

## 1. Informations Générales

---

|  |  |
|--|--|
| Numéro de version                          | 1  |
| 1.1. Référence Dossier                     | 2024120922136407   |
| 1.2. Titre du projet                       | Influence du mercure sur le fonctionnement des mitochondries chez des oiseaux en milieu naturel et implications en écotoxicologie : séparation des effets de l'environnement précoce et de l'environnement de croissance |
| <b>1.3. Durée du projet</b>                |  |
| Nombre d'années                            | 3  |
| <b>1.4. Date prévue de début de projet</b> |  |
| Dès que le projet est autorisé             | Oui  |

## 3. Informations Administratives et Réglementaires

---

### 3.1. L'Etablissement Utilisateur

---

#### 3.1.1. Agrément de l'Etablissement Utilisateur (EU) où seront utilisés les animaux

---

|                                    |   |
|------------------------------------|---|
| Nom de l'Etablissement Utilisateur | Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (LBBE) |
| Numéro d'agrément                  | B 692660703   |

#### 3.1.2. Responsable(s) de la mise en œuvre générale du projet dans l'EU et de sa conformité à l'autorisation de projet

---

Nombre de responsables de la mise en oeuvre générale du projet 1

#### Coordonnées du responsable

---

Civilité Madame

Nom DOLIGEZ

Prénom Blandine

### Adresse Postale

---

Nom du laboratoire Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (LBBE)

Complément Université Lyon 1 (UCBL) - Bâtiment Gregor Mendel

Numéro 43

Voie boulevard du 11 novembre 1918

Code Postal 69622

Ville Villeurbanne cedex

Pays France

Email blandine.doligez@univ-lyon1.fr

Numéro de téléphone 06 95 40 02 47

### 3.1.3. Responsable(s) du bien être des animaux

---

Nombre de responsables du bien être des animaux 1

### Coordonnées du responsable

---

Civilité Madame

Nom GILOT-FROMONT

Prénom Emmanuelle

### Adresse Postale

---

Nom du laboratoire Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive (LBBE)

Complément Université Lyon 1 (UCBL) - Bâtiment Gregor Mendel

|                     |  |
|---------------------|--|
| Numéro              | 43                                     |
| Voie                | boulevard du 11 novembre 1918          |
| Code Postal         | 69622                                  |
| Ville               | Villeurbanne cedex                     |
| Pays                | France                                 |
| Email               | emmanuelle.gilotfromont@vetagro-sup.fr |
| Numéro de téléphone | 04 72 44 80 18                         |

### 3.2. Le Personnel

---

|   |     |
|---|-----|
| Conception des procédures expérimentales et des projets | Oui |
| Application de procédures expérimentales aux animaux    | Oui |
| Soins aux animaux                                       | Oui |
| Mise à mort des animaux                                 | Oui |

### 3.3. Le Projet

---

#### 3.3.1. Objectif du projet

---

##### Le projet est-il

---

|   |     |
|---|-----|
| Justifié d'un point de vue scientifique | Oui |
|---|-----|

Quelle est l'instance qui a évalué l'intérêt de ce projet ?

---

Le programme scientifique a fait l'objet de validations de la part :

- du Fonds National Suisse (FNS) qui finance le projet de thèse dirigé par un partenaire suisse de l'Institut Ornithologique Suisse (Pierre Bize)
- du Centre de Recherches sur la Biologie des Populations d'Oiseaux (C.R.B.P.O.) : autorisations de captures et manipulations d'oiseaux pour baguage scientifique (Programme Personnel n° 655), concernant le suivi à long terme de la population et les différents échantillonnages prévus ;
- de la DREAL Auvergne-Rhône-Alpes, concernant la perturbation intentionnelle d'une espèce protégée dans le cadre de son suivi ;
- de l'HCERES lors de l'évaluation du laboratoire, dont l'écotoxicologie a été identifiée comme un axe prioritaire dans le contrat quinquennal 2021-2026.

### 3.3.2. Description du projet

---

#### 3.3.2.1. Objectifs du projet

Les rivières sont des milieux sensibles à la pollution chimique car le ruissellement y concentre les polluants libérés dans l'environnement. Pourtant l'impact toxicologique de la pollution sur les organismes des rivières reste mal appréhendé. Chez les eucaryotes (dont les cellules possèdent des noyaux), les mitochondries sont responsables de la production d'énergie et sont ainsi au cœur des processus métaboliques. Par conséquent, on peut s'attendre à ce que les caractéristiques des mitochondries jouent un rôle majeur dans les réponses des individus aux variations de l'environnement, dont la pollution, et soient ainsi sous fortes pressions de sélection. Les études écotoxicologiques sur des cellules et des animaux de laboratoire ont clairement montré que de nombreux polluants perturbent les traits mitochondriaux. Pourtant, l'impact des polluants sur le fonctionnement des mitochondries dans les populations naturelles, et les conséquences de ces perturbations sur la croissance, la reproduction et la survie, restent des questions pratiquement inexplorées chez les vertébrés sauvages. Le projet vise à explorer ces questions lors de la croissance des jeunes chez une espèce de passereau bioindicateur des rivières de montagne, le cincle plongeur. On se focalisera ici sur le (methyl)mercure car il s'agit d'un polluant dont les effets sur les traits mitochondriaux ont été montrés sur des cellules en culture et des animaux de laboratoire. Dans les populations naturelles d'oiseaux, il est aussi associé à une réduction de la valeur sélective mais on ne sait pas quel est le rôle des changements dans les traits mitochondriaux sur cette réduction. Ici, on vise à comprendre l'origine de la variabilité dans les traits mitochondriaux entre individus en séparant expérimentalement les effets des facteurs précoces (génétique, parentaux) de ceux des facteurs auxquels les jeunes sont soumis pendant la croissance, et en particulier la concentration en mercure. Dans une population suivie depuis 10 ans et où les niveaux de méthylmercure à l'échelle de chaque territoire ont été mesurés au préalable à partir des plumes des adultes, on réalisera des adoptions croisées partielles de jeunes juste après l'éclosion entre nids situés dans des zones à forte et faible concentration de mercure. La croissance de ces jeunes sera ensuite suivie jusqu'à l'envol et leurs traits mitochondriaux mesurés à partir de globules rouges (qui sont pourvus de mitochondries fonctionnelles chez les oiseaux).

### 3.3.2.2. Déroulé du projet

---

Dans le cadre du suivi général à long terme de la population de cincles plongeurs étudiée, les événements de reproduction sont suivis sur l'ensemble de la saison, entre mi-février et fin juin. L'ensemble des sites de reproduction est visité chaque semaine afin de détecter la présence de nids actifs et récolter les informations de reproduction principales sur chaque nid : date de ponte du premier œuf, nombre d'œufs final, date d'éclosion, nombre de jeunes à 7 jours puis à 12 jours, succès d'envol. On suit les sites déjà répertoriés les années précédentes et, en parallèle, de nouveaux sites sont recherchés activement sur les territoires sans nid actif repéré mais où la présence d'oiseaux est avérée. Ceci permet un suivi le plus exhaustif possible des nids actifs sur la zone étudiée, représentant entre 260 et 320 nids suivis chaque année depuis 2017, dont la très grande majorité sont détectés dès la ponte.

Pour chaque nid, une fois la date de ponte du premier œuf et le nombre final d'œufs connus (entre 4 et 6 pour >95% des nids), une visite est planifiée au jour prévu de l'éclosion, c'est-à-dire le 17<sup>e</sup> jour d'incubation, pour vérifier (1) que le nid n'est pas en échec précoce (disparition des œufs au cours de l'incubation suite à un événement de prédation ou d'usurpation de territoire, ou abandon des œufs suite à la mortalité d'un des deux parents) et (2) confirmer la date effective d'éclosion (qui a effectivement lieu au 17<sup>e</sup> jour d'incubation dans > 90% des cas). Lorsque des jeunes sont présents dans les nids le jour de l'éclosion, ils sont pesés afin de vérifier leur âge exact (les jeunes éclos le jour même pèsent moins de 5 g en fin de journée).

