were collected, pooled, and then gently evaporated under a fume hood until a final volume of 500  $\mu$ L. The extract was collected and stored at -20°C until the analyses to determine pesticide levels were performed by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MSMS) using multiple reactions monitoring (MRM) for quantification.

LC/MSMS analyses were conducted with a Thermo Scientific TSQ Quantum Access Triple Quadrupole Mass Spectrometer operating in heated positive electrospray ionization mode (HESI+) coupled with a Thermo Accela 1250 pump and a Thermo Combi Pal autosampler. Analyses were performed on a Nucleodur C<sub>18</sub> Pyramid column (150 mm  $\times$  3 mm, 3  $\mu$ m). Samples were analysed in the gradient mode using a mobile phase composed of water and acetonitrile with both containing 0.1% formic acid.

The multiresidue analysis comprised detection and quantification of 104 pesticide molecules, including five neonics—clothianidin, dinotefuran, nitenpyram, thiacloprid, and thiamethoxam—performed using the MRM detection mode. The source was operated in the

positive ionization mode with a spray voltage of 4500 V and the same spray and capillary temperatures of 300 °C each. Nitrogen was used as the sheath and auxiliary gas (20 and 10 arbitrary units), while argon was used as the collision gas (1.5 arbitrary units). Two precursor product ion transitions for each analyte and internal standards were used for quantification. The transitions selected for MSMS analysis and retention times are shown in Table S3. Data were acquired and processed using Excalibur software.

The limits of detection (LOD) and quantification (LOQ) represent three and ten times the ratio of the average noise height on either side of a known amount of a compound's peak to the peak height, respectively. The objective was to determine the minimum peak heights that can be used to distinguish a compound's peak from the noise on either side of the peak. The LOD and LOQ determined for each sample type are presented in Table S3. LODs varied from 0.001 to 0.012 pg·μL<sup>-1</sup> and LOQs from 0.005 to 0.041 pg·μL<sup>-1</sup>.

### 3. Results

No neonics were detected in blackbirds. For the other species, all 5 neonics searched, namely, clothianidin, dinotefuran, nitenpyram, thiacloprid, and thiamethoxam were detected. A summary of the concentrations and occurrence of these neonics in our sampled bird species is provided in Table 1. Clothianidin was found in all species (except blackbirds), with average concentrations ranging from 0.05 pg·μL<sup>-1</sup> in common nightingales to 951.60 pg·μL<sup>-1</sup> in Montagu's harriers. The number of individuals that exhibited concentrations higher than the LOQ ranged from ~5% among Montagu's harriers up to ~26% among grey partridges sampled during the 2021–2022 winter. No clothianidin was detected in grey partridges sampled in the 2020–2021 winter. Thiacloprid was detected in all ciril buntings and common nightingales but always at concentrations below the LOQ. It was detected in one Montagu's harrier chick (89.58 pg·μL<sup>-1</sup>) and one grey partridge (0.07 pg·μL<sup>-1</sup>) in the 2020–2021 winter. Thiamethoxam was detected in both passerine species and in grey partridges from both winters, with concentrations ranging from 0.06 pg·μL<sup>-1</sup> in a common nightingale to 23.73 pg·μL<sup>-1</sup> in a grey partridge from the 2020–2021 winter. The number of individuals that exhibited concentrations higher than the LOD ranged from ~4% among common nightingales up to 12% among ciril buntings. Dinotefuran and nitenpyram were only detected in grey partridges: In the first winter (2020–2021), ~13% and ~87% of the individuals exhibited dinotefuran and nitenpyram concentrations higher than the LOD, with the average concentrations being 6.20 and 23.10 pg·μL<sup>-1</sup>, respectively. In the second winter (2021–2022), dinotefuran and nitenpyram were detected with

concentrations higher than the LOD in ~32 and ~94% of the individuals, respectively, with the average concentrations being 7.85 and 18.29  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , respectively.

#### 4. Discussion

In the last few decades, neonics have attracted considerable interest (Klingelhöfer et al., 2022), especially because of the rising concern about their effects on non-target species such as honeybees (Wood & Goulson, 2017) and humans (Cimino et al., 2017; Han et al., 2018). Because of their chemical properties such as their half-life in the soil ( $\text{DT}_{50}$ ), solvability, and leaching potential, and because of their extensive use for agricultural purposes, the assessment of their presence in farmlands is imperative (Thompson et al., 2020). Considering that no neonic was used on plants since 2018 in France and that the analytical method used here provided good sensibility results (Rodrigues et al., in press), we expected to find no or very low residuals ( $<\text{LOD}$ ) in bird blood samples as this matrix reflects short-term exposure (Espín et al., 2016). However, in the present study, we detected five out of seven neonics, three of which have been banned since 2018 in France (clothianidin, thiacloprid, and thiamethoxam) and two others (dinotefuran and nitenpyram) that are supposedly being used only for treating domestic pets (Table S2). The remaining two neonics (imidacloprid and acetamiprid) are not discussed here as these compounds were not detectable with the multiresidue method used in this study.

##### 4.1. Monitoring neonics in wild birds

Neonics were increasingly studied during the last decade and several recent studies have focused on quantifying the level of exposure in wild birds as biosentinels. However, these studies differ from our work in several aspects. First, in these studies, several biological matrices—blood, carcasses, eggs, faecal pellets and cloacal fluids, feathers, liver, and/or gizzard—were considered (see Table S1 for detailed references). Correlations between neonics quantifications from different matrices can be found but not systematically (reviewed in Espín et al., 2016). Indeed, pesticides are distributed in biological tissues with different temporal patterns. For instance, pesticide molecules are integrated into feathers during the moulting period. The distribution of such neonic molecules in internal tissues such as the liver also depends on the chemical nature of the molecules and can be degraded if samples are taken on carcasses (Espín et al., 2016, and references therein). Then, a time lag might be observed between the exposure and the detection depending on the matrices used. Therefore, the results obtained from different matrices cannot be directly compared.

Our results can thus be reasonably compared to those of five previous studies that tested for neonics in whole blood (or plasma) samples from wild birds (Taliensky-Chamudis et al., 2017; Byholm et al., 2018; Hao et al., 2018; Lennon et al., 2020; and Humann-Guillemot et al., 2021; Table S4). For clothianidin, the concentration range was similar to those found by Lennon et al. (2020), although the maximum value was lower: they found concentrations ranging from 0.5 (dunnocks) to 69300  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (yellowhammers), whereas in our study, the values were 0.009 (common nightingale) to 2451.78  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  (Montagu's harrier chick). The maximum clothianidin concentration found by Humann-Guillemot et al. (2021) was 0.34  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  in alpine swifts, which is similar to the lower values in the concentration range we obtained. Further, the thiacloprid concentrations in all ciril buntings and common nightingales were below the LOQ, but that in the grey partridges and the Montagu's harrier chicks were far higher than those found in honey buzzards by Byholm et al. (2018) and in white-crowned sparrows by Hao et al. (2018): concentration ranged from 0.012 to 0.031 and 0.0025 to 0.0031  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  for honey buzzards and white-crowned sparrows, respectively, and from 0.073 to 89.58  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  in our study (Table S4). This result suggests that the grey partridges and the Montagu's harrier chicks were exposed to high (or recent) quantities of thiacloprid. For thiamethoxam, the concentrations we found were above those obtained by Hao et al. (2018): we obtained concentrations ranging from 0.06 (common nightingales) to 23.73 (grey partridges)  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , whereas Hao et al. reported 0.0051–0.0337  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ . Taliensky-Chamudis et al. (2017) detected imidacloprid in one Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) chick among the 30 sampled, but did not detect any other neonics, so comparisons with our results are not possible. The difference in the results despite all studies using blood samples may be because some of the studies considered whole blood samples (Taliensky-Chamudis et al., 2017; Byholm et al., 2018; our study), while others used only plasma (Hao et al., 2018; Lennon et al., 2020; Humann-Guillemot et al., 2021), inducing differences in the detectability of some molecules (Rodrigues et al., in press). Moreover, all these studies fundamentally differ in their sensibility as they rely on their own developed chemical analysis methods [although they are all derived from the same method, i.e., Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe (QuEChERS); Anastassiades et al., 2003]. If we considered clothianidin for instance, LOD and LOQ in our study (0.01 and 0.04  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , respectively; Table S3) were 5 (LOQ) and 15 (LOD) times lower, respectively, than those (0.15 and 0.21  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ , respectively) of Lennon et al. (2020), while LOQ was similar to that (0.05  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ) reported by Humann-Guillemot et al. (2021). This may induce a difference in the number of neonic positive samples between studies. It is not therefore easy to compare the results provided by the authors, especially when not all statistical values, such as the percentage

