



Bruit de trafic routier : implications comportementales et écophysiologiques chez la rainette verte *Hyla arborea*

Mathieu Troïanowski Troïanowski

► To cite this version:

Mathieu Troïanowski Troïanowski. Bruit de trafic routier : implications comportementales et écophysiologiques chez la rainette verte *Hyla arborea*. Ecologie, Environnement. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10213 . tel-01128163

HAL Id: tel-01128163

<https://theses.hal.science/tel-01128163>

Submitted on 9 Mar 2015

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

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

THÈSE DE L'UNIVERSITÉ DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITÉ LYON 1 - CLAUDE BERNARD

ET L'ÉCOLE DOCTORALE Évolution Écosystème Microbiologie Modélisation

Diplôme de Doctorat en Comportement/Écophysiologie

(arrêté du 7 Août 2006)

Soutenue publiquement le 29 octobre 2014

Par

Mathieu TROÏANOWSKI

**BRUIT DE TRAFIC ROUTIER : IMPLICATIONS COMPORTEMENTALES ET
ÉCOPHYSIOLOGIQUES CHEZ LA RAINETTE VERTE *HYLA ARBOREA*.**

Sous la direction de : Thierry LENGAGNE

Jury

M ^{me} Sandrine MEYLAN	Professeure, Université Paris Sorbonne-ESPE de Paris
M. Jean SECONDI	Maître de conférences, Université d'Angers
M. Rafael Márquez	Directeur de recherche, MNCN de Madrid
M. Dominique ALLAINÉ	Professeur, Université Lyon 1
M. Thierry LENGAGNE	Chargé de recherche CNRS, UMR5023, Lyon

Bruit de trafic routier : implications comportementales et écophysiologiques chez la rainette verte *Hyla arborea*

Le bruit engendré par le trafic routier est aujourd'hui une des nuisances sonores d'origine anthropique les plus importantes en milieu terrestre. Cette thèse, à l'interface entre comportement et écophysiologie, a eu pour but de déterminer expérimentalement les impacts d'une exposition à du bruit de trafic routier tant sur les systèmes de communication (acoustique et visuelle) que sur la physiologie (stress, immunité...) animale. Le choix de *Hyla arborea*, espèce utilisant à la fois des signaux acoustiques et colorés pour la communication, nous a permis de tester efficacement nos différentes hypothèses. Alors que chez de nombreuses espèces d'oiseaux des modifications du système de communication acoustique ont été observées (tant chez l'émetteur que le récepteur), mes travaux n'ont pas mis en évidence de telles perturbations chez *Hyla arborea*. Cependant, et pour la première fois, j'ai pu mettre en évidence un impact du bruit de trafic routier sur la communication visuelle, une exposition chronique à du bruit de trafic routier entraînant une perte de couleur chez les mâles. Enfin, des mesures physiologiques m'ont permis de montrer qu'une exposition chronique à du bruit de trafic routier est stressant (élévation du niveau de corticostérone) et a un effet immunosuppresseur (dû à l'augmentation du stress) chez *H. arborea*. Ainsi cette thèse démontre que le bruit de trafic routier peut avoir un impact plus large que ce qui était suggéré jusqu'à présent en impactant, en plus de la communication acoustique, la communication visuelle (signaux colorés) et la physiologie des animaux.

Mots clés : anoures ; bruit de trafic routier ; caroténoïdes ; communication ; corticostérone ; capacités immunitaires ; multimodalités.

Road traffic noise: behavioral and physiological impacts on the European treefrog *Hyla arborea*

Road traffic noise is undoubtedly the most important source of anthropogenic noise on terrestrial habitat. This thesis, at the interface between behaviour and physiology was designed to experimentally determine the impacts of road traffic noise exposure on both animal communication systems (acoustic and visual) and physiology (stress, immunity ...) The choice of *Hyla arborea*, species using both acoustic and coloured signals for communication, allowed us to efficiently test our various hypotheses. While in many bird species changes in acoustic communication system have been observed (in both the transmitter and receiver) my results do not show such disturbances in *H. arborea*. However, for the first time, I was able to highlight the impact of road traffic noise on visual communication, chronic exposure to traffic noise resulting in colouration loss in male. In addition, physiological measures have allowed me to show that road traffic noise exposure is stressful (corticosterone level rise) and has immunosuppressive effect (due stress rise) in *H. arborea*. Thus, this thesis demonstrates that road traffic noise may have a larger effect than previously thought by impacting, in addition to the acoustic communication, visual communication (impact on coloured signals) and animal physiology.

Keywords: anurans; carotenoids; communication; corticosterone; immune capacities; multimodality; road traffic noise.

« Beaucoup de travail, comme pour un album d'Astérix ! »
KingJu

Remerciements

Tout d'abord un grand merci à tous les membres du jury qui ont accepté de prendre de leur temps pour évaluer l'ensemble de ce travail. Un merci tout particulier à Sandrine Meylan, Jean Secondi et Rafael Marquez, rapporteurs de cette thèse.

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide et le soutien de nombreuses personnes et je tiens donc à remercier...

Thierry : un grand merci de m'avoir accueilli et encadré pour mes différents stages de Master et de m'avoir accordé ta confiance pour mener à bien ce projet de thèse. Merci pour ton encadrement tout au long de ces 5 années, tu auras toujours été disponible et de bons conseils que ce soit pour la mise en place des protocoles expérimentaux ou pour la rédaction des différents articles et de cette thèse.

Nathalie et Adeline : merci à vous pour votre aide inestimable sur toute la partie écophysiologie de ma thèse tant pour la mise en place des protocoles que pour l'analyse des résultats. Sans votre aide, toute cette partie de ma thèse n'aurait pas été réalisable.

Les membres de l'équipe : merci pour l'ambiance générale et pour les discussions que j'ai eues avec la plupart d'entre vous.

Loïc : merci à toi de m'avoir lancé dans l'aventure *rainettes* en me prenant en stage de M1. Merci aussi pour ton aide précieuse pour les analyses statistiques des différents jeux de données que j'ai eu à traiter. Merci encore de m'avoir fait découvrir le crou qui fut d'un grand soutien et une source d'inspiration pendant cette thèse. Ce fut un immense plaisir de travailler à tes côtés et de partager ton goût pour les bonnes choses. Plus qu'un collègue tu es devenu un de mes amis les plus proches.

Les multiples stagiaires : merci à tous les stagiaires que j'ai encadrés et dont l'assistance m'aura permis de mener à bien toutes les expériences de ma thèse. Merci donc à Perrine (Stagiaire number one), Camille, Aline, Jojo patate, Maïlys, Iris et Caroline.

L'association Acoucité : merci de m'avoir fourni les fichiers de bruit de trafic routier nécessaires au bon déroulement des mes expériences.

Les potes du labo (ancienne génération) : Karine, Cécile ainsi que les sieurs Wardziak, Prunier et Josserand. Merci pour les moments partagés tant au labo qu'en dehors, qui ont rendu cette thèse et les stages de Master plus faciles. Les barbecues, soirées « fromages, vins rouges, saucissons » et autres parties de Z m'auront offert des moments de détente inestimables au cours de cette thèse. Un grand merci à Rémy avec qui nous nous sommes bien pris la tête sur les modèles mixtes.

Les potes du labo (génération actuelle) : tout d'abord merci à mes co-bureau Alice et Julia pour leur bonne humeur qui rend l'ambiance bien plus sympa. Un merci particulier au sieur Gippet, présent depuis des années et qui aura été là lors de tous les événements importants depuis mon Master (je pense notamment à cette soirée mémorable après la soutenance à l'E2M2). Merci également à Clémentine, David, Natacha, Antonin et Ludo pour leur bonne humeur lors de tous ces repas mouvementés par de profonds débats et autres joyeusetés.

Le Beers : lieu privilégié de détente et de rigolade après le travail.

Ma famille : merci pour votre soutien tout au long de mes études et encore plus pour votre soutien durant ces années de thèse. Un grand merci à ma maman pour les nombreuses heures qu'elle aura passées à relire et corriger mes différents manuscrits depuis la licence.

Emilien (« mon amoureux ») : un grand merci à toi tout d'abord pour avoir rendu la formation « expérimentation animale » beaucoup plus marrante que prévue. Merci pour tous ces moments qui m'auront permis de me changer les idées, les trips photos, les longues discussions sur la théorie de l'évolution que nous avons eues une bière à la main, les 3 étoiles et demie que nous avons obtenues, pour m'avoir fait découvrir Hubert Bonisseur de La Bath sous un autre angle... La liste est longue donc un grand merci à toi.

Enfin, je garde le meilleur pour la fin...Un immense merci à ma chérie. Grâce à toi j'ai pu attaquer ma seconde année de thèse dans la sérénité. Merci pour ton soutien quotidien, pour ta bonne humeur et ton grain de folie qui m'ont permis d'avancer et de tenir le cap.

TABLE DES MATIÈRES

INTRODUCTION.....	8
I) Communication.....	8
1) Définition.....	8
2) Évolution	8
II) Le bruit : une contrainte bien étudiée en communication acoustique	10
1) Le bruit ambiant dans les écosystèmes naturels	11
2) Communiquer en milieu bruyant.....	12
III) Le bruit d'origine anthropique	14
1) Origines / Caractéristiques.....	14
2) Impacts médicaux et physiologiques	15
3) Impacts écologiques sur les communautés animales.....	17
4) Communiquer en milieu urbain	18
IV) Modèle d'étude	21
V) Hypothèses testées.....	25
VI) Liste des articles.....	25
RÉSULTATS	27
Article 1: Traffic noise affects colouration but not calls in the European treefrog (<i>Hyla arborea</i>). 27	
Le bruit de trafic routier rend-il les sopranos plus attirants ?.....	45
Article 2: Multimodality: a way to cope with road traffic noise? The case of European treefrog (<i>Hyla arborea</i>).	51
Article 3: Assessing immunocompetence in small size anuran species: the use of phytohaemagglutinin test with <i>Hyla arborea</i>	59
Article 4: Traffic noise: a stressful event that reduce immune capacity and colouration in the European treefrog <i>H.arborea</i>	76
Traffic noise: a stressful event that reduce immune capacity and colouration in the European treefrog <i>H.arborea</i>	78
DISCUSSION	100
I) Communication et bruit de trafic routier : adaptation à long terme ou plasticité ?	100
II) Conséquences de la pollution sonore sur les comportements liés à la reproduction.	103
III) Le bruit de trafic routier : une menace physiologique	106
IV) Des solutions pour limiter la pollution sonore.....	108
CONCLUSION	112
PERSPECTIVES.....	113

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	116
-----------------------------------	-----

INTRODUCTION

I) Communication

1) Définition

La communication, dans sa définition biologique, fait référence à toutes interactions entre un individu (l'émetteur) transmettant des informations à un autre individu (le récepteur) qui va utiliser ces informations pour prendre une décision (Shannon & Weaver, 1949 ; Marler, 1967 ; Otte, 1974). Certaines informations peuvent être transmises par inadvertance (par exemple le bruit des mouvements d'une proie indique sa position aux prédateurs, Wagner et al. 1997), un tel phénomène n'entre pas dans la définition de la communication. Les informations sont portées par des signaux (acoustiques, visuels, chimiques...) qui seront transmis au récepteur via un canal de transmission. Un signal est le produit de forces sélectives agissant sur : (1) le contenu informatif du signal, c'est-à-dire le message qu'il porte et qui induira une décision chez le récepteur, (2) l'efficacité du signal, c'est-à-dire la capacité du signal à voyager à travers le canal de transmission, mais aussi à être détecté, intégré et reconnu par le récepteur (Guilford & Dawkins, 1991 ; Endler, 1993). Ainsi, des pressions de sélections s'exercent sur les deux composantes des signaux afin d'optimiser la communication entre individus.