Chaque jour, les nids pour lesquels l'éclosion a été observée seront donc listés et le niveau d'exposition au mercure sur le territoire concerné sera comparé entre ces nids. Ce niveau d'exposition est déjà disponible grâce à une série de mesures réalisées sur les plumes prélevées sur les adultes les années précédentes (au moins une mesure actuellement disponible par territoire). Des paires de nids expérimentaux seront alors constituées parmi ces nids en associant de préférence un nid situé dans un territoire peu exposé à un nid situé dans un territoire fortement exposé, en minimisant la distance entre nids lorsqu'il y a plusieurs possibilités tout en diversifiant les rivières concernées afin de pouvoir décorrélérer la variation due à la rivière de celle due au territoire dans les analyses statistiques ultérieures.

Au jour 2 après l'éclosion, on échangera la moitié des jeunes entre les nids des paires ainsi constituées, de façon à conserver une partie des jeunes dans leur nid d'origine et y associer une partie des jeunes venant de l'autre nid de la paire. Étant donné que la croissance est très rapide les premiers jours après l'éclosion (la masse des jeunes double en 2 jours), échanger les jeunes entre nids éclos le même jour minimise les différences de croissance dues à des différences de masse au départ. On s'attend donc à ce que les différences de croissance et de métabolisme soient dues aux conditions auxquelles les jeunes sont soumises soit dans le nid d'origine, avant l'éclosion (si c'est le nid d'origine qui influence les paramètres de croissance) et/ou aux conditions dans lesquelles ils grandissent (si c'est le nid adoptif qui influence ces paramètres), les deux effets pouvant bien entendu s'additionner.

La croissance des jeunes dans les paires de nids expérimentaux sera ensuite suivie de la même façon que pour les autres nids dans le cadre du suivi général de la population. Les jeunes de ces nids seront pesés et bagués au jour 7 (avec des bagues portant des numéros uniques), en établissant la correspondance avec le code individuel reçu au moment de l'échange, ce qui permet (1) de suivre la croissance de chaque jeune individuellement et (2) de déterminer l'origine de chaque poussin (son nid d'origine). Les jeunes seront ensuite pesés à nouveau et mesurés (longueur du tarse, de la croissance des plumes) au jour 12 ; ceux qui n'auront pas pu être bagués au jour 7 (voir points limites ci-dessous) le seront alors, et une prise de sang sera réalisée pour l'analyse des caractéristiques mitochondriales. La quantité de sang prélevée et utilisée pour les analyses des caractéristiques mitochondriales sera de 40 microlitres par jeune (quantité ajustée d'après des premières analyses réalisées sur des jeunes non expérimentaux en 2024) ; cette quantité représente environ 0.10 à 0.15 % de la masse corporelle (normalement 40 à 55 g au jour 12) et est largement inférieure au seuil maximal préconisé pour les prises de sang sur oiseaux sauvages (0.75% sur oiseaux adultes, aucune préconisation spécifique n'ayant été publiée pour les jeunes en croissance – nous nous limitons donc à une quantité 6 fois inférieure ici).

La mesure de globules rouges sanguins, qui possèdent des mitochondries fonctionnelles chez les oiseaux, représente une alternative faiblement invasive et sans conséquences néfastes aux prélèvements de tissus par biopsies, généralement pratiqués sur les mammifères (entraînant souvent un prélèvement terminal), Ici, les prises de sang de très petites quantités ne compromettent pas la survie future des oiseaux. Les échantillons de sang seront analysés le soir même, pour obtenir différents paramètres du fonctionnement des mitochondries dans les globules rouges vivants, selon une méthode récemment développée par Stier et al. (2017, *Methods in Ecology and Evolution*) et qui a été ajustée avec succès dans notre population au cours d'un stage de Master 2 en 2020 puis en 2024 au cours d'un projet de thèse (M. Ohse, Institut Ornithologique Suisse). Les mesures seront faites en collaboration avec les chercheurs ayant développé la méthode (P. Bize) dans le cadre de ce projet de thèse. Le protocole de mesure permet d'accéder directement aux mitochondries dans les globules rouges perméabilisés à la digitonine et d'obtenir plusieurs paramètres de leur fonctionnement en utilisant un lecteur de plaque : (1) la consommation d'O<sub>2</sub> utilisée pour la synthèse d'ATP (OXPHOS) et (2) la consommation d'O<sub>2</sub> entraînée par la fuite de protons mitochondriaux à travers la membrane interne (LEAK). Les mesures de respiration seront corrigées pour les respirations non-mitochondriales (mesurées après l'ajout de l'inhibiteur du complexe III, l'antimycine A) et standardisées par le nombre de cellules sanguines par échantillon, obtenu via la quantité totale de contenu protéique dans les échantillons restants à la fin de l'analyse. Ces analyses permettent donc d'obtenir des mesures de l'efficacité de la chaîne d'oxydo-réduction par le transfert des électrons le long des complexes protéiques et la fuite de protons au-travers de la membrane lors de la respiration mitochondriale.

En plus de ces caractéristiques mitochondriales, on disposera également :

- des mesures de croissance des jeunes dans les nids expérimentaux (trois pesées au cours de la croissance : au jour 2, 7 et 12, et mesures de taille au jour 12) ;
- des mesures de marqueurs sanguins complémentaires, qui seront réalisées ultérieurement au laboratoire (sur la

fraction de sang restante après analyses mitochondriales et qui sera congelée à -70°C juste après les analyses sur lecteur de plaque, On s'intéressera tout particulièrement aux marqueurs du stress oxydant, car le fonctionnement mitochondrial génère des molécules hautement réactives (appelées ROS pour « Reactive Oxygen Species ») et provoquant des dommages en s'attaquant aux macromolécules dans les cellules (ADN, membranes, protéines). On mesurera ainsi (1) les défenses antioxydantes (défenses plasmatiques totales et activité enzymatique in vitro de l'enzyme glutathion peroxydase) et (2) les dommages oxydatifs (protéines carbonylées, métabolites réactifs de l'oxygène). Ces analyses peuvent être réalisées chacune sur quelques microlitres de plasma.

On comparera les valeurs de l'ensemble de ces mesures (paramètres de croissance caractéristiques mitochondriales, marqueurs sanguins du stress oxydant) entre jeunes dans les nids expérimentaux en fonction de leur origine (jeune adopté d'un autre nid ou jeune originaire du nid en question) pour séparer la part de variation dans ces mesures liée à la concentration en mercure du territoire du nid d'origine vs. celui du nid d'adoption. Si le nid d'adoption influence plus les valeurs des paramètres que le nid d'origine, c'est que la croissance et le fonctionnement mitochondrial des jeunes dépend en premier lieu de leur environnement de croissance après l'éclosion que de leur environnement d'origine (et vice versa). Les modèles statistiques utilisés (Modèles Linéaires Mixtes - LMMs) testeront l'effet des concentrations en mercure sur les territoires d'origine et de croissance, et tiendront compte d'un ensemble de paramètres environnementaux potentiellement confondants (date d'éclosion, nombre de jeunes, âge et condition des parents, etc.).

A noter que l'on n'attend pas d'effet à long terme de ces échanges sur le plan de la génétique de la population, puisqu'ils concernent une échelle spatiale à laquelle les individus de la population se déplacent déjà de façon naturelle : environ 20% des événements de dispersion natale des jeunes ont lieu entre rivières différentes de la zone d'étude, et au moins 25% des recrutements d'adultes dans la population sont des individus venant de l'extérieur de la population d'étude. Le brassage artificiel lié aux échanges entre nids n'est donc pas susceptible d'affecter la structuration génétique de la population.