of neonic detection among individuals or the mean concentration with its standard deviation, were obtained on the same basis (Table S4). As the use of the same methodology in all studies does not seem to be feasible, we recommend that researchers systematically report these values. Besides, we emphasize the need to use effect sizes in ecotoxicological studies to allow direct comparisons (see Moreau et al., 2022a and references therein).

#### **4.2. Exposure of wild fauna to neonics**

Previous studies reported the limitations in relation to investigating chemical exposure by analysing feather and internal tissue samples, so blood is considered most suitable for determining recent exposure, while ignoring the long-term exposure and the half-life of neonics (Espín et al., 2016). Thus, possible exposure of the migratory species at their wintering areas can be disregarded. However, thiamethoxam/clothianidin were found in grey partridges' eggs elsewhere (Bro et al., 2016), so in the case of the Montagu's harrier chicks, we cannot exclude the possibility of maternal transfer of neonics, i.e., from the mother to the eggs. Nevertheless, neonics are supposedly "rapidly" excreted (in hummingbirds, English et al., 2021) and cleared from blood (24h in quails), according to data regarding imidacloprid (Bean et al., 2019) and thiamethoxam (Pan et al., 2022); however, extrapolation to the behaviour of other neonics may not be reliable. In other words, the individuals sampled in the present study were probably recently exposed to neonics. This is important because the birds were sampled three and four years after EU banned neonics for PPP, and no emergency use was authorized in the study area. Nonetheless, we found three out of the five PPP neonics in our samples, with concentrations similar to those in birds sampled elsewhere before the ban (Byholm et al., 2018). Taken together, our results strongly suggests that clothianidin, thiacloprid, and thiamethoxam are still present in farmlands and raises questions about the mode of exposure to birds. Thiamethoxam is metabolized into clothianidin in animals, plants, and soil (Nauen et al., 2003, review in Simon-Delso et al., 2015; Pan et al., 2022) potentially explaining why it is more commonly present than thiamethoxam. These neonics' DT<sub>50</sub> ranged from few days for thiacloprid up to several years for clothianidin (Table S2) in the soil, meaning that they can still be incorporated into the diet of several detritivores such as earthworms. If so, a high number of blackbirds, which are omnivorous and feed on different invertebrate species and taxa, should have been positive, but were not. This surprising result could have been first seen as a technical malfunctioning; however, other than neonics pesticide molecules were detected in blackbirds' blood, so that an analysis problem can be discarded. The absence of neonics in blackbirds' blood might be the consequence of several processes. One of them could be a higher

detoxification capacity of blackbirds, mediated by their ability at monopolizing high amounts of carotenoids, which are antioxidants, involved in sexual selection and known for their role in reducing oxidative stress (Møller et al., 2000, see Moreau et al., 2022a). Further analyses would be needed to explore this explanation. Granivorous birds, including grey partridges (as they were caught during the winter), ciril buntings, and common nightingales, which are omnivorous (mostly insectivorous during reproduction), tested positive. This suggests that the mode of exposure may include contaminated seeds from previous treated crops (Wintermantel et al., 2018) or organisms feeding on contaminated seeds. The higher concentrations found in Montagu's harriers, which are apex predators (mostly preying upon common voles and orthopterans), might be a result of biomagnification, i.e., the accumulation of toxic neonics along the trophic chain (Badry et al., 2020). In fact, clothianidin and thiacloprid, two compounds quantified in Montagu's harriers' blood, were found in hairs of small mammals from the area, reinforcing that view (Fritsch et al., 2022). Further investigations would be needed, and one way to do so would be using chicks' food pellets. These differences among species may also be attributable to the choices of individuals regarding their habitat and feeding resources for avoiding contaminated sources, as has been highlighted previously (McKay et al., 1999; Ruuskanen et al., 2020; Addy-Orduna et al., 2022). Another explanation relies on the detoxification processes in wild birds that are still poorly investigated and deserved further investigations (Moreau et al., 2022a). Indeed, some individuals could be more efficient than others at protecting themselves against toxic substances (Arnold et al., 2015).

Another important issue observed in our results is the high prevalence of dinotefuran and nitenpyram in grey partridges, although wildlife fauna is not supposed to be exposed to these as they are used only for pets and not farm animals, and consequently not for outdoor use in Europe, including France (Table S2). Even if wild grey partridges might be raised in captivity and then released for small game hunting, the six registered veterinary medicines containing dinotefuran and nitenpyram neonics that are authorized for use in France are not intended for treating any bird species or farm animal (<http://www.ircp.anmv.anses.fr/index.aspx>). Imidacloprid is included in 36 different speciality medications, making this neonic potentially more common even if not detectable here (see, for example, Perkins et al., 2021). Neonics are either used for topical applications on the skin (dinotefuran) or *per os* (nitenpyram) to treat flea infestations in cats and dogs typically; further, nitenpyram is expected to be eliminated within 48 h (Jeschke & Nauen, 2005; Rust, 2017). In Europe, veterinary regulatory processes are governed by the European Medicines Agency, which states that products for non-food animals are not supposed to be of major environmental concerns since these animals are treated



individually with low concentrations of active neonics (CVMP/VICH, 2000). To our knowledge, these two neonics, investigated in few studies (Table S1), have only been detected in one sample of hummingbirds' feather rinsate (i.e., not within the organism; Graves et al., 2019), suggesting contact and not ingestion. In the present study, the substantial concentrations of dinotefuran and nitenpyram found in grey partridges but not in other species may indicate possible exposure during their stay in farms. This implies either an illegal use of these substances in farms or an unintentional contact of partridges with urine of farmer's dogs or cats. However, neonics being presumably rapidly excreted and blood reflecting short-term exposure, individuals sampled here, if released from farms, should not test positive. Thus, we cannot exclude in our case that partridges that commonly use field margins contrary to the other species, where pets urinate, may have ingested these neonics while preening. Partridges could also have directly ingested contaminated water with cat and/or dog urine. Nevertheless, this strongly indicates the urgent need for monitoring all pesticide or medicine compounds, irrespective of their intended use. Although treating domestic animals against ectoparasites might be of sanitary importance for public health (human and animal), these treatments may have the same adverse effects on wildlife as PPP (reviewed in Moreau et al., 2022a). In addition, they can also disrupt eco-evolutionary processes such as host–parasite interactions with consequences at the population and the community levels (Goutte & Molbert, 2022), which may contribute to the global decline in biodiversity.