2) Évolution

Généralement, les pressions de sélections s'exerçant sur le contenu informatif du signal favorisent les signaux permettant de diminuer l'incertitude dans la décision prise par le récepteur, c'est-à-dire que le signal évolue de manière à ce que la réponse observée soit la plus proche possible de celle attendue (Guilford & Dawkins, 1991). En 1978, Dawkins & Krebs ont proposé que les signaux sont produits par l'émetteur dans le but de manipuler le comportement du récepteur afin d'en tirer des bénéfices. Dans ce cas, le signal évoluerait de manière à porter des informations « trompeuses » menant à une réponse potentiellement inadaptée pour le récepteur dont l'émetteur pourra tirer des bénéfices. Trois types de communications pourront alors être définis : les communications « manipulatrices »

bénéficiant uniquement à l'émetteur, les « altruistes » bénéficiant au récepteur et les « mutualistes » bénéficiant aux deux types d'individus (Figure 1).

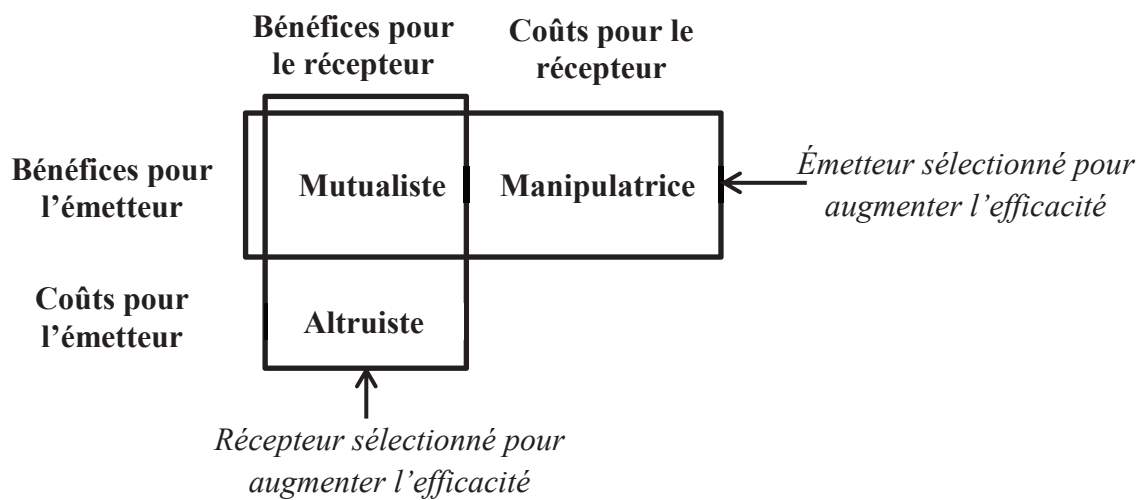


Figure 1. Types de communications en fonction des bénéfices et des coûts pour l'émetteur et le récepteur (d'après Wiley & Richards 1982).

Par exemple, le drongo brillant (*Dicrurus adsimilis*) imite les cris d'alerte des suricates (*Suricata suricatta*) afin de les faire fuir et de leur voler leurs proies (Flower, 2011). Inversement, du point de vue des récepteurs, la sélection favorisera les individus ignorant ces signaux portant des informations trompeuses ou tirant des bénéfices des signaux émis aux dépens de l'émetteur. Par exemple, lorsque le puceron des blés (*Sitobion avenae*) se fait attaquer par des parasites ou des prédateurs, il sécrète des phéromones qui n'augmentent pas ses propres chances de survies. Cependant, les pucerons aux alentours détectent ces phéromones et peuvent donc échapper au danger (Wu et al. 2010). Enfin, les signaux émis peuvent être bénéfiques pour l'émetteur et le récepteur. Cela est par exemple le cas de l'aposématisme (usage par l'émetteur de signaux d'avertissement pour annoncer leur nocivité) qui va permettre aux prédateurs d'éviter les proies nocives et à l'émetteur de ne pas être mangé (Mappes et al. 2005).

Concernant l'« efficacité » du signal, les pressions de sélections vont, d'une part, favoriser les signaux dont la propagation à travers le canal de transmission se fait avec un minimum de perte et de dégradation de l'information. Par exemple, à partir de l'écoute de chants provenant d'espèces d'oiseaux de milieux ouverts et de milieux forestiers, Chapuis (1971) a émis l'hypothèse que le chant des oiseaux avait évolué vers des fréquences plus graves en forêt afin d'être transmis de manière efficace à travers le feuillage. En effet, dans

des habitats fermés les surfaces de réverbérations et d'absorptions sont plus importantes qu'en milieu ouvert et atténuent de manière importante la propagation des sons à hautes fréquences (Chapuis, 1971 ; Marten & Marler, 1977 ; Wiley & Richards, 1978 ; Brown & Handford, 2000). D'autre part, l'évolution va conduire à sélectionner les signaux qui seront les mieux détectés, intégrés et reconnus par le récepteur ciblé. Après avoir été transmis à travers l'environnement, le signal doit être perçu, intégré et reconnu par le récepteur. Pour cela, les signaux ont été sélectionnés de manière (i) à émerger du bruit de fond (le bruit faisant ici référence à toutes perturbations gênant la perception des signaux dans le canal sensoriel utilisé pour la communication), (ii) à être adapté aux organes sensoriels du récepteur ciblé et (iii) à être mémorisé facilement par ce dernier (Wiley & Richards, 1982 ; Guilford & Dawkins, 1991 ; Endler, 1992 ; 1993). Ainsi, il a été montré que certains signaux colorés émis ont évolué de manière à être perçus par le système sensoriel des récepteurs visés (Endler, 1991). Certains signaux aposématiques, quant à eux, présentent des colorations facilement mémorisables par les prédateurs qui vont alors rapidement identifier les proies toxiques à éviter (Guilford, 1990 ; Alatalo & Mappes, 1996). Cependant, un certain nombre de facteurs (bruits) peuvent perturber la communication établie dans un environnement donné. Au sens large, le bruit est défini comme tout facteur impactant la détection et la discrimination d'un signal par le récepteur. Ces bruits peuvent être présents au niveau (1) de l'émission du signal si le codage de l'information est imparfait (par exemple la dysarthrie chez l'être humain impacte l'articulation et donc l'émission du signal ; McAuliffe et al. 2013) ; (2) du canal de transmission si des perturbations physico-chimiques interviennent dans le canal sensoriel utilisé (par exemple la turbidité de l'eau impacte la communication visuelle chez les poissons ; Heuschele et al. 2009) ; (3) du décodage de l'information qui va dépendre des conditions psycho-physiologiques de l'individu (par exemple le stress altère la perception des informations ; Schulz et al. 2013).

II) Le bruit : une contrainte bien étudiée en communication acoustique

Alors que le bruit est un concept s'appliquant à tous les types de communications, au sens courant, le bruit est défini comme toute nuisance sonore interférant lors de la transmission du signal d'un émetteur vers un récepteur en communication acoustique (Brumm & Slabbekoorn, 2005). Le bruit de fond, en diminuant le ratio signal/bruit (émergence du signal par rapport au bruit) et, par conséquent, la portée des signaux (Bradbury &

Vehrencamp, 1998 ; Brumm & Slabbekoorn, 2005), représente une pression de sélection importante et a participé à façonner les systèmes de communication. Si les caractéristiques fréquentielles du bruit correspondent à celles du signal, le masquage acoustique sera important et par conséquent la détection du signal sera réduite (Capranica & Moffat, 1983 ; Lorh et al. 2003).

Dans de très nombreux habitats, les populations animales font face à de hauts niveaux de bruit dont les caractéristiques sonores sont variables (Ellinger & Hödl, 2003 ; Lugli & Fine, 2003 ; Slabbekoorn & Peet, 2003 ; Slabbekoorn, 2004) (Figure 2). Les sources de bruit sont nombreuses et peuvent être tant abiotiques que biotiques.

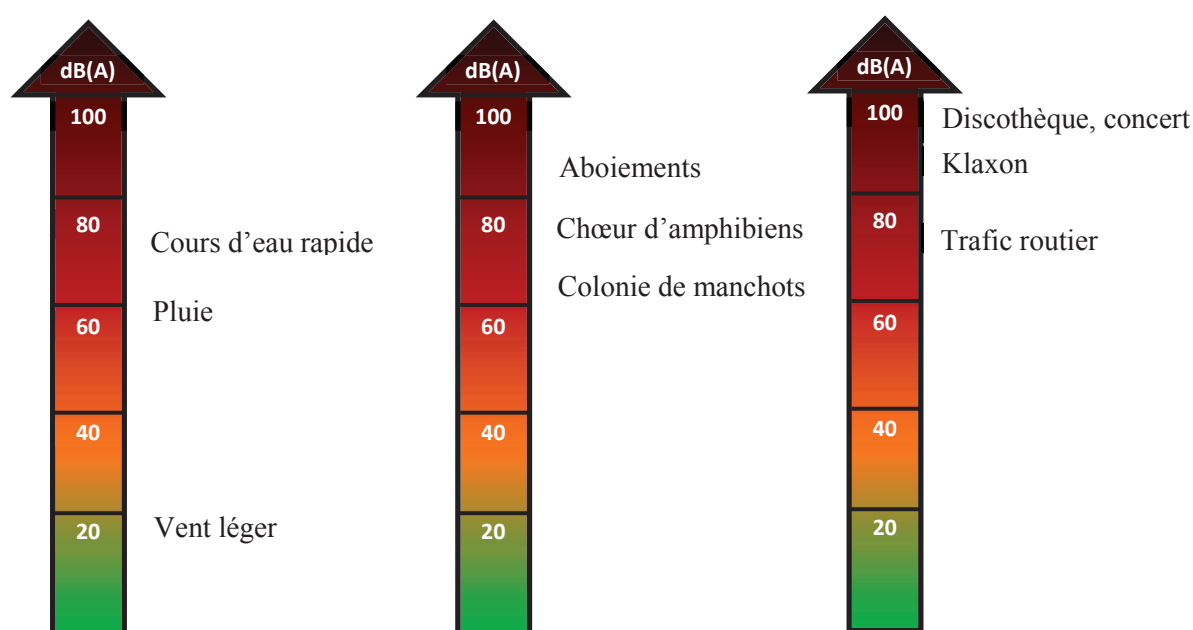


Figure 2. Comparaison du niveau de bruit de différentes sources naturelles et anthropiques.