### 3.3.2.3. Bénéfices attendus du projet

---

Le projet vise tout d'abord à apporter des connaissances fondamentales concernant l'impact de la pollution au mercure sur des organismes en milieu naturel, donc en présence d'autres sources de stress potentielles (parasitisme, prédation, manque de nourriture, etc.), ce qui peut fortement changer les conclusions d'études réalisées in vitro ou en captivité. Pour ce faire, on s'intéresse à des paramètres fondamentaux du fonctionnement des cellules, ici la respiration mitochondriale. De façon générale, les processus liés à la variabilité des caractéristiques des mitochondries dans les populations naturelles restent largement inconnus, ce qui empêche de comprendre comment ces caractéristiques influencent, via le métabolisme, l'évolution et l'adaptation des populations sauvages aux changements environnementaux. Ce projet apportera plus spécifiquement des connaissances de base sur cette variabilité des caractéristiques mitochondriales entre les individus dans la nature et l'impact de l'environnement, en particulier la pollution chimique au mercure, sur cette variation ; il informera aussi sur les conséquences de cette variation sur la croissance, la reproduction et la survie. Les réponses à ces questions sont essentielles à la fois en biologie évolutive, pour comprendre les bases mécanistiques des compromis en termes d'histoire de vie, et en biologie de la conservation, pour comprendre ce qui rend certains individus, populations ou espèces plus vulnérables que d'autres à la pollution. De façon plus appliquée, le projet apportera également des informations clé pour comprendre l'impact de la pollution au mercure sur un organisme bioindicateur du milieu rivulaire dans la zone d'étude, et ces informations seront mises à disposition des partenaires institutionnels (PNR de Chartreuse, collectivités territoriales) et associatifs locaux, pour cibler potentiellement des actions de restauration de la qualité de l'eau face à diverses sources de pollution. De telles actions sont en effet souvent d'une efficacité limitée à cause du manque d'information sur les variations dans l'espace et le temps des concentrations de ces polluants à une échelle spatiale fine et sur leurs effets biologiques conjoints à différents niveaux d'organisation (individus, populations, écosystèmes). L'enjeu de ces restaurations est à la fois environnemental mais aussi sanitaire, car les activités humaines liées à l'eau sont nombreuses dans la zone d'étude (pêche, sports d'eau, baignade...).

#### 3.3.2.4. Nuisances ou effets indésirables attendus sur les animaux

---

Les effets indésirables potentiels sur les individus expérimentaux sont : 1 - un risque de refroidissement et/ou manque de nourrissage pendant le transport des jeunes entre nids ; 2 - un impact négatif de la prise de sang sur la fin de croissance des jeunes ; 3 - une augmentation du risque de prédation du fait de visites supplémentaires aux nids ; 4 - une dissémination accrue des pathogènes ou parasites entre nids. Voir ci-dessous (stratégies de raffinement) les précautions prises afin de limiter ces impacts négatifs. Le risque d'abandon des nids pendant la phase de manipulation devrait rester nul car les nids ne sont jamais laissés vides au cours des échanges, gardant toujours au moins la moitié des poussins à tout moment. Une diminution du nombre de jeunes au nid peut arriver naturellement (mortalité pendant la croissance) et n'entraîne pas de désertion directe ; ici elle restera très courte. A savoir que le dérangement au nid a lieu régulièrement au cours des opérations de suivi des nids (pour compter les œufs, vérifier les éclosions, etc.), accompagné potentiellement du prélèvement des poussins pour pesée pendant 5 à 10 min. Ces dérangements n'ont jamais occasionné de désertion directe évidente au cours des 10 années passées du suivi. Le risque d'abandon (ou infanticide) des jeunes devrait également rester nul car dans ces espèces de passereaux, les adultes ne reconnaissent pas leurs jeunes et ne sont pas sensibles aux odeurs que les humains peuvent laisser sur les jeunes (nous manipulons régulièrement les jeunes pour le baguage et les mesures sans aucun abandon après le retour au nid ; l'odorat chez ces espèces est extrêmement peu développé). Des expériences d'adoption croisées sont réalisées de façon très fréquente depuis des dizaines d'années chez de multiples espèces d'oiseaux cavicoles, sans augmentation documentée de la mortalité des jeunes (voir les nombreux exemples dans Breed & Moore, Chaper 3 – Behavioral Genetics, Animal Behavior 2012, 67-98, ou Winney et al. Methods Ecol Evol 6 : 584-592). La responsable du projet a elle-même conduit par le passé plusieurs expériences d'adoptions croisées chez différentes espèces de passereaux (mésanges, gobemouches), impliquant plusieurs centaines de nids, et lui conférant une grande expérience dans leur réalisation pratique et les précautions à respecter (par ex. Doligez et al. 2002 Science 297 : 1168-1170 ; Voillemot et al. 2012 BMC Ecology 12 : 17 ; Cauchard et al. 2017 Frontiers Ecol Evol 5 : 107).

### 3.3.3. Précisez, le cas échéant, les méthodes de mise à mort prévues

---

- Pas de mise à mort prévue, les échantillonnages ayant justement vocation à être compatibles avec un suivi à long terme des individus échantillonnés.
- En cas de blessure très sévère lors de la manipulation (aucun cas répertorié à ce jour sur les plus de 7000 manipulations de jeunes effectuées dans la population), entraînant une impossibilité de relâcher l'oiseau, une mise à mort par dislocation cervicale sera envisagée. La mort sera confirmée après la dislocation par la rigidité cadavérique (débutant généralement après quelques dizaines de minutes).

### 3.3.6. Stratégies de Remplacement, de Réduction et de Raffinement

---

#### 3.3.6.1. Remplacement

---

L'objectif du projet est de décrire les effets de l'exposition chronique des oiseaux au mercure et ses interactions éventuelles avec d'autres sources de stress en situation naturelle sur des paramètres physiologiques fondamentaux (fonctionnement mitochondrial). Il repose donc par essence sur la possibilité de prendre les mesures sur ces oiseaux en nature. Il n'est donc pas possible de remplacer les animaux utilisés par d'autres types de modèles.

#### 3.3.6.2. Réduction

---

Pour réduire le nombre d'individus inclus dans l'expérience au strict minimum, nous réaliserons des adoptions croisées partielles (protocole « intra-nid »), avec dans chaque nid expérimental une partie (la moitié) des jeunes originaires du nid en question et une partie venant du nid apparié (jeunes adoptés). La comparaison des jeunes issus de nids différents mais élevés dans les mêmes conditions / du même nid mais élevés dans des conditions différentes permet de contrôler pour les sources de variation autres que celles d'intérêt principal, ici l'exposition au mercure, et donc d'avoir le plus de puissance statistique possible pour séparer les différents effets. En 2024, nous avons pu mesurer les caractéristiques mitochondriales sur environ 100 jeunes cincles au cours de leur croissance dans leur nid d'origine, c'est-à-dire hors expérience. Ces données préliminaires nous donnent un ordre de grandeur des tailles d'effet attendues a priori et ainsi permettent de calibrer le nombre de jeunes expérimentaux nécessaire. Les caractéristiques mitochondriales obtenues donnent une différence entre territoires les plus et les moins exposés au mercure d'environ 7 % pour OXPHOS. Sur la base d'une telle différence, la taille d'effet attendue serait autour de 0.12 à 0.15 selon les paramètres, correspondant à une taille d'échantillon souhaitée entre 450 et 750 jeunes au total pour une puissance de 95%. Sachant qu'en moyenne chaque nid expérimental contient 4 à 5 jeunes, cela correspond à environ 90 à 180 nids expérimentaux. D'après la distribution des dates d'éclosion les années précédentes, nous devrions pouvoir réaliser des échanges entre 30 paires de nids, soit environ 240 à 250 jeunes, sur une année. Cependant, parmi ces paires de nids possibles, les différences de niveaux de mercure seront plus ou moins fortes. Donc réaliser l'expérience sur 3 années, pour un total de 180 nids, soit autour de 750 jeunes, devrait permettre d'explorer une variation de l'exposition au mercure suffisante, malgré les aléas liés aux conditions météorologiques sur le terrain et à la variation des niveaux d'exposition au mercure entre paires de nids. La 3e année d'expérience ne sera réalisée que si le nombre de jeunes qui auront effectivement pu être échangés les 2 premières années n'est pas suffisant ; des analyses statistiques (modèles linéaires mixtes) au bout de 2 ans testeront si des effets peuvent être détectés, pour décider d'arrêter l'expérience avant la 3e année le cas échéant.