### **4.3. Conclusions**

Our results highlight several problems with the use of a class of chemicals that are among the most used worldwide. First, banning neonics for outdoor use does not prevent the exposure of wildlife fauna to them. Although illegal use cannot be disregarded, it cannot explain on its own their ubiquity in wild birds from a wide ecological range, caught at the scale of the study site. This is an important element to consider in countries where neonics are still massively applied, considering their impact on both animals and humans (reviewed in Moreau et al., 2022a). Second, the detection of neonics used for domestic animals in wildlife fauna raises questions regarding the manner in which risk assessment for such applications is performed (Perkins et al., 2021). For instance, to our knowledge, few studies have investigated the effects of dinotefuran and nitenpyram on wildlife fauna (Wang et al., 2018). Although clothianidin, dinotefuran, nitenpyram, and thiamethoxam are considered to be of low toxicity to birds, as indicated by their acute oral LD<sub>50</sub> (Table S2), thiacloprid, which was also found to be quite ubiquitous, is highly toxic to birds (Table S2). However, LD<sub>50</sub> is indicative of acute lethal

toxicity under laboratory conditions for model species and is not necessarily an appropriate estimate of sublethal effects, as shown in the numerous studies that investigated the adverse effects of neonics on birds (Moreau et al., 2022a). Considering that very low residual levels of pesticides may have considerable sublethal effects on birds' reproduction (see Moreau et al., 2021, for example), the consequences of these exposures on bird populations as well as on human health (*One Health* concept) should be carefully considered.

### **Acknowledgements**

We thank all the people who contributed to fieldwork and data collection: Fanny Rey and Mélissa Desbonnes for passerine birds, Landry Boussac and Samuel Perroteau for grey partridges, and Mazzarine Laboureau and Mona Moreau for Montagu's harriers. Further, we are grateful to all farmers who allowed us access to their fields. We would also like to thank the trainees Emilie Jemmi and Zülal Can who helped with blood extraction at the ICPEES laboratory.

### **Funding**

This work was supported by the French National Research Agency (ANR JCJC PestiStress, grant #19-CE34-0003-01), the French National Centre of Scientific Research (CNRS), the French National Research Institute for Agriculture, Food and the Environment (INRAE), and the University of La Rochelle. This study was partly funded by the BioBird project (regional government of Nouvelle-Aquitaine), by the ACI (University of La Rochelle), BIRDPEST project (RECOTOX 2019), AgriBioBird project (OSU Theta ISITE-BFC), the Contrat de Plan État-Région (CPER) Econat and the French National program EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière).

## References

- Abu Zeid, E. H., Alam, R. T., Ali, S. A., & Hendawi, M. Y. (2019). Dose-related impacts of imidacloprid oral intoxication on brain and liver of rock pigeon (*Columba livia domestica*), residues analysis in different organs. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 167, 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.121>
- Addy-Orduna, L., Cazenave, J., & Mateo, R. (2022). Avoidance of neonicotinoid-treated seeds and cotyledons by captive eared doves (*Zenaida auriculata*, Columbidae). *Environmental Pollution*, 304, 119237. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2022.119237>
- Anastassiades, M., Lehotay, S. J., Štajnbaher, D., & Schenck, F. J. (2003). Fast and easy multiresidue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. *Journal of AOAC international*, 86, 412-431. <https://doi.org/10.1093/jaoac/86.2.412>
- Arnold, K. E., Herborn, K. A., Adam, A., & Alexander, L. (2015). Individual variation in the oxidative costs of personality traits. *Functional Ecology*, 29, 522-530. <https://doi.org/10.1111/1365-2435.12375>
- Arroyo, B. E., Bretagnolle, V., & Leroux, A. (2007). Interactive effects of food and age on breeding in the Montagu's Harrier *Circus pygargus*. *Ibis*, 149, 806-813. <https://doi.org/10.1111/j.1474-919X.2007.00716.x>
- Arroyo, B. E., García, J. T., & Bretagnolle, V. (2004). Montagu's harrier. – BWP update (The Journal of the Birds of the Western Palearctic), Vol. 6, Nos 1/2. Oxford University Press, Oxford, pp 41–55.
- Arroyo, B., Leroux, A., & Bretagnolle, V. (1998). Patterns of egg and clutch size variation in the Montagu's Harrier. *Journal of Raptor Research*, 32, 136-142.
- Badry, A., Krone, O., Jaspers, V. L., Mateo, R., García-Fernández, A., Leivits, M., & Shore, R. F. (2020). Towards harmonisation of chemical monitoring using avian apex predators: Identification of key species for pan-European biomonitoring. *Science of the Total Environment*, 731, 139198. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139198>
- Bean, T. G., Gross, M. S., Karouna-Renier, N. K., Henry, P. F., Schultz, S. L., Hladik, M. L., Kuivila, K. M., & Rattner, B. A. (2019). Toxicokinetics of imidacloprid-coated wheat seeds in Japanese quail (*Coturnix japonica*) and an evaluation of hazard. *Environmental science & technology*, 53, 3888-3897. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07062>
- Bishop, C. A., Woundneh, M. B., Maisonneuve, F., Common, J., Elliott, J. E., & Moran, A. J. (2020). Determination of neonicotinoids and butenolide residues in avian and insect pollinators and their ambient environment in Western Canada (2017, 2018). *Science of the Total Environment*, 737, 139386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.139386>

Bishop, C. A., Moran, A. J., Toshack, M. C., Elle, E., Maisonneuve, F., & Elliott, J. E. (2018). Hummingbirds and bumble bees exposed to neonicotinoid and organophosphate insecticides in the Fraser Valley, British Columbia, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 37, 2143-2152. <https://doi.org/10.1002/etc.4174>

Bretagnolle, V., Berthet, E., Gross, N., Gauffre, B., Plumejeaud, C., Houte, S., Badenhauer, I., Monceau, K., Allier, F., Monestiez, P., & Gaba, S. (2018). Towards sustainable and multifunctional agriculture in farmland landscapes: lessons from the integrative approach of a French LTSER platform. *Science of the Total Environment*, 627, 822-834. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.01.142>

Bro, E., Devillers, J., Millot, F., & Decors, A. (2016). Residues of plant protection products in grey partridge eggs in French cereal ecosystems. *Environmental Science and Pollution Research*, 23, 9559-9573. <https://doi.org/10.1007/s11356-016-6093-7>

Burns, F., Eaton, M. A., Burfield, I. J., Klvaňová, A., Šilarová, E., Staneva, A., & Gregory, R. D. (2021). Abundance decline in the avifauna of the European Union reveals cross-continental similarities in biodiversity change. *Ecology and Evolution*, 11, 16647-16660. <https://doi.org/10.1002/ece3.8282>

Butet, A., & Leroux, A. B. (2001). Effects of agriculture development on vole dynamics and conservation of Montagu's harrier in western French wetlands. *Biological conservation*, 100, 289-295. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(01\)00033-7](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(01)00033-7)

Byholm, P., Mäkeläinen, S., Santangeli, A., & Goulson, D. (2018). First evidence of neonicotinoid residues in a long-distance migratory raptor, the European honey buzzard (*Pernis apivorus*). *Science of the Total Environment*, 639, 929-933. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.05.185>

Campbell, L.H., Avery, M.I., Donald, P., Evans, A.D., Green, R.E., & Wilson, J.D. (1997). A review of the indirect effects of pesticides on birds. JNCC Report No. 227. Joint Nature Conservation Committee, Peterborough.