1) Le bruit ambiant dans les écosystèmes naturels

En milieu terrestre, les principales sources de bruit abiotique naturelles sont le bruit du vent passant dans les végétaux (Ellinger & Hodl, 2003), le bruit de la pluie (Lengagne & Slater, 2002) ou encore le bruit des cours d'eau (Brumm & Slater, 2006). Ces nuisances sonores plus ou moins continues (Ryan & Brenowitz, 1985) sont caractérisées par leurs basses fréquences généralement comprises entre 0 et 5kHz (Luther & Gentry, 2013). Ces gammes de fréquences recouvrent les signaux acoustiques utilisés par près de 94 % des oiseaux, amphibiens et mammifères européens et peuvent donc être une source importante d'interférences acoustiques pour les espèces terrestres (Luther & Gentry, 2013). Les nuisances

sonores biotiques, quant à elles, peuvent résulter des signaux émis par des individus conspécifiques et/ou hétérospécifiques. Dans le premier cas, les individus de la même espèce vont communiquer au même moment de la journée et dans des bandes de fréquences similaires, le bruit représente alors une très forte contrainte. Par exemple, communiquer au sein d'une colonie de plusieurs milliers d'oiseaux représente une tâche difficile pour le récepteur qui doit détecter et discriminer le signal d'intérêt (Jouventin et al. 1999 ; Lengagne et al. 1999 a, b). Dans le second cas, l'activité des individus hétérospécifiques peut être différente au niveau du timing mais aussi au niveau des caractéristiques fréquentielles du chant. La contrainte va donc s'effectuer au niveau des espèces afin qu'elles puissent se différencier les unes des autres par leurs activités et caractéristiques de chant. Les caractéristiques acoustiques de la nuisance sonore seront ainsi différentes en présence d'un chœur d'insectes, d'oiseaux ou d'amphibiens. Par exemple, un chœur d'orthoptère engendre un bruit de fond supérieur à 14 kHz (Berg & Greenfield, 2005), les espèces voisines émettant des signaux à hautes fréquences subiront donc un fort recouvrement tandis que les espèces émettant des signaux à basses fréquences ne subiront pas de gêne pour communiquer.

2) Communiquer en milieu bruyant

En milieu bruyant, l'évolution a sélectionné les signaux dont la structure permet de limiter le recouvrement fréquentiel avec le bruit de fond (Ryan & Brenowitz, 1985 ; Waser & Brown, 1986 ; Slabbekoorn & Smith, 2002). Ainsi, les animaux émettent des vocalisations dont la fréquence dominante coïncide avec les zones du spectre fréquentiel du bruit les moins fortes (« fenêtre silencieuse », Brumm et Slabbekoorn, 2005). Par exemple, aux abords des cours d'eau, source de bruit continue et à basses fréquences, des évolutions de la fréquence du chant chez les anoues ont été observées (Boeckle et al. 2009 ; Vargas-Salinas & Amézquita, 2014). En effet, Boeckle et al. (2009) ont montré que chez *Staurois latopalmatus* (rock-skipper frog) les individus émettent des chants à plus de 5 kHz, fréquences bien plus aiguës que ce que leur taille pouvait laisser penser.

De plus, en milieu bruyant, l'utilisation de plusieurs canaux sensoriels permet de maintenir une communication efficace. Chez de très nombreuses espèces, la communication est multimodale, c'est-à-dire faisant intervenir des signaux dans plusieurs canaux sensoriels. Ces signaux peuvent transmettre la même information (signaux redondants), des informations différentes (signaux complémentaires) ou ne transmettre aucune information (signaux de facilitation) (Partan & Marler, 1999 ; Rowe, 1999 ; Candolin, 2003). Il a ainsi été suggéré que

la présence de bruit de fond pourrait être à l'origine de l'utilisation de nouveaux canaux sensoriels pour communiquer. En effet, bien que ne transmettant aucune information, les signaux de facilitation ont été sélectionnés afin d'attirer l'attention du récepteur permettant ainsi une meilleure détection et une meilleure discrimination du signal d'intérêt en milieu bruyant (Rowe, 1999 ; Hebets & Papaj, 2005). De même, les signaux redondants permettent aux récepteurs de continuer à percevoir les informations d'intérêts même en conditions bruyantes (Candolin, 2003 ; Partan & Marler, 2005). La présence continue de bruit de fond serait même à l'origine d'une utilisation préférentielle des signaux visuels chez certaines espèces d'anoues du genre *Staurois* (Grafe & Wanger, 2007 ; Grafe et al. 2012 ; Preininger et al. 2013). Chez ces anoues qui vivent aux abords de cours d'eau et qui sont donc soumis à un fort niveau de bruit constant, il a été montré que les signaux acoustiques sont émis environ $\frac{1}{2}$ seconde avant les signaux visuels. Il a ainsi été suggéré que chez ces espèces, les signaux acoustiques servent à alerter le récepteur afin que ce dernier prête attention au signal visuel suivant (Grafe et al. 2012).

Cependant, les conditions environnementales sont rarement stables au cours de la vie d'un individu. En effet, certains événements aléatoires peuvent survenir et impacter l'efficacité de la communication établie. Il est donc nécessaire que les individus faisant face à ces événements aléatoires soient capables de répondre rapidement et de manières appropriées afin de maintenir une communication efficace. Pour cela, ces individus devront présenter une plasticité phénotypique (capacité d'un génotype à exprimer différents phénotypes en réponses à différentes conditions environnementales ; Ghalambor et al. 2007) suffisante pour modifier leurs signaux et adapter leurs comportements (Proppe et al. 2012). Par exemple, selon la théorie mathématique de la communication (Shannon & Weaver, 1949), le volume d'informations V contenues dans un signal peut être défini comme $V = FT\gamma$, avec F la fréquence en Hz, T la durée du signal en secondes et $\gamma = \log_2 (1+S/N)$, S/N représentant le ratio signal/bruit. Si le phénomène de masquage limite un ou plusieurs paramètre(s) acoustique(s) dans la transmission d'informations, les animaux peuvent alors maintenir le volume d'information du signal en augmentant les valeurs d'un ou de plusieurs autre(s) paramètre(s). Lors d'événements bruyants, certains animaux vont donc augmenter la redondance de leurs signaux acoustiques en les répétant un nombre de fois plus important qu'en condition silencieuse (Lengagne et al. 1999a ; Brumm & Slater, 2006 ; Luther & Gentry, 2013) alors que d'autres vont augmenter l'amplitude de leurs signaux (Cynx et al. 1998 ; Brumm & Todt, 2004). De plus, il est maintenant bien établi que les systèmes de communication sont principalement multimodaux, c'est-à-dire que la communication entre

individus fait intervenir plusieurs canaux sensoriels (Partan & Marler, 1999 ; Candolin, 2003 ; Partan & Marler, 2005). Ainsi, lorsqu'un nouvel événement perturbe un canal sensoriel, il est possible pour les animaux d'accorder plus d'importance aux signaux émis dans un canal sensoriel non perturbé afin de maintenir une communication efficace (« shift multimodal » : Taylor et al. 2005; Heuschele et al. 2009 ; Partan et al. 2010 ; Wilgers & Hebets, 2011). Par exemple, certaines espèces d'épinoches utilisent plus les signaux visuels qu'olfactifs en eaux claires mais vont présenter des préférences inversées en eaux turbides, les molécules olfactives étant alors plus facilement détectables que les signaux colorés (Heuschele et al. 2009).

III) Le bruit d'origine anthropique

1) Origines / Caractéristiques

Au cours des dernières décennies, les activités humaines ont entraîné une forte anthropisation des milieux naturels. Plus particulièrement, le développement industriel et l'augmentation des échanges commerciaux ont entraîné une augmentation extrêmement importante du réseau routier ainsi que du trafic à travers le monde. Le développement des réseaux routiers a eu de nombreux impacts écologiques tels que l'augmentation de la pollution chimique dans les zones environnantes, un accroissement de la fragmentation du paysage ou encore une forte mortalité d'animaux par collisions avec les véhicules (Fahrig et al. 1995 ; Forman & Alexander, 1998 ; Spellerberg, 1998). De plus, les réseaux routiers représentent la source de nuisance sonore anthropique la plus importante en milieu terrestre tant spatialement que temporellement (Forman, 2000 ; Jamrah et al. 2006 ; Pirrera et al. 2011). Ainsi, Forman (2000) a estimé que 22 % du territoire des États-Unis était affecté par les pollutions sonores issues des réseaux routiers. Le bruit de trafic routier se caractérise généralement par de basses fréquences (inférieures à 3 kHz ; Warren et al. 2006 ; Wood & Yezerinac, 2006) et par un niveau sonore élevé (Pohl et al. 2009). Ce bruit provient, d'une part, du bruit émis par les moteurs en marche, mais aussi du bruit de roulement dû au contact « pneu-chaussée ». Ainsi, les caractéristiques acoustiques du bruit de trafic routier vont être dépendantes du nombre et du type de véhicules circulant (une forte proportion de véhicules lourds produisant du bruit de plus basses fréquences), de la vitesse de circulation (une augmentation de la vitesse entraînant une augmentation du volume sonore ; Mun et al. 2007) mais aussi du revêtement

des routes (une diminution de la taille des granulats composant le revêtement entraînant une diminution du volume sonore ; Liao et al. 2014 ; Bennert et al. 2005).

2) Impacts médicaux et physiologiques

Dès les années 1950, les scientifiques se sont intéressés à l'impact de l'augmentation des nuisances sonores d'origines anthropiques (bruit d'usine principalement) sur la santé humaine (Meyer, 1953 ; Carmichael, 1955 ; Glorig & Summerfield, 1958). À cette époque, des enquêtes menées auprès d'ouvriers travaillant dans des milieux bruyants ont révélé qu'une exposition à de forts niveaux de bruits peut entraîner une perte temporaire voire définitive de l'audition (Wheeler, 1950 ; Yaffe, 1954 ; Tolhurst, 1956 ; Daniel 2007). À l'heure actuelle, le bruit de trafic routier est le bruit d'origine anthropique le plus répandu à travers le monde et de plus en plus de citoyens vivent en ville et sont donc exposés à de hauts niveaux de bruits. Ainsi, de nombreuses études ont spécifiquement porté sur l'impact d'une exposition prolongée à cette nuisance sonore chez l'homme. Outre des études sur les pertes d'audition (Ingle et al. 2005 ; Barbosa & Cardoso, 2005), de très nombreuses études se sont intéressées à l'impact du bruit de trafic routier sur le bien-être humain (sommeil, humeur, attention...) ainsi que sur la santé humaine (stress, hypertension...) Dès les années 1960, il est établi qu'une exposition au bruit de trafic routier perturbe fortement le sommeil (Schieber & Mery, 1967; Schieber & Mery, 1968), les individus soumis à du bruit ont un sommeil de moins bonne qualité (Griefahn et al. 2006 ; Skanberg & Ohrstrom, 2006 ; Jakovljevic et al. 2006 ; Pirrera et al. 2010 ; Halonen et al. 2012). En effet, dans des zones calmes, seuls 7 % des sujets étudiés éprouvent des troubles du sommeil (difficultés pour s'endormir et se rendormir durant la nuit, réveils multiples, difficultés pour se lever le matin) alors que ce chiffre s'élève à 35 % en zones perturbées par du bruit de trafic routier (Skanberg & Ohrstrom, 2006). De tels troubles du sommeil ont pour conséquences des sujets fatigués, ayant du mal à se concentrer et irascibles (Ohrstrom et al. 2006 ; Jakovljevic et al. 2009). De plus, le bruit de trafic routier peut être source de stress. Une augmentation d'hormones de stress et du rythme cardiaque est observée chez les individus exposés à cette nuisance sonore (Deinzer et al. 1994 ; Prasher, 1998 ; Babisch et al. 2001). Par exemple, dès 1980, Ising et al. montrent que des personnes travaillant dans des zones perturbées par du bruit de trafic routier présentent un fort taux d'adrénaline pouvant entraîner une pression sanguine plus importante, une hypertension et un plus haut taux de cholestérol (Babisch et al. 1990 ; Babisch et al. 1993 ; de Kluizenaar et al. 2007). De tels symptômes étant sources de risques accrus d'infarctus du myocarde, un grand

nombre d'études a porté sur les risques encourus par des individus vivant en zone bruyante (Babisch et al. 1999 ; Grazuleviciene et al. 2005 ; Babisch et al. 2005 ; Babisch 2008 ; Selander et al. 2009). Ainsi, dans sa méta-analyse, Babisch (2008) estime que des individus vivant près de routes émettant plus de 60 dB(A) de bruit sont plus sujets à des infarctus contrairement aux individus vivant près de route émettant moins de 60 dB(A) de bruit.