#### 3.3.6.3. Raffinement

---

Le projet vise à mesurer et comprendre l'impact de l'exposition au mercure sur des paramètres physiologiques fondamentaux en population naturelle. Pour ce faire, nous utiliserons la variabilité naturelle de l'exposition au mercure entre les différents territoires sur des rivières aux niveaux d'anthropisation et industrialisation passées différentes, pour comparer des jeunes soumis à des niveaux d'exposition au mercure différents sans avoir à manipuler directement les doses de mercure. Les procédures expérimentales mises en œuvre pendant la manipulation des oiseaux visent à réduire les impacts négatifs potentiels sur les individus : 1- utilisation de chaufferettes pour garder les jeunes (qui ne thermorégulent pas encore) au chaud pendant le transport ; ces chaufferettes sont utilisées en routine pour les vérifications d'éclosion (jour 0) et le baguage des jeunes (jour 7), en particulier lorsque la température extérieure est basse ; 2- nettoyage et désinfection du matériel utilisé pendant le transport après chaque échange pour limiter la dissémination de pathogènes et parasites (acariens) entre nids ; 3- limitation du temps de transport des poussins entre nids ; on visera 30 min maximum entre les nids appariés, ce qui représente un temps de pause de nourrissage des parents que l'on peut observer naturellement lors du suivi général de la population. Si le temps de transport dépasse cette durée car il n'y a pas de nids à proximité l'un de l'autre qui peuvent être appariés, nous prévoirons un nourrissage artificiel pendant le transport en utilisant de la nourriture spécifique pour l'élevage d'oiseaux insectivores, enrichie en protéines et vitamines (pâtée d'élevage Cunipic) ; 4- limitation de la quantité de sang prélevée au jour 12 à 0.15% de la masse corporelle totale maximum (40 microl), 6 fois inférieure à la quantité maximale préconisée (0.75%) et correspondant à un micro-échantillonnage; des prises de sang de cette quantité ont déjà été réalisées dans la population par le passé (projet APAFIS#28729-2020121716192778 v4), sans effet négatif notable décelé sur la survie jusqu'à l'envol ; 5- blocage de l'entrée des nids pendant le temps de pesée et sélection des poussins à prélever pour empêcher les parents de trouver le nid vide et ainsi empêcher toute désertion ; 6- attention particulière pendant l'approche des nids à ne pas toucher les supports (rochers, murs) autour afin d'éviter de laisser des traces odorantes pouvant attirer des prédateurs mammifères.

### 3.4. Les Animaux

---

#### 3.4.2. Espèces animales ou types d'animaux utilisés (le champ 3.4.1. est supprimé)

---

Autres oiseaux (autres Aves) [A29]  Oui

#### 3.4.3. Justifiez la pertinence des espèces animales choisies

---

Le cincle plongeur a été choisi comme espèce d'étude sur le site proposé pour 4 raisons principales :

- (1) sa situation (assez élevée) dans la chaîne trophique, puisqu'il s'agit d'un prédateur d'invertébrés aquatiques, entraînant des niveaux de bioconcentration de polluants importants, et donc la possibilité de quantifier les polluants et détecter des effets biologiques avec une puissance statistique importante ;
- (2) une variation importante des niveaux et type de pollution entre rivières étudiées, en particulier des concentrations de mercure, permettant là encore de détecter et quantifier des variations des effets de ces polluants ;
- (3) une densité de cincles élevée dans la population étudiée pour assurer des tailles d'échantillons importante et donc une puissance statistique satisfaisante ;
- (4) enfin, bien que le cincle soit une espèce protégée, son statut de conservation en France est « préoccupation mineure » c'est-à-dire le statut le plus favorable (avec des populations stables).

3.4.4. S'agit-il de spécimens d'espèces menacées énumérées à l'annexe A du règlement (CE) n° 338/97 du Conseil du 9 décembre 1996 relatif à la protection des espèces de faune et de flore sauvages par le contrôle de leur commerce ? Non

3.4.5. S'agit-il de spécimens de primates non humains ? Non

3.4.6. S'agit-il d'animaux capturés dans la nature ? Oui

Si oui, éléments scientifiques démontrant que la finalité de la procédure expérimentale ne peut être atteinte en utilisant d'autres animaux que ceux capturés dans la nature.

L'objectif du projet est de décrire les effets de l'exposition chronique des oiseaux au mercure et ses interactions éventuelles avec d'autres sources de stress en situation naturelle sur des paramètres physiologiques fondamentaux (fonctionnement mitochondrial). Il repose donc par essence sur la possibilité de prendre les mesures sur ces oiseaux en nature.

3.4.7. S'agit-il d'animaux d'espèces domestiques, errants ou vivant à l'état sauvage ? Non

3.4.8. Catégorie des animaux utilisés dans le projet :

Animaux non domestiques non tenus en captivité Oui

Animaux non domestiques non tenus en captivité

Si les animaux utilisés sont des spécimens d'espèces protégées en application de l'article L. 411-1 du code de l'environnement, indiquez les références de la dérogation accordée pour effectuer la capture des animaux dans le milieu naturel (4° de l'article L. 411-2 du code de l'environnement) :

- Capture des oiseaux sous autorisation du C.R.B.P.O. (Centre de Recherches sur la Biologie des Populations d'Oiseaux, centre du baguage scientifique en France, Museum National d'Histoire Naturelle), programme personnel n° 655 et autorisation de captures d'oiseaux pour baguage à des fins scientifiques n° 14724 pour la coordinatrice du projet (renouvelés annuellement, y compris pour les assistants responsables des opérations de capture et baguage des adultes et des poussins). Ces autorisations couvrent également les prises de sang simples (par effraction cutanée) comme celles réalisées ici et le marquage des jeunes pour suivi avant baguage (codes individuels avec les touffes de duvet).
- Dérogations par arrêtés préfectoraux des départements de l'Isère (n°38-2023-09-28-00003) et de la Savoie (n°74-2023-09-22-00007) pour les non bagueurs de l'équipe non concernés par les autorisations de baguage (intervenant sur le suivi de la reproduction). Une dérogation pour le transport des animaux est déposée conjointement à la présente demande.

Justification scientifique montrant que l'objectif de la procédure expérimentale ne peut être atteint en utilisant un animal élevé en vue d'une utilisation dans des procédures expérimentales :

L'objectif du projet est de décrire les effets de l'exposition chronique des oiseaux sauvages au mercure et ses interactions éventuelles avec d'autres sources de stress en situation naturelle sur des paramètres physiologiques fondamentaux (fonctionnement mitochondrial). Il repose donc par essence sur la possibilité de prendre les mesures sur ces oiseaux nés et vivant en nature.

### 3.4.9. Origine des animaux tenus en captivité :

Les animaux destinés à être utilisés dans les procédures expérimentales sont-ils élevés à cette fin et proviennent-ils d'un établissement agréé (éleveurs, fournisseurs, utilisateurs) ?

Oui

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur agréés français fournissant tout ou partie des animaux du projet 0

Votre propre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? Non

Un autre établissement utilisateur fournit-il tout ou partie des animaux du projet ? Non

Etablissements éleveur occasionnel non agréés fournissant tout ou partie des animaux du projet

Nombre d'établissements éleveur occasionnel non agréés 0

fournissant tout ou partie des animaux du projet \_\_\_\_\_

## Etablissements éleveur ou fournisseur localisés dans des Etats membres autres que la France fournissant tout ou partie des animaux du projet

---

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés 0  
dans des Etats membres autres que la France  
fournissant tout ou partie des animaux du projet \_\_\_\_\_

## Etablissements éleveur ou fournisseur localisés dans des pays tiers fournissant tout ou partie des animaux du projet

---

Nombre d'établissements éleveur ou fournisseur localisés 0  
dans des pays tiers fournissant tout ou partie des  
animaux du projet \_\_\_\_\_

Les animaux sont-ils des animaux réutilisés d'un projet précédent? Non

## Animaux utilisés

---

3.4.10. Nombre estimé d'animaux utilisés dans le projet 750

Justification de ce nombre pour chacune des espèces animales utilisées

Les échanges de poussins entre nids se feront sur 60 nids (30 paires) chaque année pendant 3 ans maximum, chaque nid contenant entre 3 et 6 jeunes, le plus souvent 4 ou 5. Par an, cela représente donc 250 jeunes au maximum (moitié de jeunes déplacés et moitié laissés dans leur nid d'origine, soit 2 à 3 jeunes par traitement par nid), pour un total de 750 maximum sur les 3 ans. Si l'expérience est réalisée sur deux années seulement, il est probable que moins d'individus soient inclus au final. Voir rubrique Raffinement ci-dessus concernant le calcul de cette taille d'échantillon.

3.4.11. Indiquez à quels stades de développement les animaux seront utilisés et le justifier

L'objectif du projet est de décrire les effets de l'exposition chronique au mercure sur des paramètres physiologiques fondamentaux (fonctionnement mitochondrial) chez des individus en situation naturelle au cours de la croissance. Les individus inclus dans l'expérience seront donc des jeunes au nid, entre le jour 2 après l'éclosion (échanges partiels) et le jour 12 (mesures et prise de sang).