Casida, J. E. (2018). Neonicotinoids and other insect nicotinic receptor competitive modulators: progress and prospects. *Annual Review of Entomology*, 63, 125-144. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-020117-043042>

Casida, J. E., & Durkin, K. A. (2013). Neuroactive insecticides: targets, selectivity, resistance, and secondary effects. *Annual Review of Entomology*, 58, 99-117. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-120811-153645>

Chiron, F., Chargé, R., Julliard, R., Jiguet, F., & Muratet, A. (2014). Pesticide doses, landscape structure and their relative effects on farmland birds. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 185, 153-160. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2013.12.013>

Cimino, A. M., Boyles, A. L., Thayer, K. A., & Perry, M. J. (2017). Effects of neonicotinoid pesticide exposure on human health: a systematic review. *Environmental Health Perspectives*, 125, 155-162. <https://doi.org/10.1289/EHP515>

Comolet-Tirman, J., Siblet, J. P., Witté, I., Cadiou, B., Czajkowski, M. A., Deceuninck, B., Jiguet, F., Landry, P., Quaintenne, G., Roché, J.E., Sarasa, M., & Touroult, J. (2015). Statuts et tendances des populations d'oiseaux nicheurs de France. Bilan simplifié du premier rapportage national au titre de la Directive Oiseaux. *Alauda*, 83, 35-76.

CVMP/VICH (2000). Guideline on Environmental impact assessment (EIAs) for veterinary medicinal products (VMPs) – Phase I, VICH GL 6 (CVMP/VICH/592/1998) [Online]. Available at: <https://www.ema.europa.eu/en/vich-gl6-environmental-impact-assessment-eias-veterinary-medicinal-products-phase-i>, accessed date: 12 October 2022.

DEFRA (2021). Wild bird populations in the UK, 1970 to 2019 – Updated for Wintering and Waterbirds. Department for Environment, Food & Rural Affairs [Online]. Available at: <https://www.gov.uk/government/statistics/wild-bird-populations-in-the-uk>, accessed date: 12 October 2022.

EFSA (European Food Safety Authority) (2021). Evaluation of the emergency authorisations granted by Member State France for plant protection products containing imidacloprid or thiamethoxam. EFSA supporting publication 2021 : EN-6968. 13pp. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2021.EN-6968>

Eng, M. L., Stutchbury, B. J., & Morrissey, C. A. (2017). Imidacloprid and chlorpyrifos insecticides impair migratory ability in a seed-eating songbird. *Scientific Reports*, 7, 1-9. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-15446-x>

English, S. G., Sandoval-Herrera, N. I., Bishop, C. A., Cartwright, M., Maisonneuve, F., Elliott, J. E., & Welch, K. C. (2021). Neonicotinoid pesticides exert metabolic effects on avian pollinators. *Scientific Reports*, 11, 1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82470-3>

Ertl, H. M., Mora, M. A., Brightsmith, D. J., & Navarro-Alberto, J. A. (2018a). Potential impact of neonicotinoid use on Northern bobwhite (*Colinus virginianus*) in Texas: A historical analysis. *PloS One*, 13, e0191100. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191100>

Ertl, H. M., Mora, M. A., Boellstorff, D. E., Brightsmith, D., & Carson, K. (2018b). Potential effects of neonicotinoid insecticides on northern bobwhites. *Wildlife Society Bulletin*, 42, 649-655. <https://doi.org/10.1002/wsb.921>

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. (2016). 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>

Fritsch, C., Appenzeller, B., Burkart, L., Coeurdassier, M., Scheifler, R., Raoul, F., Driget, V., Powolny, T., Gagnaison, C., Rieffel, D., Afonso, E., Goydadin, A.-C., Hardy, E. M., Palazzi, P., Schaeffer, C., Gaba, S., Bretagnolle, V., Bertrand, C., & Pelosi, C. (2022). Pervasive exposure of wild small mammals to legacy and currently used pesticide mixtures in arable landscapes. *Scientific reports*, 12, 1-22. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-19959-y>

Geiger, F., Bengtsson, J., Berendse, F., Weisser, W. W., Emmerson, M., Morales, M. B., Ceryngier, P., Liira, J., Tschardtke, T., Winqvist, C., Eggers, S., Bommarco, R., Pärt, T., Bretagnolle, V., Plantegenest, M., Clement, L. W., Dennis, C., Palmer, C., Oñate, J. J., Guerrero, I., Hawro, V., Aavik, T., Thies, C., Flohre, A., Hänke, S., Fischer, C., Goedhart, P. W., & Inchausti, P. (2010). Persistent negative effects of pesticides on biodiversity and biological control potential on European farmland. *Basic and Applied Ecology*, 11, 97-105. <https://doi.org/10.1016/j.baae.2009.12.001>

Gibbons, D., Morrissey, C., & Mineau, P. (2015). A review of the direct and indirect effects of neonicotinoids and fipronil on vertebrate wildlife. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 103-118. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3180-5>

Graves, E. E., Jelks, K. A., Foley, J. E., Filigenzi, M. S., Poppenga, R. H., Ernest, H. B., Melnicoe, R., & Tell, L. A. (2019). Analysis of insecticide exposure in California hummingbirds using liquid chromatography-mass spectrometry. *Environmental Science and Pollution Research*, 26, 15458-15466. <https://doi.org/10.1007/s11356-019-04903-x>

Grue, C. E., Gibert, P. L., & Seeley, M. E. (1997). Neurophysiological and behavioral changes in non-target wildlife exposed to organophosphate and carbamate pesticides: thermoregulation, food consumption, and reproduction. *American Zoologist*, 37, 369-388. <https://www.jstor.org/stable/3884019>

Han, W., Tian, Y., & Shen, X. (2018). Human exposure to neonicotinoid insecticides and the evaluation of their potential toxicity: An overview. *Chemosphere*, 192, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2017.10.149>

Goutte, A., & Molbert, N. (2022). Benefits of Parasitism in Polluted Environments: A Review and Perspectives. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 10, 847869. <https://doi.org/10.3389/fevo.2022.847869>

Hao, C., Eng, M. L., Sun, F., & Morrissey, C. A. (2018). Part-per-trillion LC-MS/MS determination of neonicotinoids in small volumes of songbird plasma. *Science of the Total Environment*, 644, 1080-1087. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.06.317>

Hallmann, C. A., Foppen, R. P., Van Turnhout, C. A., De Kroon, H., & Jongejans, E. (2014). Declines in insectivorous birds are associated with high neonicotinoid concentrations. *Nature*, 511, 341-343.