Alors que les conséquences d'une exposition aux bruits de toutes origines sur la santé humaine sont largement étudiées et connues et que des législations régulent les niveaux de bruits maximums autorisés en zones habitables, les connaissances sur les conséquences d'une exposition au bruit sur la santé animale restent très parcellaires. Des études menées sur des animaux de laboratoires et domestiques nous permettent tout de même d'avoir certaines connaissances sur les impacts que peuvent avoir des expositions prolongées à des hauts niveaux de différents bruits. Ainsi, de nombreux effets similaires à ceux observés chez l'être humain ont été mis en évidence. Il a été montré qu'une exposition prolongée à des hauts niveaux de bruits entraîne une perte auditive (Dunn et al. 1991 ; Chang & Merzenich, 2003 ; Hu & Zheng, 2008). Dans leur étude, Dunn et al. (1991) ont exposé des chinchillas à du bruit blanc à 110 dB 4 heures par jour pendant 5 jours. Après cette période, les auteurs ont observé une diminution des performances auditives, le seuil de détection d'un stimulus acoustique augmentant de 30 dB environ (29.35 dB avant l'exposition au bruit, 59.00 dB après). De plus, des effets négatifs sur la santé cardiaque (Soldani et al. 1997 ; Lenzi et al. 2003) ainsi que sur le stress (DeBoer et al. 1989 ; Chloupek et al. 2009 ; Jensen et al. 2010) ont été relevés. Une augmentation du niveau de stress ayant un effet immunosuppresseur (Martin et al. 2005 ; Berger et al. 2005), certains auteurs se sont intéressés à l'impact que pourrait avoir le bruit sur le système immunitaire des animaux (Van Raaij et al. 1996 ; Zheng & Ariizumi, 2007 ; Kight & Swaddle, 2011). Zheng et Ariizumi (2007) ont observé qu'une exposition à du bruit blanc (90 dB) 5 heures par jour pendant 4 semaines entraîne une diminution de la prolifération de lymphocytes et des anticorps et ont ainsi démontré l'effet immunosuppresseur que peut avoir une longue exposition à de hauts niveaux de bruits. Si ces expérimentations ont permis d'élargir nos connaissances sur les conséquences que peut avoir une exposition prolongée à du bruit sur la santé des animaux de laboratoires et domestiques, nos connaissances concernant spécifiquement les conséquences du bruit de trafic routier sur la faune sauvage restent cependant très limitées malgré l'importance de cette nuisance sonore pour les populations animales à travers le monde. En effet, seules deux études ont déterminé expérimentalement les effets physiologiques que pouvait avoir une exposition chronique à du bruit de trafic routier chez des espèces animales sauvages. Blickley et al. (2012a) ont exposé

expérimentalement des populations de tétras des armoises (*Centrocerus urophasianus*) à du bruit de trafic routier (51.7 ± 0.8 dBA) pendant environ deux mois et demi. Par la suite, les auteurs ont mesuré et comparé les niveaux de corticostérone (hormone de stress prédominante chez les oiseaux) présents dans les fèces des animaux. Les individus soumis au bruit de trafic routier présentent un niveau de corticostérone 16,7 % plus haut que les individus non soumis au bruit. Dans une seconde étude, Crino et al. (2013) ont exposé des bruants à couronne blanche des montagnes (*Zonotrichia leucophrys oriantha*) à du bruit de trafic routier (60 dBA) pendant 5 jours. Après ces 5 jours de traitement, les auteurs ont mesuré le niveau de stress des oisillons ainsi que leurs capacités immunitaires mais n'ont pas mis en évidence d'impacts négatifs du bruit de trafic routier sur ces variables. Les conséquences d'une exposition chronique à du bruit de trafic routier sur la faune sauvage sont donc peu connues et se limitent à deux espèces d'oiseaux. À l'heure actuelle, nos connaissances ne nous permettent donc pas d'estimer précisément les impacts physiologiques du bruit de trafic routier sur la faune sauvage.

3) Impacts écologiques sur les communautés animales

En 1994, Reijnen & Foppen ont montré que la densité de pouillot fitis (*Phylloscopus trochilus*) était moins importante dans les 200 mètres adjacents à la route comparée à la densité d'oiseaux présents dans le même habitat mais plus éloigné de la route. Ils imputent alors une telle diminution de densité à la présence de bruit de trafic routier. Par la suite, les mêmes auteurs (Reijnen et al. 1995) ont étudié les densités d'oiseaux de 43 espèces aux abords des routes et ont mis en évidence une diminution de la densité pour 26 d'entre elles. Par des modèles statistiques, les auteurs déterminent que le facteur expliquant le mieux cette baisse de densité est le bruit de trafic routier. Cependant, les réseaux routiers ont de nombreux impacts écologiques négatifs confondants (pollution chimique, mortalité par collision, pollution visuelle, pollution sonore...) qui pourraient impacter les populations étudiées. Il semble dès lors difficile d'affirmer que les diminutions de densité d'oiseaux observées dans de nombreuses études (Reijnen & Foppen, 1994 ; Reijnen et al. 1995, 1996 ; Forman et al. 2002; Rheindt, 2003 ; Peris & Pescador, 2004 ; Parris & Schneider, 2009) sont réellement dues à une augmentation du bruit de trafic routier. Pourtant, plusieurs indices peuvent permettre d'appuyer une telle hypothèse. Tout d'abord, en fonction des espèces, des baisses de densité ont été observées jusqu'à plus de 2000 mètres de la route (Reijnen et al. 1995, 1996). Le bruit de trafic routier semble, dans ce cas, être le seul impact écologique dû au

trafic routier ayant une portée suffisante et pouvant expliquer une diminution de densité sur de telles distances. En effet, alors que la pollution chimique ou la pollution visuelle ne portent que sur quelques dizaines (voire centaines) de mètres (Forman & Alexander, 1998), le bruit provenant du trafic routier reste audible à plus de 2000 mètres (Barber et al. 2010). De plus, récemment, Blickley et al. (2012b) ont montré expérimentalement qu'une élévation du bruit de trafic routier dans un milieu naturel non exposé entraînait une diminution de l'abondance de tétras des armoises (*Centrocercus urophasianus*) de 73 %.

Bien qu'il n'existe que très peu de preuves expérimentales à l'heure actuelle pour confirmer que le bruit de trafic routier est une cause importante du déclin de certaines espèces d'oiseaux sauvages à proximité des routes, les indices soulevés ici permettent de suggérer fortement que le bruit a bel et bien un impact important sur les communautés animales de par son effet masquant. Dans les zones fortement perturbées par le bruit de trafic routier, il semble dès lors indispensable pour les espèces sauvages de trouver des solutions pour maintenir une communication efficace (Rabin & Greene, 2002).

4) Communiquer en milieu urbain

Certaines espèces animales que l'on appelle des « exploiters urbains » (Mc Kinney, 2006) ont particulièrement bien réussi à se développer dans les milieux urbains malgré les fortes perturbations liées à la présence humaine (Lowry et al. 2013). Chez ces exploiters urbains, un grand nombre de changements comportementaux a pu être observé en comparaison avec leurs congénères vivant en milieu rural. Certaines espèces ont, par exemple, su adapter leur régime alimentaire ou ont développé une plus forte tolérance à la présence humaine (Smith & Carlile, 1993 ; Estes et al. 2003 ; Partecke et al. 2006 ; Moller, 2008).

Vivre en milieu urbain, de par la présence de hauts niveaux de bruit de trafic routier, implique de fortes contraintes acoustiques. Bee et Swanson (2007) et Pohl et al. (2009) ont en effet montré que le bruit de trafic routier entraîne une augmentation du seuil de détection des signaux de l'ordre de 20 dB. Face à ces contraintes, des modifications dans les activités de chant ont été observées chez de nombreuses espèces (Laiolo, 2010 ; Lowry et al. 2012 ; Slabbekoorn, 2013). En effet, comme annoncé par la théorie mathématique de la communication, un individu peut maintenir une communication efficace en milieu bruyant en augmentant la fréquence (permet de limiter le recouvrement fréquentiel), la durée (augmente la redondance du signal) ou l'amplitude (permettant d'augmenter le ratio signal/bruit) de son signal. Slabbekoorn & Peet (2003) furent ainsi les premiers à étudier et à mettre en évidence

des modifications de la structure des chants chez une espèce présente en milieu urbain : la mésange charbonnière (*Parus major*). Dans cette étude corrélatrice, les auteurs mesurent les caractéristiques des chants d'individus vivant dans des zones présentant différents niveaux de bruit de trafic routier et montrent que plus le niveau de bruit augmente plus les individus émettent des chants avec une fréquence minimale élevée. Les résultats obtenus par Slabbekoorn & Peet ont été par la suite largement confirmés. En effet, de nombreuses études corrélatives à travers le monde ont montré que les espèces présentes en milieux urbains ou en milieux perturbés par le bruit de trafic routier émettent des chants plus aigus que les individus vivant en milieux non perturbés (tableau 1). Cette augmentation de la fréquence des vocalisations permet une communication plus efficace en présence de bruit de trafic routier. En effet, ce dernier se caractérise par de basses fréquences, ainsi, les animaux décalant la fréquence de leurs signaux vers de plus hautes fréquences seraient moins impactés (Rheindt, 2003 ; Goodwin & Shriver, 2011 ; Herrera-Montes & Aide, 2011 ; Francis et al. 2011a). Par exemple, en 2003 Rheindt a mis en évidence que les espèces ayant des chants aigus ne montrent pas de diminution de densité aux abords des routes contrairement aux espèces émettant des chants graves. De plus, Hu & Cardoso ont montré en 2009 que les espèces d'oiseaux qui modifient la fréquence de leur chant sont celles ayant des chants compris entre 1 et 1.5 kHz en moyenne. Au-delà de cette fréquence d'émission, le recouvrement fréquentiel par le bruit de trafic est faible et les individus n'augmentent pas la fréquence de leurs chants. De récentes études expérimentales confirment cette hypothèse et montrent que les signaux aigus sont toujours bien perçus en milieu bruyant contrairement aux signaux graves (Halfwerk et al. 2011a ; Pohl et al. 2012 ; des Aunay et al. 2014). Par exemple, chez la mésange charbonnière, alors que les femelles réagissent significativement plus aux chants graves en milieu silencieux, cette préférence disparaît en milieu bruyant du fait d'une diminution de la détection des chants graves alors que la détection des aigus n'est pas impactée (Halfwerk et al. 2011a). Certaines espèces urbaines, afin de maintenir une communication efficace, ont augmenté la redondance de leurs signaux. En effet, en milieu urbain, le viréo gris (*Vireo vicinior*) ainsi que la mésange charbonnière (*P. major*) émettent des chants plus longs que leurs congénères vivant en milieu forestier (Francis et al. 2011b ; Hamao et al. 2011). Enfin, la solution la plus évidente semble être d'augmenter l'amplitude du signal quand le niveau de bruit augmente. Ce phénomène, appelé « effet Lombard », permet de maintenir un ratio signal/bruit élevé en condition bruyante et fut pour la première fois étudié chez une espèce non-humaine par Potash en 1972. Dans son étude, l'auteur a montré que la caille du Japon (*Cortunix japonica*) augmente l'amplitude de son chant lorsque le niveau de bruit augmente.