3.4.12. Indiquer le sexe des animaux et le justifier

Les individus inclus dans l'expérience seront de sexe inconnu (poussins en croissance, sexe non déterminable au jour 2 après l'éclosion chez cette espèce), mais devraient normalement se répartir équitablement entre mâles et femelles. Le sexe sera déterminé moléculairement en laboratoire après la phase de mesures sur le terrain pour inclure cette variable dans les analyses statistiques.

## 4. Procédures Expérimentales

---

### 4.2. Description des procédures

---

Nombre de procédures \_\_\_\_\_ 1

#### 4.2.1. Procédure n°1

---

Nom de la procédure \_\_\_\_\_

Adoption croisée de jeunes, suivi de la croissance et prise de sang

Proposition de classification de la procédure selon le degré de sévérité \_\_\_\_\_ Classe légère

#### Description détaillée de la procédure expérimentale

---

Pertinence et justification de la procédure expérimentale \_\_\_\_\_

Chaque jour, les nids pour lesquels l'éclosion a été observée au cours du suivi régulier des nids dans la population d'étude seront listés et le niveau d'exposition au mercure sur le territoire concerné sera comparé entre ces nids. Des paires de nids expérimentaux seront alors constituées en associant un nid situé dans un territoire peu exposé à un nid situé dans un territoire fortement exposé, en minimisant la distance entre nids lorsqu'il y a plusieurs possibilités. Des paires de nids de niveau d'exposition au mercure proches seront également incluses dans l'expérience comme témoin, en fonction des nids disponibles chaque jour.

Au jour 2 après l'éclosion, les nids sélectionnés pour l'expérience seront visités ; les jeunes seront pesés et rangés du plus grand au plus petit. La moitié des jeunes sera ensuite échangée au sein de chaque paire de façon à conserver une partie (la moitié) des jeunes dans leur nid d'origine et y associer une partie (l'autre moitié) des jeunes venant de l'autre nid de la paire. Les échanges se dérouleront de la façon suivante :

- Le premier nid de la paire sera visité afin de vérifier si les jeunes sont toujours présents et les compter, ce qui permettra d'ajuster si besoin (éviter de déplacer des poussins si le nid d'accueil a été prédaté, et ajuster le nombre de poussins déplacés si les tailles de nichées sont très différentes entre nids de la paire ; par exemple si un nid ne contient que 2 jeunes, on ne déplacera qu'un seul jeune de la nichée appariée). Les jeunes seront laissés sur place à cette première visite de contrôle.
- Le second nid de la paire sera ensuite visité, les jeunes seront alors sortis du nid (à mains nues, voir ci-dessous), ramenés sur la berge à proximité du nid, pesés et rangés par ordre décroissant de masse (pendant ce temps, l'entrée du nid est occultée par une feuille de papier journal pour éviter que les parents n'entrent dans le nid vide, ce qu'ils pourraient associer à un événement de prédation ou d'usurpation par un compétiteur, fréquemment observé dans cette population). Chaque jeune sera marqué individuellement, par ordre décroissant de masse, en retirant des touffes de duvet présentes sur la tête selon un code unique afin de pouvoir être identifié durant sa croissance, et permettant de garder trace de l'origine de chaque jeune après les échanges (ce marquage est lisible jusqu'au jour 12 après l'éclosion, à la dernière visite du nid). La moitié des jeunes sera alors prélevée et mise dans une boîte préalablement stérilisée et munie d'une chaufferette ; on prélèvera soit les jeunes de rang impair (1er, 3e et éventuellement 5e par ordre de masse) soit ceux de rang pair (2e, 4e et éventuellement 6e), en fonction du nombre de jeunes présents dans le premier nid de la paire (voir ci-dessus). Les jeunes restants seront remis immédiatement dans leur nid dont l'entrée sera alors réouverte.
- Les jeunes prélevés sont transportés jusqu'au premier nid de la paire, où la même opération de pesée et marquage sera réalisée sur la 2e nichée, dans une 2e boîte. On prélèvera de la même façon la moitié des jeunes de la 2e nichée (rang impair si les jeunes de rang impair ont été prélevés sur la 1ère nichée, rang pair sinon). La moitié des jeunes non prélevés seront alors remis dans leur nid d'origine avec les jeunes prélevés dans la 1ère nichée et transportés jusque-là.
- Les jeunes prélevés sur la 2e nichée seront alors transportés vers le second nid de la paire, et remis dans ce nid avec les jeunes qui n'auront pas été prélevés. Cette dernière visite clôt la procédure de déplacement des jeunes (correspondant donc à deux visites séquentielles pour chaque nid dans un délai d'environ 1 heure).

Le rang de prélèvement (pair ou impair) sera alterné entre paires de nids expérimentaux dans l'ordre de l'expérience (en vérifiant que les nids sur une même rivière ne soient pas tous dans le même groupe, soit pair soit impair, et en ajustant si besoin pour répartir les traitements dans le temps et dans l'espace).

Les nids expérimentaux seront ensuite visités selon le même planning que les autres nids dans le cadre du suivi de croissance des jeunes de la population :

- une première visite au jour 7, pour peser et baguer les jeunes, en établissant la correspondance avec le code individuel reçu au moment de l'échange, et permettant (1) de suivre la croissance de chaque jeune individuellement (trois pesées au total au cours de la croissance) et (2) de déterminer l'origine de chaque jeune (nid de départ). Les bagues (en aluminium) sont posées pour la durée de la vie des individus, dans le cadre du suivi à long terme de capture-recapture autorisé par le CRBPO (bagues fournies directement par le CRBPO) ; le baguage étant réalisé sur les jeunes dont le tarse est suffisamment développé (c'est-à-dire sur jeunes de masse > 20 g, voir ci-dessous) pour éviter la perte de la bague pendant la suite de la croissance au nid. Une prise de sang de quelques microlitres sera également réalisée afin de disposer d'ADN pour analyses génétiques ultérieures au laboratoire (sexage et détermination de paternité) ;
- une deuxième visite au jour 12, pour peser et mesurer les poussins, baguer éventuellement ceux qui n'auraient pas pu être bagués au jour 7 (voir points limites ci-dessous), et refaire une prise de sang pour l'analyse des paramètres de fonctionnement mitochondrial. La prise de sang sera réalisée à la veine métatarsienne, à l'aide d'aiguilles stériles à usage unique 27G 3/4", pour une quantité de 40 microlitres par jeune. Cette quantité correspond à environ 0.08 à 0.10 % de la masse corporelle d'un jeune de 12 jours en moyenne (entre 40 et 55 g à cet âge) ; prélever cette quantité relative de sang de façon ponctuelle est classiquement considéré comme non problématique chez la plupart des espèces d'oiseaux (Sheldon et al. 2008, *Journal of Avian Biology*, 39: 369-378), même si les données manquent dans la littérature concernant les prélèvements sur des jeunes en croissance, et que le volume sanguin n'est pas connu avec précision chez cette espèce. Nous resterons cependant très largement en dessous de la limite classiquement considérée comme acceptable chez les adultes (0.75 % de la masse corporelle).

Les prélèvements de sang seront gardés au frais dans une glacière portative pendant la journée et analysés une fois de retour au logement, où un laboratoire de terrain sera mis en place pour les mesures de fonctionnement mitochondrial, qui sont réalisées sur les globules rouges vivants. Les prélèvements seront donc analysés d'abord le jour même. Voir ci-dessus pour le détail des analyses réalisées sur les échantillons, d'abord le jour même (sur cellules vivantes) puis ultérieurement (après congélation des fractions d'échantillons restantes après les analyses le jour même), puis des analyses statistiques des données.

L'utilisation de gants lors de la manipulation des oiseaux (adultes ou jeunes) n'est pas spécifiquement recommandée par le CRBPO, instance responsable des opérations de baguage pour suivi de populations, du fait de la faible probabilité de transmission de maladies des espèces aviaires vers l'homme, et de l'absence

d'imprégnation par les odeurs, chez ces espèces de petits passereaux en milieu naturel. Néanmoins, les mains des opérateurs et le matériel (boîtes, sacs dans lesquels sont gardés les oiseaux avant et après les manipulations) sont régulièrement nettoyés et stérilisés (au gel hydroalcoolique et à l'alcool 70° / eau de javel respectivement) pour éviter les transmissions de pathogènes entre oiseaux.