Henry, M., Cerrutti, N., Aupinel, P., Decourtye, A., Gayrard, M., Odoux, J. F., Pissard, A., Rüger, C., & Bretagnolle, V. (2015). Reconciling laboratory and field assessments of neonicotinoid toxicity to honeybees. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 282, 20152110. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.2110>

Hoshi, N., Hirano, T., Omotehara, T., Tokumoto, J., Umemura, Y., Mantani, Y., Tanida, T., Warita, K., Tabuchi, Y., Yokoyama, T., & Kitagawa, H. (2014). Insight into the mechanism of reproductive dysfunction caused by neonicotinoid pesticides. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37, 1439-1443. <https://doi.org/10.1248/bpb.b14-00359>

Humann-Guilleminot, S., Laurent, S., Bize, P., Roulin, A., Glauser, G., & Helfenstein, F. (2021). Contamination by neonicotinoid insecticides in barn owls (*Tyto alba*) and Alpine swifts (*Tachymarptis melba*). *Science of the Total Environment*, 785, 147403. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.147403>

Humann-Guilleminot, S., de Montaigne, C. T., 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>

Ihara, M., D Buckingham, S., Matsuda, K., & B Sattelle, D. (2017). Modes of action, resistance and toxicity of insecticides targeting nicotinic acetylcholine receptors. *Current Medicinal Chemistry*, 24, 2925-2934. <https://doi.org/10.2174/0929867324666170206142019>

Jeschke, P., & Nauen, R. (2005). "Neonicotinoid Insecticides, 53-105". In: *Comprehensive Molecular Insect Science* (Eds. L. I. Gilbert, L. Iatrou & S. S. Gill). Elsevier, Oxford, UK, 459 pp.

Klingelhöfer, D., Braun, M., Brüggmann, D., & Groneberg, D. A. (2022). Neonicotinoids: A critical assessment of the global research landscape of the most extensively used insecticide. *Environmental Research*, 213, 113727. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2022.113727>

Köhler, H. R., & Triebkorn, R. (2013). Wildlife ecotoxicology of pesticides: can we track effects to the population level and beyond? *Science*, 341, 759-765. <https://doi.org/10.1126/science.1237591>

Lennon, R. J., Shore, R. F., Pereira, M. G., Peach, W. J., Dunn, J. C., Arnold, K. E., & Brown, C. D. (2020). High prevalence of the neonicotinoid clothianidin in liver and plasma samples collected from gamebirds during autumn sowing. *Science of the Total Environment*, 742, 140493. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.140493>

Li, Y., Miao, R., & Khanna, M. (2020). Neonicotinoids and decline in bird biodiversity in the United States. *Nature Sustainability*, 3, 1027-1035.

- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M. E., Camarero, P. R., Mougeot, F., & Mateo, R. (2015a). Assessing the risk of fipronil-treated seed ingestion and associated adverse effects in the red-legged partridge. *Environmental Science & Technology*, 49, 13649-13657. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03822>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M. E., Mougeot, F., & Mateo, R. (2015b). Imidacloprid-treated seed ingestion has lethal effect on adult partridges and reduces both breeding investment and offspring immunity. *Environmental Research*, 136, 97-107. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.10.023>
- Lopez-Antia, A., Ortiz-Santaliestra, M. E., Mougeot, F., & Mateo, R. (2013). Experimental exposure of red-legged partridges (*Alectoris rufa*) to seeds coated with imidacloprid, thiram and difenoconazole. *Ecotoxicology*, 22, 125-138. <https://doi.org/10.1007/s10646-012-1009-x>
- Lv, Y., Bing, Q., Lv, Z., Xue, J., Li, S., Han, B., Yang, Q., Wang, X., & Zhang, Z. (2020). Imidacloprid-induced liver fibrosis in quails via activation of the TGF- $\beta$ 1/Smad pathway. *Science of the Total Environment*, 705, 135915. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135915>
- MacDonald, A. M., Jardine, C. M., Thomas, P. J., & Nemeth, N. M. (2018). Neonicotinoid detection in wild turkeys (*Meleagris gallopavo silvestris*) in Ontario, Canada. *Environmental Science and Pollution Research*, 25, 16254-16260. <https://doi.org/10.1007/s11356-018-2093-0>
- McKay, H. V., Prosser, P. J., Hart, A. D. M., Langton, S. D., Jones, A., McCoy, C., Chandler-Morris, S. A., & Pascual, J. A. (1999). Do wood-pigeons avoid pesticide-treated cereal seed?. *Journal of Applied Ecology*, 36, 283-296. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.1999.00398.x>
- Millon, A., Arroyo, B. E., & Bretagnolle, V. (2008). Variable but predictable prey availability affects predator breeding success: natural versus experimental evidence. *Journal of Zoology*, 275, 349-358. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7998.2008.00447.x>
- Mineau, P., & Whiteside, M. (2013). Pesticide acute toxicity is a better correlate of US grassland bird declines than agricultural intensification. *PloS One*, 8, e57457. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0057457>
- Mitra, A., Chatterjee, C., & Mandal, F. B. (2011). Synthetic chemical pesticides and their effects on birds. *Research Journal of Environmental Toxicology*, 5, 81-96. <https://doi.org/10.3923/rjet.2011.81.96>
- Mohanty, B., Pandey, S. P., & Tsutsui, K. (2017). Thyroid disrupting pesticides impair the hypothalamic-pituitary-testicular axis of a wildlife bird, *Amandava amandava*. *Reproductive Toxicology*, 71, 32-41. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2017.04.006>



Møller, A. P., Biard, C., Blount, J. D., Houston, D. C., Ninni, P., Saino, N., & Surai, P. F. (2000). Carotenoid-dependent signals: indicators of foraging efficiency, immunocompetence or detoxification ability?. *Poultry and Avian Biology Reviews*, 11, 137-160.

Moreau, J., Rabdeau, J., Badenhauer, I., Giraudeau, M., Sepp, T., Crépin, M., Gaffard, A., Bretagnolle, V., & Monceau, K. (2022a). Pesticide impacts on avian species with special reference to farmland birds: a review. *Environmental Monitoring and Assessment*, 194, 1-48. <https://doi.org/10.1007/s10661-022-10394-0>

Moreau, J., Monceau, K., Gonnet, G., Pfister, M., & Bretagnolle, V. (2022b). Organic farming positively affects the vitality of passerine birds in agricultural landscapes. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 336, 108034. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2022.108034>

Moreau, J., Monceau, K., Crépin, M., Tochon, F. D., Mondet, C., Fraikin, M., Teixeira, M., & Bretagnolle, V. (2021). Feeding partridges with organic or conventional grain triggers cascading effects in life-history traits. *Environmental Pollution*, 278, 116851. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.116851>

Nauen, R., Ebbinghaus-Kintscher, U., Salgado, V. L., & Kausmann, M. (2003). Thiamethoxam is a neonicotinoid precursor converted to clothianidin in insects and plants. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 76, 55-69. [https://doi.org/10.1016/S0048-3575\(03\)00065-8](https://doi.org/10.1016/S0048-3575(03)00065-8)

Pan, Y., Chang, J., Xu, P., Xie, Y., Yang, L., Hao, W., Li, J., & Wan, B. (2022). Twenty-four hours of Thiamethoxam: In vivo and molecular dynamics simulation study on the toxicokinetic and underlying mechanisms in quails (*Coturnix japonica*). *Journal of Hazardous Materials*, 427, 128159. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.128159>

Perkins, R., Whitehead, M., Civil, W., & Goulson, D. (2021). Potential role of veterinary flea products in widespread pesticide contamination of English rivers. *Science of the Total Environment*, 755, 143560. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.143560>

Rosenberg, K. V., Dokter, A. M., Blancher, P. J., Sauer, J. R., Smith, A. C., Smith, P. A., Stanton, J. C., Panjabi, A., Helft, L., Parr, M., & Marra, P. P. (2019). Decline of the North American avifauna. *Science*, 366, 120-124. <https://doi.org/10.1126/science.aaw1313>