Depuis, l'effet Lombard a été montré chez de nombreuses espèces (Manabe et al. 1998 ; Cynx et al. 1998 ; Brumm et al. 2004, 2009 ; Brumm & Zollinger, 2011). Une telle stratégie a été observée chez des oiseaux en présence de bruit de trafic routier (Brumm 2004 ; Lowry et al. 2012). Ainsi, Brumm a montré en 2004 que le rossignol philomèle (*Luscinia megarhynchos*) modifie l'amplitude de son chant en fonction du niveau de bruit de trafic routier et chante plus fort en semaine lorsque le trafic est dense et que le bruit est important par rapport au week-end quand le trafic et le niveau sonore sont plus faibles.

Tableau 1. Études corrélatives ayant montré une relation positive entre la présence de bruit de trafic routier et la fréquence des chants

Espèce	Localisation	Auteur(s)
Mésange charbonnière (<i>Parus major</i>)	Angleterre	Mockford & Marshall 2009
Mésange charbonnière (<i>Parus major</i>)	Espagne	Salaberria & Gil 2010
Mésange charbonnière (<i>Parus major</i>)	Japon	Hamao et al. 2011
Merle noir (<i>Turdus merula</i>)	Autriche	Nemeth & Brumm 2009
Merle noir (<i>Turdus merula</i>)	Pays-Bas	Ripmeester et al. 2010
Bruant chanteur (<i>Melospiza melodia</i>)	États-Unis	Wood & Yezerinac 2006
Roselin familial (<i>Carpodacus mexicanus</i>)	Mexique	Bermudez-Cuamatzin et al. 2009
Roselin familial (<i>Carpodacus mexicanus</i>)	États-Unis	Fernandez-Juricic et al. 2005
Zostérops à dos gris (<i>Zosterops lateralis</i>)	Australie	Potvin et al. 2011

Bien que la très grande majorité des études sur l'impact du bruit de trafic routier sur les systèmes de communication acoustique soit portée sur les oiseaux, certains résultats ont été obtenus sur d'autres groupes, comme par exemple chez les insectes (Shieh et al. 2012 ;

Lampe et al. 2012) ou les anoures (Sun & Narins, 2005 ; Lengagne, 2008 ; Cunnington & Fahrig 2010 ; Parris et al. 2009). Chez ces derniers, la communication acoustique est déterminante pour la reproduction notamment, le chant des mâles permettant généralement aux femelles d'identifier les sites de reproduction mais aussi d'effectuer un choix de partenaires sexuels. De plus, il a été montré que le bruit de trafic routier impacte leur perception des signaux acoustiques (Bee & Swanson 2007). Ainsi, il est important pour ces espèces de maintenir une communication efficace en modifiant la structure de leur chant comme cela a pu être observé chez les oiseaux. Dans une étude corrélative, Parris et al. (2009) ont montré que chez deux espèces d'anoures, la rainette brune (*Litoria ewingii*) et la grenouillette commune (*Crinia signifera*), la fréquence des chants émis est positivement corrélée au niveau du bruit de trafic routier (augmentation de 4.1Hz/dB et 1.5Hz/dB respectivement).

IV) Modèle d'étude

La rainette verte (*Hyla arborea*) est un petit amphibien de la famille des Hylidés. Cette espèce est présente en Europe et se reproduit au printemps de mi-avril à mi-mai. Les sites de reproduction sont constitués de points d'eau stagnante riches en végétation et dépourvus de poissons (prédateurs des œufs et têtards). Pendant la saison de reproduction, les mâles se réunissent en lek et forment un chœur pouvant rassembler plusieurs centaines d'individus afin d'attirer les femelles (Friedl et Klump, 1997). Selon Bradbury (1981), le système de lek pourrait être défini par : (1) le fait que les mâles n'offrent pas de soins parentaux et ne fournissent ni territoires ni ressources aux femelles. Ainsi les mâles ne contribuent à la génération suivante que par la transmission de leurs gènes ; (2) le fait que la zone où les mâles se rassemblent est utilisée uniquement lors de la période de reproduction et ne contient pas de ressources particulières pour les femelles si ce n'est les mâles eux-mêmes. Cette zone n'est donc utilisée pour aucune autre activité au cours de l'année ; (3) le fait que les femelles ont l'opportunité de sélectionner leurs partenaires quand elles visitent le lek. Ainsi, dans ce système de reproduction, les femelles sélectionnent les mâles leur apportant les meilleurs bénéfices indirects (descendance de meilleure qualité : Doty and Welch, 2001 ; Prokop et al. 2012 ; Woodgate et al. 2012). Chez *H. arborea*, il existe une forte différence interindividuelle dans le succès reproducteur des mâles due au choix des femelles et à la compétition entre les mâles (Jaquière et al. 2010). Les femelles ne peuvent accéder directement à la qualité des mâles et leur choix va donc être basé sur des signaux qui reflètent honnêtement leur qualité.

Chez *H. arborea*, les femelles basent leur choix de partenaires sexuels sur deux types de signaux (Richardson et al. 2010 ; Gomez et al. 2010) : un signal acoustique (le chant, figure 3) et un signal visuel (la coloration du sac vocal, figure 4). Les mâles produisent des chants en séries appelés « bouts » qui durent en moyenne 4 secondes et contenant en moyenne 25 chants (figure 3 a,b). Chaque chant est composé de deux pics de fréquences (figure 3 c), un premier compris entre 1 et 2 kHz et un second plus important compris entre 2 et 3 kHz. Ainsi, la fréquence dominante du chant est-elle comprise entre 2 et 3 kHz chez *H. arborea*. Une approche expérimentale a montré que les femelles sélectionnent les mâles émettant les signaux acoustiques les plus rapides, les plus puissants et les plus graves (Richardson et al. 2010 ; Richardson & Lengagne, 2010). La fréquence du chant fournit ainsi des informations sur la condition physique des mâles, la fréquence du chant est un indicateur honnête de la taille des mâles. En effet, plusieurs études montrent qu'il existe une corrélation négative entre la fréquence du chant et la taille des mâles chez cette espèce (de Orense & Tejedo-Madueno, 1990 ; Richardson et al. 2010). De plus, le chant de la rainette verte est très coûteux à produire (Grafe & Thein, 2001) et des paramètres du chant tels que la vitesse d'émission, la puissance d'émission ou la durée des chants sont des indicateurs de la condition énergétique des mâles chez de nombreuses espèces (Gil & Gahr, 2002 ; Berg et al. 2005 ; Ritschard & Brumm, 2012).

Concernant la coloration du sac vocal, les femelles sélectionnent préférentiellement les mâles ayant un sac vocal saturé en couleur (chroma élevé ; figure 4 b,c) et foncé (faible brightness ; figure 4 d,e) (Gomez et al. 2009, 2010). La coloration du sac vocal est due à la présence de caroténoïdes (Richardson et al. 2009). Les caroténoïdes sont des pigments que les animaux ne peuvent pas synthétiser *de novo* et ayant, en plus d'un rôle dans la coloration, des propriétés immunostimulantes et antioxydantes. (Blount et al. 2003 ; McGraw & Ardia, 2003 ; Monaghan et al. 2009). Ainsi il pourrait exister un trade-off entre allouer cette ressource limitée à l'expression de signaux visuels et l'allouer à la stimulation du système immunitaire ou antioxydant (Blount et al. 2003 ; Faivre et al. 2003 ; Mc Graw & Ardia 2003).

Chez la rainette verte, la coloration du sac vocal pourrait ainsi être un indicateur honnête de l'immunité et/ou du niveau de stress oxydant des mâles.

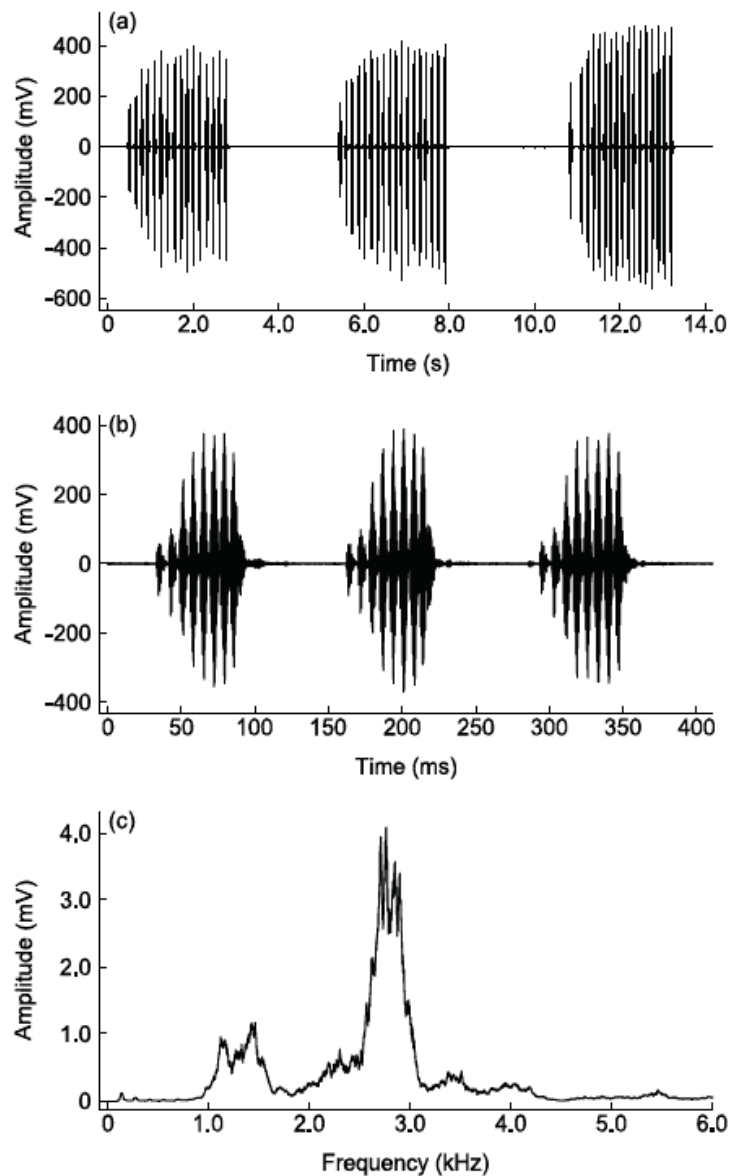


Figure 3. Caractéristiques temporelles et spectrales du signal acoustique des mâles chez *H. arborea*. (a) Oscillogramme de 3 bouts ; (b) oscillogramme de 3 chants ; (c) spectre fréquentiel d'un chant.

H. arborea est donc un modèle biologique pertinent afin de mesurer (1) l'impact du bruit de trafic routier sur les systèmes de communication tant sur l'émission des signaux que sur les critères de sélection de partenaires sexuels ; (2) les conséquences physiologiques du bruit de trafic routier.