Indiquez le nombre de lots et le nombre d'animaux par lot, et les justifier

---

3 lots maximum seront utilisés, soit 1 lot par année, correspondant aux jeunes des nids expérimentaux appariés : 60 nids par an, 4 à 5 jeunes par nid dans la majorité des cas, soit 250 individus par lot.

Les animaux ne seront utilisés que dans une seule procédure et une seule fois au cours de cette procédure, puisque les manipulations sont réalisées sur les jeunes pendant la phase de croissance. Il est possible de des jeunes expérimentaux une année deviennent les parents de jeunes qui seront inclus dans les expériences l'année suivante, mais ils ne seront pas manipulés directement à l'âge adulte en dehors des procédures mises en œuvre pour le suivi à long terme de la population (qui incluent une prise de sang annuelle, voir projet autorisé APAFIS#28729-2020121716192778 v4).

Le nombre d'individus inclus dans l'expérience pourra être revu à la baisse au bout de la deuxième année de manipulations, selon les résultats obtenus sur les deux premières années, en fonction de la taille d'effet effectivement observée. Dans ce cas, seuls 2 lots seront utilisés.

Indiquez pour chaque espèce les points limites adaptés, suffisamment prédictifs et précoces pour permettre de limiter la douleur à son minimum, sans remettre en cause les résultats du projet :

---

Les échanges de jeunes entre nids ne devraient pas occasionner de douleur physique directe, étant donné les précautions mises en œuvre (poussins gardés au chaud pendant le transport, et nourris si le temps de transport dépasse 30 min). La manipulation des jeunes elle-même est réalisée en routine au cours du suivi, en particulier pour vérifier les dates d'éclosion exactes à partir des pesées.

Néanmoins, une masse minimum (5 g) sera considérée en-dessous de laquelle un jeune ne sera pas inclus dans les échanges, sachant que l'intervalle de masse normalement observé au jour 2 est de 7 à 10 g. En dessous de cette masse, le jeune sera laissé dans son nid d'origine dans les conditions naturelles. Au cours du transport, l'état général des jeunes sera vérifié toutes les 10 min pour intervenir si besoin en rajoutant des chaufferettes supplémentaires si les jeunes semblent trop se refroidir ; un nourrissage supplémentaire peut également être prévu si les jeunes quémangent avec force.

Au moment du baguage (jour 7 après l'éclosion) et de la mesure (jour 12) des jeunes, des masses minimales sont considérées en-dessous desquelles :

- le baguage est retardé (jeunes de moins de 20 g, seuil déjà appliqué pour le suivi à long terme de la population ; intervalle normal de masse à cet âge : 25 à 35 g ; les poussins sont alors bagués au jour 12 s'ils sont encore vivants) ;
- la prise de sang sera réduite voire annulée (jeunes de moins de 30 g ; intervalle normal de masse à cet âge : 40 à 55 g).

A noter que les jeunes au baguage ou à la mesure ne montrent pas de signes de stress intense lors des manipulations comme cela peut arriver sur les adultes (hyperventilation, cris de détresse, plumes ébouriffées, bec ouvert...).

Indiquez le cas échéant le prélèvement, ainsi que la fréquence et le(s) volume(s) prélevés

---

Sur chaque jeune expérimental sera réalisé deux prélèvements de sang pendant la période au nid :

- au jour 7 après l'éclosion, une prise de sang de quelques microlitres est réalisée pour obtenir de l'ADN (les hématies des oiseaux étant nucléées), afin de pouvoir réaliser un sexage et déterminer la paternité moléculairement au laboratoire, post-terrain ;
- au jour 12 après éclosion, une prise de sang de 40 microlitres est réalisée pour l'analyse des paramètres mitochondriaux.

Bien que la seconde prise de sang puisse également permettre d'obtenir de l'ADN, la première sera maintenue car (1) une partie des jeunes peuvent naturellement mourir au cours du développement, et leur ADN ne sera dans ce cas pas disponible (les cadavres étant évacués du nid par les parents), et (2) le nid doit être visité dans tous les cas pour la pesée et le baguage dans le cadre du suivi à long terme, donc cette prise de sang n'occasionne pas de visite ni de dérangement supplémentaire au niveau du nid. La douleur reste limitée et la quantité très faible de sang prélevée à ce moment-là sont a priori très peu susceptibles de provoquer un effet négatif sur la croissance des jeunes (comme en témoigne l'absence d'effet constaté sur la survie et croissance au nid des jeunes au cours du suivi à long terme).

Indiquez le cas échéant les méthodes pour réduire ou supprimer la douleur, la souffrance et l'angoisse (liste des médicaments - anesthésiques, analgésiques, anti-inflammatoires...en précisant les doses, voies, durées et fréquences d'administration), y compris le raffinement des conditions d'hébergement, d'élevage et de soins :

---

La souffrance infligée est celle de l'introduction d'une aiguille sous la peau, le sang étant ensuite récupéré à la sortie de la peau par capillarité (prise de sang simple, par effraction cutanée). Une anesthésie n'est pas justifiée sur des espèces aussi petites en regard du niveau de douleur correspondant à l'introduction d'une aiguille. Il n'y aura donc pas d'anesthésie préalable au prélèvement simple de sang. Cette procédure est autorisée par le CRBPO pour les personnes détentrices d'un permis de baguage le stipulant (par dérogation ministérielle accordée au CRBPO).

Indiquez le cas échéant les dispositions prises en vue de réduire, d'éviter et d'atténuer toute forme de souffrance des animaux de la naissance à la mort :

---

La souffrance infligée est limitée au moment du prélèvement sanguin, et reste très ponctuelle.

Indiquez les raisons scientifiques justifiant l'absence d'anesthésie des animaux lorsqu'elle n'est pas compatible avec la finalité de la procédure :

---

Une anesthésie n'est pas justifiée sur des espèces aussi petites en regard du risque potentiel de mortalité induite par une anesthésie et du niveau de douleur limité correspondant à l'introduction d'une aiguille. Il n'y aura donc pas d'anesthésie préalable au prélèvement simple de sang.

## Devenir des animaux à la fin de cette procédure expérimentale

---

Animal gardé en vie \_\_\_\_\_ Oui

Précisez les animaux concernés

Tous les animaux expérimentaux

Précisez si la décision a été prise par le vétérinaire ou toute autre personne compétente désignée par le responsable du projet

Décision prise par le responsable du projet, dans le cadre du suivi à long terme de la population

## 5. Résumé au format européen

---

5.1. Intitulé du projet [Repris automatiquement du champ 1.2] \_\_\_\_\_ Influence du mercure sur le fonctionnement des mitochondries chez des oiseaux en milieu naturel et implications en écotoxicologie : séparation des effets de l'environnement précoce et de l'environnement de croissance

5.2. Durée du projet (en mois) [Repris automatiquement du champ 1.3] \_\_\_\_\_ 36

### 5.3. Mots-clés

---

Mot-clé n°1 \_\_\_\_\_ Fonctionnement mitochondrial

Mot-clé n°2 \_\_\_\_\_ Respiration cellulaire

Mot-clé n°3 \_\_\_\_\_ Ecotoxicologie

Mot-clé n°4 \_\_\_\_\_ Adoptions croisées de poussins

Mot-clé n°5 \_\_\_\_\_ Pollution chimique au mercure

### 5.4. Finalités du projet. Sélectionner dans la liste proposée la ou les finalités du projet.

---

#### Finalités du projet

---

Finalité n°1 du projet \_\_\_\_\_ PB10 Recherche fondamentale : Système endocrinien/métabolisme [PB10]