Rawi, S. M., Al-Logmani, A. S., & Hamza, R. Z. (2019). Neurological alterations induced by formulated imidacloprid toxicity in Japanese quails. *Metabolic Brain Disease*, 34, 443-450. <https://doi.org/10.1007/s11011-018-0377-1>

Rodrigues, A., Gaffard, A., Moreau, J., Monceau, K., Delhomme, O., & Millet, M. (in press). Analytical Development for the Assessment of Pesticide Contaminations in Blood and Plasma of Wild Birds: The Case of

Grey Partridges (*Perdix Perdix*). Journal of Chromatography A (in press).  
<https://dx.doi.org/10.2139/ssrn.4214039>

Rust, M. K. (2017). The biology and ecology of cat fleas and advancements in their pest management: a review. *Insects*, 8, 118. <https://doi.org/10.3390/insects8040118>

Ruuskanen, S., Rainio, M. J., Kuosmanen, V., Laihonon, M., Saikkonen, K., Saloniemi, I., & Helander, M. (2019). Female preference and adverse developmental effects of glyphosate-based herbicides on ecologically relevant traits in Japanese quails. *Environmental Science & Technology*, 54, 1128-1135. <https://doi.org/10.1021/acs.est.9b07331>

Salamolard, M., Butet, A., Leroux, A., & Bretagnolle, V. (2000). Responses of an avian predator to variations in prey density at a temperate latitude. *Ecology*, 81, 2428-2441. [https://doi.org/10.1890/0012-9658\(2000\)081\[2428:ROAAPT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1890/0012-9658(2000)081[2428:ROAAPT]2.0.CO;2)

Simon-Delso, N., Amaral-Rogers, V., Belzunces, L. P., Bonmatin, J. M., Chagnon, M., Downs, C., Furlan, L., Gibbons, D. W., Giorio, C., Girolami, V., Goulson, D., Kreutzweiser, D. P., Krupke, C. H., Liess, M., Long, E., McField, M., Mineau, P., Mitchell, E. A. D., Morrissey, C. A., Noome, D. A., Pisa, L., Settele, J., Stark, J. D., Tapparo, A., Van Dyck, H., Van Praagh, J., Van der Sluijs, J. P., Whitehorn, P. R., & Wiemers, M. (2015). Systemic insecticides (neonicotinoids and fipronil): trends, uses, mode of action and metabolites. *Environmental Science and Pollution Research*, 22, 5-34. <https://doi.org/10.1007/s11356-014-3470-y>

Stanton, R. L., Morrissey, C. A., & Clark, R. G. (2018). Analysis of trends and agricultural drivers of farmland bird declines in North America: A review. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 254, 244-254. <https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.11.028>

Story, P., & Cox, M. (2001). Review of the effects of organophosphorus and carbamate insecticides on vertebrates. Are there implications for locust management in Australia?. *Wildlife Research*, 28, 179-193. <https://doi.org/10.1071/WR99060>

Taliansky-Chamudis, A., Gómez-Ramírez, P., León-Ortega, M., & García-Fernández, A. J. (2017). Validation of a QuEChERS method for analysis of neonicotinoids in small volumes of blood and assessment of exposure in Eurasian eagle owl (*Bubo bubo*) nestlings. *Science of the Total Environment*, 595, 93-100. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.03.246>

Tassin de Montaigne, C., & Goulson, D. (2020). Identifying agricultural pesticides that may pose a risk for birds. *PeerJ*, 8, e9526. <https://doi.org/10.7717/peerj.9526>

Thompson, D. A., Lehmler, H. J., Kolpin, D. W., Hladik, M. L., Vargo, J. D., Schilling, K. E., LeFevre, G. H., Peebles, T. L., Poch, M. C., LaDuca, L. E., Cwiertny, D. M., & Field, R. W. (2020). A critical review on the

potential impacts of neonicotinoid insecticide use: current knowledge of environmental fate, toxicity, and implications for human health. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 22, 1315-1346. <https://doi.org/10.1039/C9EM00586B>

Tokumoto, J., Danjo, M., Kobayashi, Y., Kinoshita, K., Omotehara, T., Tatsumi, A., Hashiguchi, M., Sekijima, T., Kamisoyama, H., Yokoyama, T., Kitagawa, H., & Hoshi, N. (2013). Effects of exposure to clothianidin on the reproductive system of male quails. *Journal of Veterinary Medical Science*, 75, 755-760. <https://doi.org/10.1292/jvms.12-0544>

Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2003). Selective toxicity of neonicotinoids attributable to specificity of insect and mammalian nicotinic receptors. *Annual Review of Entomology*, 48, 339-364. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.48.091801.112731>

Tomizawa, M., & Casida, J. E. (2005). Neonicotinoid insecticide toxicology: mechanisms of selective action. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 45, 247-268. <https://doi.org/10.1146/annurev.pharmtox.45.120403.095930>

Wang, Y., Han, Y., Xie, Y., Xu, P., & Li, W. (2018). The metabolism distribution and effect of dinotefuran in Chinese lizards (*Eremias argus*). *Chemosphere*, 211, 591-599.

Walker, C. H. (2003). Neurotoxic pesticides and behavioural effects upon birds. *Ecotoxicology*, 12, 307-316. <https://doi.org/10.1023/A:1022523331343>

Williams, O. (2015). The Woodcock Network. <http://www.ringwoodcock.net/index.shtml>  
Accessed date: 12 October 2022.

Wintermantel, D., Odoux, J. F., Decourtye, A., Henry, M., Allier, F., & Bretagnolle, V. (2020). Neonicotinoid-induced mortality risk for bees foraging on oilseed rape nectar persists despite EU moratorium. *Science of the Total Environment*, 704, 135400. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.135400>

Wintermantel, D., Locke, B., Andersson, G. K., Semberg, E., Forsgren, E., Osterman, J., Pedersen, T. R., Bommarco, R., Smith, H. G., Rundlöf, M., & de Miranda, J. R. (2018). Field-level clothianidin exposure affects bumblebees but generally not their pathogens. *Nature Communications*, 9, 1-10. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07914-3>

Wood, T. J., & Goulson, D. (2017). The environmental risks of neonicotinoid pesticides: a review of the evidence post 2013. *Environmental Science and Pollution Research*, 24, 17285-17325. <https://doi.org/10.1007/s11356-017-9240-x>

Wretenberg, J., Lindström, Å., Svensson, S., Thierfelder, T., & Pärt, T. (2006). Population trends of farmland birds in Sweden and England: similar trends but different patterns of agricultural intensification. *Journal of Applied Ecology*, 43, 1110-1120.