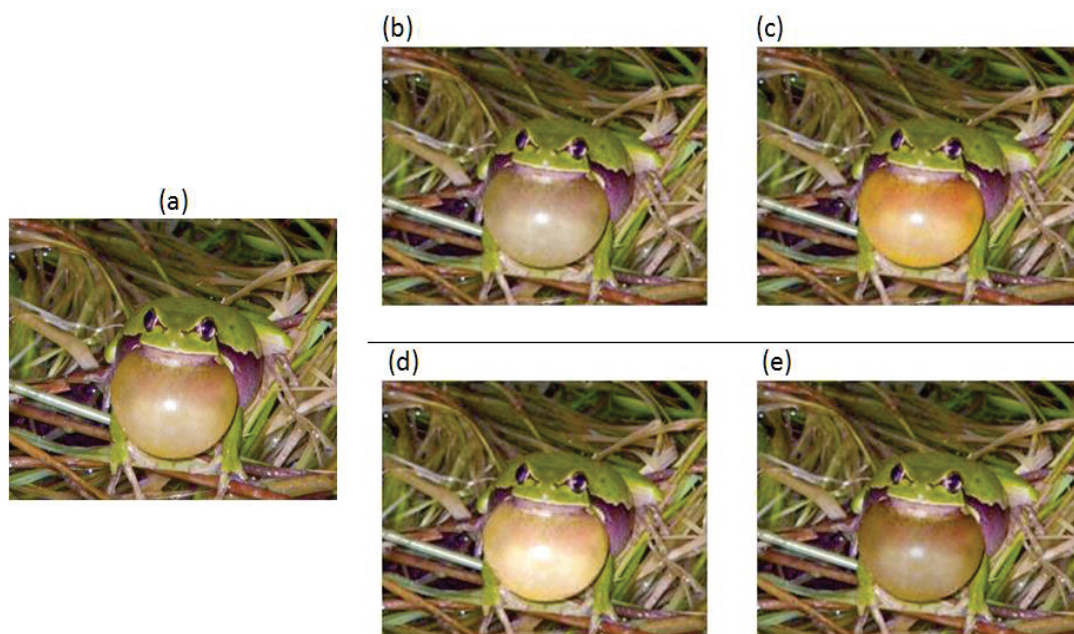


Figure 4. Caractéristiques de Chroma et de Brightness du sac vocal des mâles. (a) mâle ayant un chroma et une brightness moyens ; (b) mâle ayant un chroma faible (mâle peu saturé en couleur) ; (c) mâle ayant un chroma élevé (mâle très saturé en couleur) ; (d) mâle ayant une brightness élevée (mâle clair) ; (e) mâle ayant une brightness faible (mâle foncé) .

Pour explorer ces deux axes, nous avons tout d’abord étudié l’impact d’une exposition chronique à du bruit de trafic routier sur l’émission des signaux acoustiques mais aussi visuels (*article 1*). Nous avons par la suite étudié les choix effectués par les femelles en condition de bruit de trafic routier afin de déterminer d’une part l’impact du bruit sur le choix des femelles basé sur la fréquence des chants (*résultats rédigés dans la thèse uniquement*) et, d’autre part, la capacité des femelles à effectuer un shift multimodal en présence de bruit de trafic routier (*article 2*). Afin de pouvoir déterminer les capacités immunitaires des mâles, nous avons mis au point une méthode non invasive de mesure de réponse inflammatoire (*article 3*). Enfin, nous avons déterminé l’impact d’une exposition chronique à du bruit de trafic routier sur les niveaux de stress et les capacités immunitaires des mâles (*article 4*).

V) Hypothèses testées

H1 : Une exposition chronique à du bruit de trafic routier entraîne une modification de la structure des chants. (*Article 1*)

H2 : Une exposition chronique au bruit de trafic routier entraîne une perte de coloration. (*Article 1*)

H3 : En condition de bruit de trafic routier, les femelles sélectionnent des mâles aux chants aigus plus audibles.

H4 : En condition de bruit de trafic routier, les femelles basent davantage leur choix sur la base des signaux colorés que sur les signaux acoustiques. (*Article 2*)

H5 : Une injection de PHA entraîne une réaction inflammatoire indicatrice de l'immunité cellulaire chez *H. arborea*. (*Article 3*)

H6 : Une exposition chronique au bruit de trafic routier est un événement stressant et entraîne une immunosuppression. (*Article 4*)

H7 : L'immunosuppression en condition de bruit de trafic routier est due à de hauts niveaux de stress. (*Article 4*)

H8 : La perte de coloration est due à l'affaiblissement des capacités immunitaires. (*Article 4*)

VI) Liste des articles

- Troïanowski M., Condette C., Mondy N., Dumet A. & Lengagne T. (en révision). Traffic noise affects colouration but not calls in the European treefrog (*Hyla arborea*).

- Troïanowski M., Melot G., & Lengagne T. (2014). Multimodality: a way to cope with road traffic noise? The case of European treefrog (*Hyla arborea*). *Behavioral processes*, **107**, 88-93.

- Josserand R., Troïanowski M., Grollet O., Desprat J., Lengagne T & Mondy N. (À soumettre). Measure of skin-swelling response to phytohemagglutinin to access the immunocompetence in *Hyla arborea*.

- Troïanowski M., Arcanjo C., Dumet A., Mondy N. & Lengagne T. (À soumettre). Traffic noise : a stressful event that reduce immune capacity and colouration in the European treefrog *H.arborea*.

RÉSULTATS

Article 1: Traffic noise affects colouration but not calls in the European treefrog (*Hyla arborea*).

Troïanowski M., Condette C., Mondy N., Dumet A. & Lengagne T. (En révision).

Contexte :

De par son effet masquant, le bruit de trafic routier représente une contrainte importante pour la communication acoustique. En réponse à cette contrainte, de nombreuses espèces d'oiseaux et certains anoues modifient la structure de leurs chants et émettent des signaux plus aigus, plus rapides ou plus forts pour maintenir une communication efficace. De telles modifications du chant seraient dues à de la plasticité vocale. De plus, le bruit peut être une source de stress. Or, certains signaux colorés caroténoïdes-dépendants sont impactés par le niveau de stress et les animaux ayant un haut taux de corticostérone perdent en coloration.

Hypothèses :

H1 : Une exposition chronique à du bruit de trafic routier entraîne une modification de la structure des chants.

H2 : Une exposition chronique au bruit de trafic routier entraîne une perte de coloration.

Méthodes :

72 mâles ont été répartis en deux lots : un lot témoin placé dans une salle silencieuse et un lot expérimental placé dans une salle où était diffusé du bruit de trafic routier. La durée du traitement était de 10 jours. Avant et après le traitement, nous avons effectué des enregistrements des chants ainsi que des mesures de la coloration du sac vocal.

Résultats :

Les mâles des deux lots ne modifient pas la structure de leurs chants après 10 jours de traitement. De plus, les mâles du lot expérimental perdent en coloration contrairement aux mâles du lot témoin.

Conclusion :

Les mâles ne modifient pas la structure de leurs chants en conditions bruyantes pour deux raisons potentielles : (1) ils ne possèdent pas une plasticité vocale suffisante ; (2) le bruit de trafic routier n'est pas suffisamment impactant pour nécessiter de telles modifications. Par contre, le bruit de trafic routier suffit par lui-même à entraîner une perte de coloration chez les animaux. Un tel effet pourrait être dû au stress provoqué par le bruit. Ainsi, en affectant à la fois les espèces qui utilisent les signaux acoustiques et celles qui utilisent les signaux colorés, le bruit de trafic routier pourrait avoir un impact sur les interactions sociales d'un nombre d'espèces bien plus important que supposé jusqu'à présent.

Traffic noise affects colouration but not calls in the European treefrog (*Hyla arborea*).

Running title: Traffic noise impacts on coloured signals.

Mathieu Troïanowski¹, Camille Condette¹, Nathalie Mondy¹, Adeline Dumet¹ & Thierry Lengagne¹

¹Université de Lyon; Université Lyon 1, CNRS, UMR5023 Ecologie des Hydrosystèmes Naturels et Anthropisés, Villeurbanne, F-69622, France.

Summary

In terrestrial habitats, traffic noise is responsible for chronic noise exposure, and many studies have revealed its influence on both signal detection and acoustic signal structure. By interfering with the information transfer that is often involved in key biological processes, noise pollution lowers biodiversity in urban areas, although several species are known to adapt their call structures to cope with noise. However, compromised hearing affects more than acoustic communication, and noise should be considered as a stress factor that can also alter visual communication in the case of carotenoid-based signals. In the present study, we experimentally investigated the impact of traffic noise on the expression of secondary sexual signals in the European treefrog, *Hyla arborea*. Treefrogs use multimodal communication in the sexual selection process (mating calls and vocal sac colouration). Using an experimental method, we found that treefrogs seem unable to adjust their call structure, whatever the length of their exposure to traffic noise. Nonetheless, after 10 days, males from the experimental group showed a significant decrease in colouration intensity, whereas males from the control group did not, suggesting that traffic noise by itself can impact visual cues. Our findings highlight for the first time the negative effect of traffic noise on colour signals. This suggests that anthropogenic noise could affect a wider range of animal species than previously thought.

Keywords: Traffic noise; Acoustic cues; Carotenoids; *Hyla arborea*.

Author for correspondence E-mail: mathieu.troianowski@gmail.com

Introduction

Human activities alter the environment worldwide and can result in habitat destruction, climate change or pollution. In terrestrial habitats, road traffic has increased significantly the

past decades to become one of the human activities with the strongest effects on the environment. It causes habitat destruction and fragmentation, animal mortality and chemical and noise pollution (Forman & Alexander, 1998). Several studies have investigated the impact of traffic noise on natural populations, as it is undoubtedly the most important source of anthropogenic noise. For example, according to Forman (2000), 22% of the USA has a level of traffic noise sufficient to impact the avian community.

Traffic noise presents an important challenge to species that communicate via acoustic signals due to its impact on the signal perception threshold (higher detection threshold) (Bee & Swanson, 2007). Several studies have suggested that this alteration might be an important cause of bird declines near roads (Reijnen et al., 1996; Rheindt 2003; Halfwerk et al., 2011; Strasser et al., 2013) because acoustic communication determines several key behaviours such as reproduction, territory defence and predator detection. In response to the new challenge represented by traffic noise, vocal plasticity allows many species to adapt their call structure to limit the noise masking effect. Indeed, according to the mathematical theory of communication (Shannon & Weaver, 1949), the volume of information, V , contained in a signal can be defined by $V = FT\gamma'$ (where F represents frequency in hertz, T signal duration in seconds and $\gamma' = \log_2(1 + S/N)$ with S/N representing the signal-to-noise ratio). If noise affects signal perception, animals could still maintain an efficient communication by modifying their call characteristics (Lengagne et al., 1999; Miller et al., 2000). During the past decades, signal modifications in response to traffic noise have been demonstrated by many studies. Species have been found to increase the amplitude (Lombard effect) (Brumm, 2004; Lowry et al., 2012), the duration (Love & Bee, 2010) or the frequency of their signals (Slabbekoorn & Peet, 2003; Nemeth & Brumm, 2009; Parris & Schneider, 2009). This allows animals to maintain signal emergence in noisy environments and to limit the impact of noise on their communication. While the Lombard effect is probably a reflexive adaptation (Brumm & Slabbekoorn, 2005), other mechanisms such as frequency adaptation may occur over longer time scales (Halfwerk & Slabbekoorn, 2009). Hence, to address experimentally the question of call structure adjustment, it seems necessary to use both short and prolonged noise exposures. Surprisingly, to our knowledge, almost all experimental studies testing vocal adjustment in traffic noise condition focus on a short term exposure (but see Halfwerk et al., 2012) and there is a gap of knowledge concerning a prolonged noise exposure that may be required for several vocal adjustments.