Finalité n°2 du projet \_\_\_\_\_ PB13 Recherche fondamentale : Autre recherche

## 5.5. Objectifs et bénéfices escomptés du projet

---

### 5.5.1. Décrire les objectifs du projet [Repris automatiquement du champ 3.3.2.1]

---

Les rivières sont des milieux sensibles à la pollution chimique car le ruissellement y concentre les polluants libérés dans l'environnement. Pourtant l'impact toxicologique de la pollution sur les organismes des rivières reste mal appréhendé. Chez les eucaryotes (dont les cellules possèdent des noyaux), les mitochondries sont responsables de la production d'énergie et sont ainsi au cœur des processus métaboliques. Par conséquent, on peut s'attendre à ce que les caractéristiques des mitochondries jouent un rôle majeur dans les réponses des individus aux variations de l'environnement, y compris la pollution. Les études de toxicologiques sur des cellules in vitro et des animaux de laboratoire ont clairement montré que de nombreux polluants perturbent les traits mitochondriaux. Pourtant, l'impact des polluants sur le fonctionnement des mitochondries dans les populations naturelles, et les conséquences de ces perturbations sur la croissance, la reproduction et la survie, restent des questions pratiquement inexplorées chez les vertébrés sauvages. Le projet vise à explorer ces questions lors de la croissance des jeunes chez une espèce d'oiseau vivant dans les rivières. On se focalisera ici sur le mercure car il s'agit d'un polluant dont les effets sur les traits mitochondriaux ont été clairement montrés sur des cellules en culture et des animaux de laboratoire. Dans les populations naturelles d'oiseaux, il est aussi associé à une réduction de la survie et/ou du succès reproducteur mais on ne sait pas quel est le rôle des traits mitochondriaux sur cette réduction. Ici, on cherche à comprendre l'origine de la variation des traits mitochondriaux entre les individus en séparant expérimentalement les effets des facteurs précoces (avant la naissance) de ceux des facteurs auxquels les jeunes sont soumis pendant la croissance, et en particulier la concentration en mercure. Dans une population suivie depuis 10 ans et où les niveaux de mercure à l'échelle de chaque territoire ont été mesurés au préalable, on réalisera des adoptions croisées partielles de jeunes juste après l'éclosion entre nids situés dans des territoires à forte et faible concentration de mercure. La croissance de ces jeunes sera ensuite suivie jusqu'à l'envol et leurs traits mitochondriaux mesurés à partir de cellules du sang (qui sont pourvues de mitochondries fonctionnelles chez les oiseaux).

### 5.5.2. Quels sont les bénéfices susceptibles de découler de ce projet ? [Repris automatiquement du champ 3.3.2.3]

---

Le projet vise tout d'abord à apporter des connaissances fondamentales concernant l'impact de la pollution au mercure sur les organismes en milieu naturel, donc en présence d'autres sources de stress potentielles (parasitisme, prédation, manque de nourriture, etc.), ce qui peut fortement changer les conclusions d'études réalisées in vitro ou en captivité. Pour ce faire, on s'intéresse à des paramètres fondamentaux du fonctionnement des cellules, ici la respiration mitochondriale. De façon générale, l'origine des variations des caractéristiques des mitochondries dans les populations naturelles reste largement inconnue, ce qui empêche de comprendre comment ces caractéristiques influencent la capacité des populations sauvages à adapter leur métabolisme aux changements environnementaux. Au bout des 3 années prévues, ce projet apportera plus spécifiquement des connaissances de base sur l'impact de la pollution chimique au mercure sur la variation des caractéristiques mitochondriales entre les individus dans la nature ; il informera aussi sur les conséquences de cette variation sur la croissance, la reproduction et la survie des oiseaux sauvages. Les réponses à ces questions sont essentielles à la fois pour les biologistes évolutifs, pour comprendre les mécanismes régissant les compromis entre reproduction et survie, et pour les biologistes de la conservation, pour comprendre ce qui rend certains individus, populations ou espèces plus vulnérables que d'autres à la pollution. De façon plus appliquée, le projet apportera également des informations clés pour comprendre l'impact de la pollution au mercure sur un organisme vivant dans les rivières dans la zone d'étude, et ces informations seront mises à disposition des partenaires institutionnels et associatifs locaux, leur permettant de cibler potentiellement des actions de restauration de la qualité de l'eau face à diverses sources de pollution. De telles actions sont en effet souvent d'une efficacité limitée à cause du manque d'information sur les variations dans l'espace et le temps des concentrations de ces polluants à une échelle spatiale fine et sur leurs effets biologiques à différents niveaux (individus, populations, écosystèmes). L'enjeu de ces restaurations est à la fois environnemental mais aussi sanitaire, car les activités humaines liées à l'eau sont nombreuses dans la zone d'étude (pêche, sports d'eau, baignade...).

## 5.6. Nuisances prévues

---

5.6.1. À quels types d'interventions les animaux seront-ils soumis (par exemple, prélèvements sur animaux vigiles, procédures chirurgicales) ? Indiquer leur nombre et leur durée.

---

Les individus inclus dans l'expérience seront soumis à trois interventions, uniques pour chaque animal et d'une durée limitée : 1 - au jour 2 après l'éclosion, la moitié des jeunes expérimentaux de chaque nid sera transportée entre le nid d'origine et le nid d'accueil ; ce transport est réalisé une seule fois, pour une durée de 30 min maximum pour chaque individu déplacé ; 2 - au jour 7 après l'éclosion, les jeunes de chaque nid expérimental seront pesés, bagués (pour reconnaissance individuelle tout au long de sa vie, dans le cadre du suivi à long terme de la population) et subiront une prise de sang très limitée (sur animaux vigiles) ; cette opération dure environ 10 à 15 minutes pour l'ensemble de la nichée, et elle est incluse dans le suivi à long terme de la population ; 3 - au jour 12 après l'éclosion, les jeunes de chaque nid expérimental seront à nouveau pesés, puis mesurés et une prise de sang sera effectuée pour les analyses du fonctionnement des mitochondries (sur animaux vigiles) ; cette opération dure environ 15 à 20 minutes pour l'ensemble de la nichée. Le dérangement induit par chaque visite au nid reste très limité dans le temps et ne devrait conduire à aucune désertion comme constaté dans le cadre du suivi à long terme de la population au cours duquel les nids sont visités régulièrement aux mêmes stades.

5.6.2. Quels sont les effets / ou effets indésirables prévus sur les animaux ? [Repris automatiquement du champ 3.3.2.4.]

Les effets indésirables potentiels sur les individus expérimentaux sont : 1 - un risque de refroidissement et/ou manque de nourriture pendant le transport des jeunes entre nids ; 2 - un impact négatif de la prise de sang sur la fin de croissance des jeunes ; 3 - une augmentation du risque de prédation du fait de visites supplémentaires aux nids ; 4 - une dissémination accrue des pathogènes ou parasites entre nids. Le risque d'abandon des nids pendant la phase de manipulation devrait rester nul car les nids ne sont jamais laissés vides au cours des échanges, gardant toujours au moins la moitié des poussins à tout moment. Une diminution du nombre de jeunes au nid peut arriver naturellement (mortalité pendant la croissance) et n'entraîne pas de désertion directe ; ici elle restera très courte. Au cours du suivi à long terme de la population, les nids sont régulièrement visités (pour compter les œufs, vérifier les éclosions, baguer les jeunes, etc.), et les jeunes retirés du nid temporairement pour être pesés. Or ces dérangements n'ont jamais occasionné de désertion directe évidente au cours des 10 années passées du suivi. Le risque d'abandon (ou infanticide) des jeunes suite à l'adoption devrait également rester nul car chez ces espèces de passereaux, les adultes ne reconnaissent pas leurs jeunes et ne sont pas sensibles aux odeurs que les humains peuvent laisser sur eux (nous manipulons régulièrement les jeunes pour le baguage et les mesures sans aucun abandon après le retour au nid ; l'odorat chez ces espèces est extrêmement peu développé). Des expériences d'adoption croisées sont réalisées de façon très fréquente depuis des dizaines d'années chez de multiples espèces d'oiseaux cavicoles, sans augmentation documentée de la mortalité des jeunes. La personne responsable du projet a elle-même conduit par le passé plusieurs expériences d'adoptions croisées chez d'autres espèces, lui conférant une grande expérience dans leur réalisation pratique et les précautions à respecter. Aucun effet à long terme de ces échanges de jeunes n'est attendu non plus sur la composition génétique de la population, puisque les mouvements de dispersion des individus ont déjà lieu naturellement entre rivières dans la zone d'étude et avec les rivières aux alentours.

### 5.7. Quelles espèces est-il prévu d'utiliser? Quels sont le degré de gravité des procédures et le nombre d'animaux prévus dans chaque catégorie de gravité (par espèce) ?