Zhang, C., Li, X., Li, F., Li, G., Niu, G., Chen, H., Ying, G.-G., & Huang, M. (2022). Accurate prediction and further dissection of neonicotinoid elimination in the water treatment by CTS@ AgBC using multihead attention-based convolutional neural network combined with the time-dependent Cox regression model. *Journal of Hazardous Materials*, 423, 127029. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2021.127029>

**Table 1.** Summary of the mean concentrations [c] with standard deviations (SD) and range in  $\text{pg}\cdot\mu\text{L}^{-1}$  with their sample size (n) obtained by LC-MS/MS above the limits of detection (LOD) for each species. The sample size for each species is also provided (N). The percentage of samples above the LOD (n/N) is given in brackets (rounded to the nearest percent). Blackbirds are not referenced as no neonic was detected in the sampled individuals.

|                                     |          | <b>Clothianidin</b> | <b>Dinotefuran</b> | <b>Nitenpyram</b> | <b>Thiacloprid</b> | <b>Thiamethoxam</b> |
|-------------------------------------|----------|---------------------|--------------------|-------------------|--------------------|---------------------|
| <b>Cirl buntings (N = 34)</b>       |          |                     |                    |                   |                    |                     |
|                                     | n        | 5 (15%)             | 0                  | 0                 | 34 (100%)          | 4 (12%)             |
|                                     | [c] ± SD | 2.28±1.55           | -                  | -                 | LOD < [c] < LOQ    | 2.59±1.37           |
|                                     | range    | 1.04–4.87           | -                  | -                 | -                  | 1.61–4.56           |
| <b>Common nightingales (N = 25)</b> |          |                     |                    |                   |                    |                     |
|                                     | n        | 2 (8%)              | 0                  | 0                 | 25 (100%)          | 1 (4%)              |
|                                     | [c] ± SD | 0.05±0.06           | -                  | -                 | LOD < [c] < LOQ    | 0.06                |
|                                     | range    | 0.009–0.093         | -                  | -                 | -                  | -                   |
| <b>Grey partridges (N = 54)</b>     |          |                     |                    |                   |                    |                     |
| <i>Winter 2020/2021 (N = 23)</i>    | n        | 0                   | 3 (13%)            | 20 (87%)          | 1 (4%)             | 1 (4%)              |
|                                     | [c] ± SD | -                   | 6.20±3.62          | 23.10±11.33       | 0.07               | 23.73               |
|                                     | range    | -                   | 2.14–9.10          | 1.24–41.03        | -                  | -                   |
| <i>Winter 2021/2022 (N = 31)</i>    | n        | 8 (26%)             | 10 (32%)           | 29 (94%)          | 0                  | 3 (10%)             |
|                                     | [c] ± SD | 5.26±4.10           | 7.85±4.07          | 18.29±10.84       | -                  | 1.64±0.46           |
|                                     | range    | 1.92–14.26          | 3.32–16.61         | 1.78–43.53        | -                  | 1.23–2.14           |
| <b>Montagu's harriers (N = 55)</b>  |          |                     |                    |                   |                    |                     |
|                                     | n        | 3 (5%)              | 0                  | 0                 | 1 (2%)             | 0                   |
|                                     | [c] ± SD | 951.60±1299.21      | -                  | -                 | 89.58              | -                   |
|                                     | range    | 194.48–2 451.78     | -                  | -                 | -                  | -                   |

# ANNEXE D

Liste des produits phytosanitaires appliqués sur les cultures conventionnelles de pois, de blé, de maïs et fèves dont les graines ont servi à nourrir les perdrix des Chapitres II et III.

| Culture    | Application date | Phytosanitary treatments               | Commercial name | Chemical substances (concentration)  | Quantity  |
|------------|------------------|--|-----------------|--|-----------|
| Corn       | 02/02/2020       | Sowing (treated seeds with fungicides) | REDIGO®         | Prothioconazole + metalaxyl  | -         |
|            | 10/02/2020       | Fertiliser                             | CHLORURE 60     | Chlorure de potassium (60%)  | 150 kg/Ha |
|            | 28/03/2020       | Fertiliser                             | D.A.P 18-46-00  | Azote ammoniacal (18%)<br>+ Phosphore (46%)  | 200 kg/Ha |
|            | 11/04/2020       | Herbicide                              | WING-P          | Dimethenamide-P (212,5 g/L)<br>+ Pendimethaline (250 g/L)                              | 4 L/Ha    |
|            | 07/05/2020       | Herbicide                              | BUENO 480 SL    | Dicamba (480 g/L)  | 0.5 L/Ha  |
|            | 27/05/2020       | Insecticide                            | CORAGEN         | Chlorantraniliprole (200 g/L)  | 0.12 L/Ha |
|            | Pea              | 23/02/2020                             | Sowing          | -  | -         |
| 24/02/2020 |                  | Herbicide                              | NIRVANA S       | Imazamox (16,7 g/L)<br>+ Pendimethaline (250 g/L)                                      | 2.90 L/Ha |
| 24/04/2020 |                  | Insecticide                            | LAMBDASTAR      | Lambda-cyhalotrine (100 g/L)   | 0.06 L/Ha |
| 04/05/2020 |                  | Fungicide                              | CHLOROSTAR      | Chlorothalonil (500 g/L)   | 2 L/Ha    |
| 20/05/2020 |                  | Fungicide                              | PROSARO         | Tebuconazole (125 g/L)<br>+ Prothioconazole (125 g/L)                                  | 0.5 L/Ha  |
| Wheat      | 27/10/2019       | Sowing (treated seeds with fungicides) | CELESTE         | Fludioxonil + Disenoconazole   | -         |
|            | 05/12/2019       | Insecticide                            | TOLEDE GOLD     | Esfenvalerate (50 g/L)   | 0.10 L/Ha |
|            | 07/02/2020       | Herbicide                              | ATLANTIS PRO    | Mesosulfuron-methyl (10 g/L)<br>+ Iodosulfuron-methyl-sodium (2 g/L)                   | 0.9 L/Ha  |
|            | 07/02/2020       | Herbicide                              | ZYPAR           | Halauxifene-methyl (6,25 g/L)<br>+ Florasulame (5 g/L)<br>+ Cloquintocet-mexyl (6 g/L) | 0.40 L/Ha |
|            | 04/04/2020       | Fungicide                              | DHEMBE          | Bromoconazole (167 g/L)<br>+ Tebuconazole  | 238 L/Ha  |

|              |            |             |                 |   |          |
|--------------|------------|-------------|-----------------|---|----------|
|              | 22/04/2020 | Fungicide   | KARDIX          | (107 g/L)<br>Prothioconazole<br>(130 g/L)<br>+ Fluopyram<br>(65 g/L)<br>+ Bixafen<br>(65 g/L) | 0.8L/Ha  |
| Faba<br>bean | 03/12/2019 | Sowing      | -               | -   | -        |
|              | 04/04/2020 | Herbicide   | CORUM           | Bentazone<br>(480 g/L)<br>+ Imazamox<br>(22,4 g/L)  |          |
|              | 21/04/2020 | Fungicide   | AMISTAR         | Azoxystrobin<br>(250 g/L)   | 0.3 L/Ha |
|              | 21/04/2020 | Fungicide   | -               | Chlorothalonil<br>(500 g/L)   | 1 L/Ha   |
|              | 21/04/2020 | Fertiliser  | GOEMAR<br>MULTI | Bore<br>(120 g/L)   | 1.5 L/Ha |
|              | 05/05/2020 | Insecticide | KARATE K        | Pirimicarb<br>(100 g/L)<br>+ Lambda-Cyhalothrin<br>(5 g/L)                                    | 1 L/Ha   |
|              | 11/05/2020 | Fungicide   | SUNORG PRO      | Metconazole<br>(90 g/L)   | 0.8 L/Ha |

Liste des pesticides détectés dans les graines conventionnelles (analyse multi-résidus par réalisée par le laboratoire GIRPA, Beaucouzé, Loire Atlantique, France) utilisées pour nourrir les perdrix des chapitres II et III.