Noise is not just an alteration of transmission channel characteristics, it is also a stress factor. Indeed, long term exposition to noise is a stressor for animals and can induce a production of

stress hormones such as corticosterone, cortisol and adrenaline (Smith et al., 2004; Atkinson et al., 2006; Chloupek et al., 2009). In addition, stress can impact carotenoid-based colouration, with stressed animals becoming paler (Eraud et al., 2007; Bortolotti et al., 2009; Martinez-Padilla et al., 2013). Hence, many animal populations living closed to roads should experience a chronic high stress level and could also face colouration lost.

While traffic noise impact on bird species is well known, very few studies focus on its impact on amphibian species. Here, we report the results of an experiment that explores the impact of traffic noise on the European treefrog (*Hyla arborea* Linnaeus 1758). *Hyla arborea* is one of the few anuran species in which mate choice occurs not only on acoustic signal but also on vocal sac colouration. Indeed, previous studies conducted on this species emphasize that females mate selection is based on several acoustic parameters, with a preference for males calling with faster call rate and emitting calls with higher amplitude and lower frequency (Richardson & Lengagne, 2010). Concerning colouration, females prefer males with a colourful vocal sacs, which is a trait based on carotenoids (Gomez al., 2009; Richardson et al., 2009). In addition, *H. arborea* males do not show any noise avoidance strategies (Lengagne, 2008) and call in a frequency bandwidth (between 1500 Hz and 2800 Hz) corresponding to the traffic noise one (Friedl & Klump, 2002). Furthermore, males sing at a time of night (20:00 to 00:00) when noise is still high (Pirrera et al., 2011). Thus, we predict that traffic noise might impact both acoustic and visual signals.

Through an experimental approach comparing a control to an experimental group exposed to traffic noise, this study attempts to determine the following: (i) if males are able to adjust their call structure in a short period (1.5 hour) or if such modifications require longer noise exposure (10 days), (ii) if noise affects their carotenoid-based signals.

Material and methods

Capture and housing conditions

During the breeding season, 72 “naive” males (males never exposed to road traffic noise) were captured by hand when calling at the same pond near Arandon (Isère, France, 45.73°41’04’’N; 5.45°57’42’’E) where there is no traffic noise. Capture of the 72 males was

performed in 6 sessions. Males were transported by car in individual boxes to the housing room of our laboratory.

The duration of captivity was 14 days. Males were captured at day 0 (D0) and were immediately placed in individual terrariums (25x17x15 cm) with a water-filled basin and a tree branch. The temperature was kept at $23.1 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$. Each terrarium was placed under a fluorescent light (EXO TERRA Repti Glo 5.0) mimicking natural light (30% UVA and 5% UVB) with timers set for a photoperiod approximating natural conditions. Throughout their captivity, males were fed *ad libitum* with domestic crickets (*Acheta domesticus*).

After three days of acclimatisation (D1, D2 and D3), males were assigned to control (N=36) or experimental groups (N=36) at random. This acclimatisation period is sufficient to observe singing behaviour in males (Brepson et al. 2013). Starting from the evening of D3, males of the experimental group were exposed to traffic noise for 10 days (see below). All males were released to the pond the night after the end of the experiment (D14).

Playback files preparation

For both control and experimental groups, we broadcast treefrog chorus noises each night from 20:30 h to 00:30 h at 80 dB(C) to reproduce the natural acoustic environment. For the chorus noise, we used a track from a previous study (Brepson et al., 2012) in which 10 males from the same population were recorded in the laboratory. The band was mixed to obtain a chorus noise in which no male was louder than any other. This was done to avoid the risk of the tested male responding to the calls of a particular competitor during the behavioural experiment. The experimental group was housed in a separate room wherein traffic noise was broadcast 24 hours a day at 76 dB (C-weighted; $R_e = 20 \mu\text{Pa}$, the SPL meter was positioned at 1 m of the loudspeaker; value observed in the field during night; Bee & Swanson, 2007; Pirrera et al., 2011) via an amplified loudspeaker (KH pas-100®, Sennheiser) connected to a CD player. This material was placed in front of the treefrogs on the opposite side of the room and was isolated from terrarium to ensure that substrate vibrations did not alter frogs' behaviour. The traffic noise audio file was prepared from recordings performed by the acouité team at a busy avenue near the city of Lyon (road N346). A Sennheiser microphone ME62-K6 was placed 10 meters from the road at a 1 m height and was connected to SONY recorder. From a 1 h recording, a 20 min segment was selected and normalised to the same amplitude (mean ± 2 dB) using Avisoft software. Spectral content of the traffic noise is presented in Figure 1.

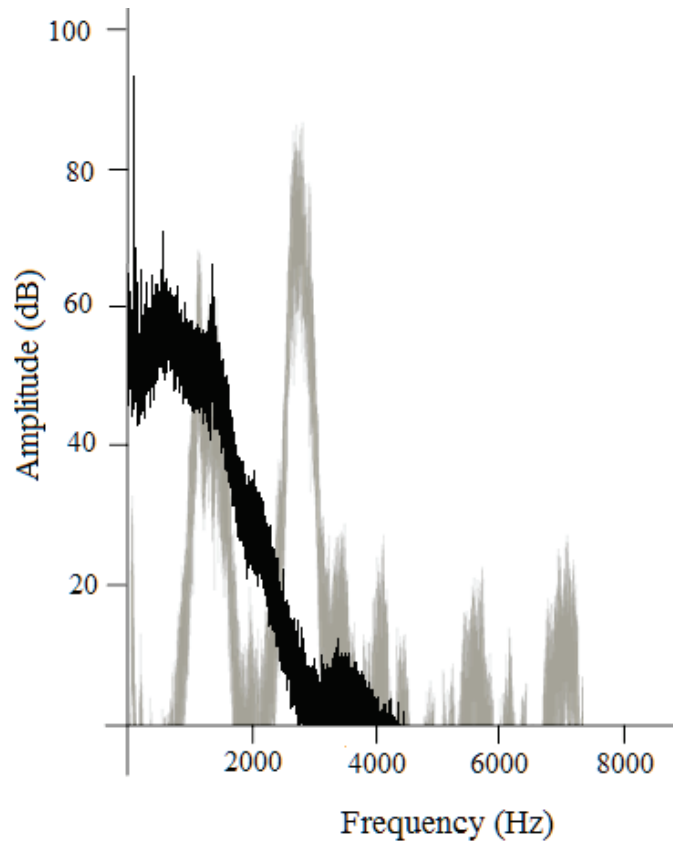


Figure 1. Spectral overlap of the broadcast highway noise and the vocalisation of *H. arborea*. Spectral characteristics of traffic noise (in bold) completely overlap the first frequency peak (near 1800 Hz) of *H. arborea* call (in grey) while the second frequency peak (near 2800 Hz) is poorly embedded by noise. The linear spectrum was obtained using a 1024 points Hamming window (resolution 42Hz).

Call recording

Males (control and experimental) were recorded individually inside a semi-anechoic chamber (40x40x40 cm) with a microphone (Sony ECM-T6) set in each box and connected to digital recorders (Roland R-44 or Fostex FR-2LE). In our experimental setup, each male was recorded twice: a first time at D3 and a second time at D13. By the way, each individual is its own control and thus this procedure is well suited to emphasized plasticity at the individual level.

Recording experimental males

After three days of acclimatisation, a first recording (“REC1”) was performed for the 36 experimental males during the night of D3. Males were placed in the early afternoon in terrariums suited to recording (with mesh on each side to avoid reverberation). The recording

of males began at 20:45 h and ended around midnight. The sound file broadcast during the recordings of experimental males was divided into two parts. First, we broadcast a chorus noise track during 1.5 hours (“chorus modality”). Calls recorded during this period allowed us to estimate the basal characteristics of a male’s acoustic signal. During the latter part of the night, which also lasted 1.5 hour, the traffic noise (76 dB C-weighted at 1 m) was added to the chorus to determine if males were able to rapidly change the structure of their calls (“road modality”). At the end of the recordings, males were returned to their terrariums and placed in the noisy room for 10 days. After 10 days of treatment (D13), males were recorded a second time (“REC2”) using the same protocol to determine whether males adjust their call structure after protracted noise exposure.

Recording control males

The control group allowed us to check whether the changes observed in the experimental males were due to noise exposure. Thus, the 36 control males were recorded under the same conditions as the experimental males (two periods of 1.5 hour between 20:45 h and 23:45 h). The only difference was that we did not broadcast the traffic noise track. Thus, the comparison between call characteristics obtained between the first and second period will allow us to determine the potential effect of time (beginning or end of the night). At the end of the recordings, males were returned to the control room and were recorded again 10 days later under the same conditions.

Call analysis

The entire recording track was divided in two equal parts of 1.5 hour. For each of them, we extracted the main acoustic characteristics using Avisoft SASLab© software. To achieve precise measurements, frequency analysis were achieved on a large window size (1024pts,) with frequency measurements performed on the middle of the call to measure the first frequency peak (near 1800 Hz) and the second one (near 2500 Hz). Temporal measurements performed on a short window size (256pts) allowed to measure call duration (in ms) and bout duration (in second) accurately. The automatic three thresholds measurements method of Avisoft SASLab© allow us to identify each call emitted during the recordings and thus to calculate the within-bout call rate (WCR, in calls·s⁻¹).

Colouration measurement

The vocal sac colouration of each male (36 control and 36 experimental) was measured with reflectance spectrometry before and after the experiment (D3 and D14). We used a spectrometer (Avantes AvaSpec-3648SPU2) with an Avantes AvaLight-DHS deuterium halogen light source lamp emitting in the range 200–1500 nm. The coaxial optic fibre (FCR-7UV200- 2-45, Avantes) had a terminal area (2 x 3 mm) cut at 45° to avoid specular reflectance and was protected by a silica window that guaranteed a constant distance between the detector and the measured patch. All spectra were taken relative to the dark and to a Spectralon white standard (Ocean Optics) and were then computed with software provided by Avantes. We took three reflectance spectra on the deflated vocal sac of each male. We averaged all of the spectra taken for a given individual before analysis. We analysed male vocal sac reflectance spectra using AVICOL, version 4 (Gomez, 2010).

Vocal sac colouration was then characterized by hue, chroma and brightness characteristics. We did not choose to compute a physiological model because, although colour vision is suggested for the treefrog (Gomez et al., 2010), the exact mechanisms are still unknown and models quantifying discriminability are not validated for restricted light conditions (Vorobyev & Osorio, 1998). We computed the colour descriptors over the range 350–700 nm, which was likely best suited to the frog range of sensitivity (Kennedy & Milkman, 1956). We computed brightness (mean light intensity) as the mean reflectance over this range and chroma (spectral purity) as the difference between maximal and minimal reflectance divided by the average reflectance. Colour variables showed different scales of variations among captured individuals (CV > 0.20 for chroma, CV > 0.17 for brightness for all colour patches measured). A more intense colouration was characterised by a higher chroma and, depending on the correlations between chroma and brightness within a colour patch, by a higher or lower brightness.