---

#### Espèce et nombre estimé d'animaux par degré de gravité (selon les codes indiqués en 3.4.2)

---

|             |  |
|-------------|--|
| Espèce      | A29 Autres oiseaux (autres Aves) [A29] |
| Sans réveil | 0                                      |
| Légère      | 750                                    |
| Modérée     | 0                                      |
| Sévère      | 0                                      |

### 5.8. Qu'advient-il des animaux maintenus en vie à la fin du projet ?

---

#### Espèce et nombre estimé d'animaux à réutiliser, à replacer dans leur habitat naturel ou dans un système d'élevage ou à proposer à l'adoption (selon les codes indiqués en 3.4.2)

---

|            |  |
|------------|--|
| Espèce     | A29 Autres oiseaux (autres Aves) [A29] |
| Réutilisés | 0                                      |
| Replacés   | 750                                    |
| Adoptés    | 0                                      |

### 5.9. Justifier le sort prévu de tous les animaux à l'issue de chaque procédure

---

Le projet vise à obtenir des données sur l'impact de l'exposition au mercure au cours de la croissance, et s'inscrit dans le cadre du suivi à long terme de la population étudiée. Ainsi, une fois le suivi de croissance des jeunes expérimentaux réalisé, les oiseaux sont laissés dans les nids où ils se trouvent et entreront ensuite dans la population d'étude s'ils survivent après l'envol jusqu'à l'âge adulte. Ils seront alors suivis à long terme, de la même façon que les individus non expérimentaux les années suivantes.

### 5.10. Application de la règle des «trois R»

---

1. Remplacement. [Repris automatiquement du champ 3.3.6.1]

---

L'objectif du projet est de décrire les effets de l'exposition chronique des oiseaux au mercure et ses interactions éventuelles avec d'autres sources de stress en situation naturelle sur des paramètres physiologiques fondamentaux (fonctionnement mitochondrial). Il repose donc par essence sur la possibilité de prendre les mesures sur ces oiseaux en nature. Il n'est donc pas possible de remplacer les animaux utilisés par d'autres types de modèles.

## 2. Réduction. [Repris automatiquement du champ 3.3.6.2]

---

Pour réduire le nombre d'individus inclus dans l'expérience au strict minimum, nous réaliserons des adoptions croisées partielles entre paires de nids, avec dans chaque nid expérimental une partie (la moitié) des jeunes originaires du nid en question et une partie venant de l'autre nid (jeunes adoptés). La comparaison des jeunes issus de nids différents mais élevés dans les mêmes conditions ou du même nid mais élevés dans des conditions différentes permet de tenir compte des autres effets à côté de l'exposition au mercure, comme la date dans la saison, le nombre de jeunes dans le nid, l'âge des parents, etc. Ce protocole permet ainsi de séparer les différents effets en minimisant le nombre de jeunes impliqués dans l'expérience. En 2024, nous avons pu mesurer les caractéristiques mitochondriales sur environ 100 jeunes au cours de leur croissance dans leur nid d'origine, c'est-à-dire hors expérience. Ces données préliminaires nous donnent un ordre de grandeur de l'effet attendu du mercure a priori et ainsi permettent de calibrer le nombre de jeunes nécessaire. Les résultats obtenus sur ces premières mesures donnent une différence entre territoires les plus et les moins exposés au mercure d'environ 7 %. Sur la base d'une telle différence, le nombre de jeunes à considérer dans l'expérience serait compris entre 450 et 750 jeunes au total. Sachant qu'en moyenne chaque nid expérimental contient 4 à 5 poussins, cela correspond à environ 90 à 180 nids expérimentaux. Des échanges entre 30 paires de nids, soit environ 240 à 250 jeunes, sont prévus sur une année. Cependant, parmi ces paires de nids possibles, les différences de niveaux de mercure seront plus ou moins fortes. Donc l'expérience est prévue sur 3 années, pour un total de 180 nids, soit autour de 750 jeunes, ce qui permettra d'avoir suffisamment de jeunes issus de territoires avec des niveaux d'exposition au mercure variables pour détecter leurs effets. La 3e année d'expérience ne sera réalisée que si le nombre de jeunes qui auront effectivement pu être échangés les 2 premières années n'est pas suffisant ; des analyses statistiques sur les données collectées les 2 premières années testeront si des effets peuvent être détectés, et si c'est le cas, l'expérience ne sera pas reconduite la 3e année.

## 3. Raffinement. [Repris automatiquement du champ 3.3.6.3]

---

Le projet vise à mesurer et comprendre l'impact de l'exposition au mercure sur des paramètres physiologiques fondamentaux en population naturelle. Pour ce faire, nous utiliserons la variabilité naturelle de l'exposition au mercure entre les différents territoires sur des rivières aux niveaux d'industrialisation passés différents, pour comparer des jeunes soumis à des concentrations de mercure différentes sans avoir à manipuler directement les doses de mercure. Les procédures expérimentales utilisées pendant la manipulation des oiseaux visent à réduire les impacts négatifs potentiels sur les individus : 1 - on utilisera des chauffeuses pour garder les jeunes au chaud pendant le transport ; ces chauffeuses sont déjà utilisées en routine lors du suivi à long terme de la population, en particulier lorsque la température extérieure est basse ; 2 - on nettoiera et désinfectera le matériel utilisé pendant le transport après chaque échange pour limiter la contamination par des parasites ou maladies entre nids ; 3 - on limitera le temps de transport des poussins entre nids à 30 min maximum, ce qui correspond à des temps de pause de nourrissage qui peuvent être observés naturellement. Si le temps de transport dépasse cette durée car il n'y a pas de nids à proximité l'un de l'autre qui peuvent être appariés, nous prévoirons un nourrissage artificiel pendant le transport en utilisant de la nourriture spécifique pour l'élevage d'oiseaux insectivores, enrichie en protéines et vitamines (pâtée d'élevage) ; 4 - on limitera la quantité de sang prélevée lors des mesures à une quantité largement (6 fois) inférieure au maximum préconisé, ce qui a déjà été réalisé sans effet négatif notable sur la survie jusqu'à l'envol ; 5 - on bloquera l'entrée des nids pendant le temps de manipulation des poussins à prélever pour empêcher les parents de trouver le nid vide ce qui pourrait entraîner une désertion ; 6 - on portera une attention particulière pendant l'approche des nids à ne pas toucher les supports (rochers, murs) autour afin d'éviter de laisser des traces odorantes qui pourraient attirer des prédateurs mammifères. Enfin on restera particulièrement vigilant aux procédures mises en oeuvre pour éviter tout impact négatif non prévu qui apparaîtrait, par exemple sur la survie des jeunes, et ajuster les opérations et manipulations afin de les éviter (temps de déplacement plus court, réduction de la durée des manipulations si besoin, etc.).

5.11. Expliquer le choix des espèces et les stades de développement y afférents. [Repris automatiquement des champs 3.4.3 et 3.4.11, dans la limite des 2500 premiers caractères]

---

Le cincle plongeur a été choisi comme espèce d'étude pour 4 raisons principales :

- (1) comme il s'agit d'un prédateur d'invertébrés aquatiques, il concentre les polluants qui transitent le long de la chaîne alimentaire dans son organisme, ce qui permet de les quantifier et de détecter leur impact sur le comportement, la survie, la reproduction dans une population naturelle ;
- (2) dans la zone d'étude, les rivières sont fortement variables dans les niveaux et type de pollution, en particulier des concentrations de mercure, permettant là encore de détecter des effets de ces polluants et de quantifier leur variation ;
- (3) la zone d'étude présente une densité de cincles élevée ce qui permet d'assurer suffisamment de nids expérimentaux pour obtenir une puissance statistique satisfaisante ;
- (4) enfin, bien que le cincle soit une espèce protégée, son statut de conservation en France est « préoccupation mineure » c'est-à-dire le statut le plus favorable (avec des populations stables).

L'objectif du projet est de décrire les effets de l'exposition chronique au mercure sur des paramètres physiologiques fondamentaux (fonctionnement mitochondrial) chez des oiseaux en population naturelle au cours de la croissance. Les oiseaux inclus dans l'expérience seront donc des jeunes au nid, entre le jour 2 après l'éclosion (échanges partiels) et le jour 12 (mesures et prise de sang), les jeunes quittant le nid vers le jour 21 ou 22.