Les valeurs en gras correspondent à des niveaux dépassant la LMR actuelle

| Seed type | Chemical substance  | Pesticide type | Chemical family | Concentration (mg/kg) | MRL <sup>a</sup> (mg/kg) | LOQ <sup>b</sup> (mg/kg) | MoA <sup>c</sup>              |
|-----------|---------------------|----------------|-----------------|-----------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------------|
| Corn      | Piperonyl butoxyde  | Synergiser     | Benzodioxole    | 0.012                 | -*                       |                          | Cytochrome P450s inhibitor    |
| Pea       | Chlorpyrifos-methyl | Insecticide    | Organophosphate | <b>0.051</b>          | -                        | 0.01                     | AchE inhibitor                |
|           | Pirimiphos-methyl   | Insecticide    | Organophosphate | <b>0.015</b>          | 0.01                     | 0.01                     | AchE inhibitor                |
| Wheat     | Chlorpyrifos-methyl | Insecticide    | Organophosphate | 0.032                 | 0.05                     | 0.01                     | AchE inhibitor                |
|           | Pirimiphos-methyl   | Insecticide    | Organophosphate | 0.032                 | 5                        | 0.01                     | AchE inhibitor                |
| Faba bean | Tebuconazole        | Fungicide      | Triazole        | 0.017                 | 2                        | 0.01                     | Sterol biosynthesis inhibitor |

<sup>a</sup> Maximum residue limits defined by the European Commission (N° 396/2005).



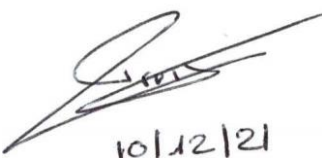
<sup>b</sup> Chemical substance limit of quantification.

<sup>c</sup> Mode of Action of the molecules according to IRAC (Insecticide Resistance Action Committee 2022) and FRAC (Fungicide Resistance Action Committee 2022)

\* Piperonyl butoxide is not a chemical substance regulated by the European Commission.

# ANNEXE E

Certificat d'analyse calorimétrique pour les grains de maïs, blé et pois biologiques et conventionnels qui ont été utilisés pour nourrir les perdrix des chapitres II et III.

| CENTRE D'ANALYSE:  |   | CEDRA<br>3, rue des Mardors<br>21560 COUTERNON - Tél : 03 80 32 03 10<br>CEBC - CNRS - UMR 7372<br>C2112A001                                   |                   |
|--|---|--|-------------------|
| ORIGINE.....:  |   | Graines  |                   |
| NUMERO DE DOSSIER.....:  |   | Réception du 02.12.2021  |                   |
| NATURE DE L'ECHANTILLON.....:  |   | 09.12.2021   |                   |
| NUMERO DE LOT.....:  |   | Cahier N°21/06 — page 148  |                   |
| DATE D'ANALYSE<br>N° ET PAGE DU CAHIER DE LABORATOIRE  |   | Interne  |                   |
| REFERENCE AUX NORMES.....:   |   |  |                   |
| TESTS  | SPECIFICATIONS  | RESULTATS  |                   |
| Valeur calorique totale*   |   | Conventionnel  | Bio               |
| Blé  |   | 15639 - 15481 J/g  | 16101 - 16053 J/g |
| Maïs   |   | 15814 - 15624 J/g  | 15857- 15858 J/g  |
| Pois   |   | 15991 - 15817 J/g  | 16153 - 16149 J/g |
| par rapport à la matière totale  |   |  |                   |
|  <p>Dr M. PROST<br/>Président du Directoire</p> | SIGNATURES :  |  |                   |
|  | <br>10 202<br>M. HAUMONT Contrôle ualité | <br>10/12/21<br>E. PROST-CAMUS<br>Responsable Laboratoire |                   |



## (SUR)VIVRE EN MILIEU AGRICOLE : APPROCHE SYSTEMIQUE DES EFFETS SUBLETAUX DES PESTICIDES SUR L'ETAT DE SANTE DE LA PERDRIX GRISE (*PERDIX PERDIX*)

### Résumé :

Depuis plusieurs décennies, le déclin des oiseaux spécialistes des milieux agricoles anime le monde scientifique à travers une large documentation sur les causes et les conséquences de ce phénomène. Une des questions clefs porte sur la part de responsabilité des pesticides dans cette tendance, car les études menées jusqu'ici indiquent des relations de cause à effet sans pour autant identifier clairement les mécanismes sous-jacents. L'un des défis majeurs est donc de fournir des faits pertinents sur le plan biologique pour une meilleure évaluation des risques liés aux pesticides pour les oiseaux des champs. Ainsi, le but de cette thèse était d'appréhender les effets sublétaux des pesticides sur les traits d'histoire de vie de la perdrix grise (*Perdix perdix*) à la fois à l'aide d'expérimentations en conditions contrôlées mais aussi de suivi d'individus sauvages. Associée à la survie et à la reproduction, l'approche multi-trait réalisée ici a permis d'appréhender (1) les effets négatifs des pesticides sur plusieurs traits d'histoire de vie des perdrix, à la fois en captivité mais aussi *in natura*, (2) l'omniprésence de cocktails de pesticides dans le sang des oiseaux et leurs liens avec les effets sublétaux, (3) l'importance de prendre en compte les processus évolutifs dans les effets à long terme des pesticides en considérant les effets parentaux et la plasticité phénotypique des individus et enfin (4) la nécessité d'utiliser le biomonitoring des espèces sentinelles pour un meilleur suivi de la contamination des agroécosystèmes à l'échelle locale mais aussi comme outil de développement et de mise en place de zones refuges à l'exposition aux pesticides.

**Mots-clés :** Produits phytosanitaires, effets cocktails, biomonitoring, oiseaux des champs, agriculture conventionnelle, agriculture biologique, écotoxicologie, conservation

## SURVIVING IN AGROECOSYSTEMS: A SYSTEMIC APPROACH TO THE SUBLETHAL EFFECTS OF PESTICIDES ON THE HEALTH STATUS OF THE GREY PARTRIDGE (*PERDIX PERDIX*)

### Abstract:

For several decades, the farmland bird decline has been the subject of much scientific attention, with a large body of literature on the causes and consequences of this phenomenon. One of the major issue is whether pesticides are responsible for this trend, as studies conducted so far indicate cause and effect relationships without clearly identifying the underlying mechanisms. A major challenge is thus to provide biologically relevant evidences for a better assessment of pesticide-related risks to farmland birds. The aim of this thesis was to study the sublethal effects of pesticides on the life history traits of the grey partridge (*Perdix perdix*) using both experiments under controlled conditions and monitoring of free-living birds. In combination with survival and reproduction, the multi-trait approach carried out here allowed us to understand (1) the deleterious effects of pesticides on several life history traits of partridges, both in captivity and *in natura*, (2) the ubiquity of pesticide cocktails in the blood of birds and their links with sublethal effects, (3) the importance of considering evolutionary processes in the long-term effects of pesticides by considering parental effects and phenotypic plasticity of individuals and finally (4) the need to use biomonitoring of sentinel species for a better monitoring of the contamination of agroecosystems at the local scale but also as a tool for the development and implementation of refuge areas to pesticide exposure.

**Key-words:** Phyto-pharmaceutical products, cocktail effects, biomonitoring, farmland birds, conventional agriculture, organic agriculture, ecotoxicology, conservation



Centre d'Etudes Biologiques de Chizé  
405 route de Prissé-la-Charrière  
79360 Villiers-en-Bois