Statistical analysis

We analysed call structure (frequency, call duration and WCR) using linear mixed models with (i) the date of capture and the individual as random effects and (ii) the treatment (“control” or “experimental” group) and the interaction between the modality (“chorus” or “road”) and the passages (“REC 1” or “REC 2”) as fixed effects. We analysed the temporal variation in colour using linear mixed models, with the individual as a random effect, and the interaction between treatment and time as fixed effects. Model selection was conducted by minimising the Akaike’s information criteria (AIC). All analyses were performed using R 2.15.1 statistical analysis software (R development Core Team, 2010).

Ethical Note

The population from which the individuals were collected belongs to a metapopulation consisting of more than 20 000 treefrogs. Hence, our sampling did not significantly affect reproduction of the population. The transport from the natural habitat to the laboratory last approximately 45 minutes. During the transport, each male are placed in individual terrariums (25x17x15 cm). No effect of transport on health or mortality was observed. After the behavioural experiment, all males were examined by the EcoAquatron staff. None of them showed weight loss and all males were in good condition and did not show signs of disease.

Results

Model selection conducted by minimising AIC indicates that the models without interactions between the treatment, the modality and the passages better explain the evolution of call characteristics (first and second frequency peaks, duration, WCR, see Table 1). Indeed, there is no adjustment of call characteristics after the short exposure of 1.5 hour (“chorus” vs “road” modality, all $P > 0.05$) or even after a longer exposure of 10 days (“REC1” vs “REC2”, all $P > 0.05$) (Table 1).

Table 1. Repeated-measurement mixed modes testing the impact of noise exposure on several acoustic parameters. Model selection conducted by minimising AIC criterion indicated that the models without interaction better explain the evolution of call characteristics.

Dependent variable	Treatment			Modality			Passage		
	Estimate	Std.error	p-value	Estimate	Std.error	p-value	Estimate	Std.error	p-value
Frequency peak 1	1.7	33.08	0.96	-4.34	6.18	0.48	10.73	33.12	0.75
Frequency peak 2	-44.32	46.07	0.35	-0.83	21.9	0.97	66.63	46.4	0.17
Call duration	-0.001	0.002	0.49	-0.0004	0.0003	0.24	0.0017	0.0024	0.49
WCR	-0.06	0.16	0.69	-0.027	0.053	0.61	-0.33	0.16	0.058
Call number	-329.8	380.01	0.398	-343.1	362.8	0.28	-71.99	380.32	0.852

Traffic noise affected the brightness of the vocal sac in *H. arborea* (estimate $\pm$ SE = 161.14 ± 64.565 , Wald z test: $P = 0.0151$).-Brightness significantly increased in the experimental group (estimate $\pm$ SE = 227.5 ± 45.86 , Wald z test: $P = 0.0001$) but not in the control group

(estimate $\pm$ SE = 66.4 ± 45.42 ; Wald z test: $P = 0.1486$) (see Figure 2). In contrast, chroma and hue did not change in either group (all $P > 0.05$).

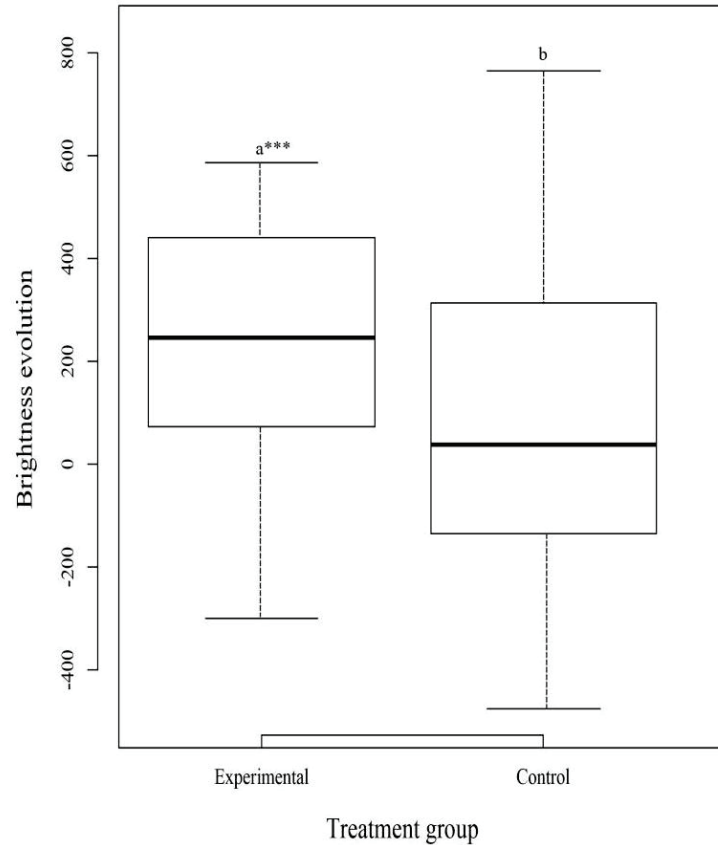


Figure 2. Modification of vocal sac brightness due to traffic noise exposure in *H. arborea*. Changes in brightness between the first and last days of the experiment (D13-D1) are presented for control and experimental groups (horizontal line: median value, box ends: upper and lower quartiles, whiskers: maximum and minimum values). Positive value indicates colour loss while negative values indicate males that grew darker during the experiment. Brightness change was significantly different between treatments, and we observed a significant difference in brightness between the first and the last day for experimental males. ***: $P < 0.001$

Discussion

In this study we tested the capacity of *H. arborea* males to modify their calls in presence of traffic noise. According to Lengagne (2008), we did not find plasticity in the call structure (call duration, frequency or call rate) after a short noise exposure. In addition, our results emphasized that males remained unable to adjust their call structure after a 10 days period of noise exposure. These results are not in agreement with those of Cunnington and Fahrig (2010), showing that anurans such as *Rana clamitans* or *Rana pipiens* can modify their call

structures in response to anthropogenic noise, as do many bird species (Laiolo, 2010). However, in their study, male frogs come from natural areas impacted by traffic noise. Background noise is known to exert strong selective pressure on both signal emission and signal structure (Ryan and Brenowitz, 1985). Hence, frogs living in these areas may be selected for their ability to adapt their signal structure to cope with the noise. Such selective pressures had not acted on the males studied in the present work because they came from natural “quiet” areas. A second explanation for the absence of adaptive responses in *H. arborea* could be that the masking effect of the road traffic was not large enough (Figure 1). *H. arborea* calls are composed of two frequency peaks. The first one near 1800 Hz was totally overlapped by traffic noise while the most energetic one near 2800 Hz was partially overlapped by the traffic noise. Because the second peak is the more energetic (24% more energetic than the first peak) and poorly overlapped, it is possible that sufficient information to indicate the males’ characteristics to the females emerges from background noise, explaining that *H. arborea* males do not modify their call structure. The results obtained by Cunningham and Fahrig (2010) may support this hypothesis. Indeed, in their study, gray treefrogs (*Hyla versicolor*), a species for which the dominant frequency (2 kHz) is poorly overlapped by traffic noise, do not modify their vocalisations, unlike *Rana clamitans* or *Rana pipiens*, species whose vocalisation are more masked.

For the first time, to our knowledge, we experimentally demonstrated that traffic noise alters visual signals. The vocal sacs of males exposed to chronic traffic noise became significantly brighter after 10 days, and this was not the case for the control males housed in the same conditions. In a correlative study, Horak et al. (2001) find that male great tits (*Parus major*) are “paler” in urban than in rural environment, but they have not identified the cause of this difference in colouration (e.g., low carotenoid content in food items or immune response due to pollution and detoxification processes). Our results suggest that exposure to traffic noise by itself can decrease the carotenoid-based colouration without any intermediate effects of food availability or chemical pollution. Nonetheless, the precise mechanisms by which noise exposure alters male colouration remain to be determined. Noise might be a stressor for animals and might induce the production of stress hormones such as corticosterone, cortisol and adrenaline (Smith et al., 2004; Atkinson et al., 2006; Chloupek et al., 2009). In addition, a recent experimental study shows that, in lekking greater sage-grouse males (*Centrocercus urophasianus*), traffic noise increases stress level (Blickley et al., 2012). In this species, chronic exposure (two months) to traffic noise enhanced corticosterone level by 16.7%. In the short term, a stress response is adaptive and has direct effects on behaviour, metabolism and

energy allocation that enhance the probability of survival for an animal (Romero & Butler, 2007). At longer term (2-3 weeks), chronic stress can induce a maladaptive response and can lead to diseases such as diabetes, immune suppression (Wright et al., 2007). Thus, by impacting stress level, traffic noise might be immunosuppressive. In addition, it was found that a long term exposure to high corticosterone level can lead oxidative stress (Buchanan 2000). For example, in an experimental study, Zafir and Banu (2009) showed that chronically injecting corticosterone into rats leads to an increase in oxidative stress. This result has been confirmed by a recent meta-analysis (Costantini et al. 2011) showing that high corticosterone levels over a short period (4 days) can lead to an increase in oxidative stress in vertebrates. In animals, many coloured visual signals are carotenoid based and these pigments cannot be synthesized *de novo*. In addition to their role in colouration, carotenoids have multiple functions including immune and antioxidant processes stimulation and antioxidant properties (Blount et al., 2003; McGraw & Ardia, 2003; Monaghan et al., 2009). Hence, trade-offs between ornamental carotenoid pigmentation and health function are often suggested. Indeed, during a stress challenge, carotenoids may preferentially be used for immune and antioxidant function rather than for colouration (Blount et al., 2003; Faivre et al., 2003; McGraw & Ardia, 2003). Such hypothesis could explain results obtained in the present study and remain to be tested.

To conclude, anthropogenic noise is a new environmental constraint of the transmission channel and may strongly impact information transfer between emitter and receiver. In this study we have shown that males did not have a sufficient plasticity to modify their call structures and to cope with such new constraint. Moreover, traffic noise probably modifies signal perception by females and can impair the discrimination of male quality in the complex sensorial environment of a chorus (Bee & Swanson, 2007). In the same way, and for the first time we know of, we showed that traffic noise by itself makes males brighter. In many species, it was shown that a decrease of carotenoid-based visual signals makes males less attractive for females (Bourne et al., 2003; Karino & Shinjo, 2004; Toomey & McGraw, 2012). Hence, our results suggest that traffic noise could affect animal reproduction more strongly than previously thought by altering both acoustic and visual communication.

Acknowledgements

We warmly thank Aline Mure for data collection, Loïc Brepson and Rémy Josserand for statistical help, Gladys Mialdea and Angéline Clair for their help in the maintenance of male housing conditions (EcoAquatron animal care structure). This study was supported by a grant from the Conseil Général d'Isère.

Ethical standards

This study was conducted in accordance with the current laws in France and with the approval of the ethical committee of Lyon 1 University (n°BH2011-6), according to the decision 2012-086-0019 of the Préfecture de l'Isère (specifying that males have to return to their habitat after the experiment) and the permit n°69266347 of the Direction des Services Vétérinaires.

References

- Atkinson, H. C., Wood, S. A., Kershaw, Y. M., Bate, E. & Lightman, S. L. (2006). Diurnal variation in the responsiveness of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis of the male rat to noise stress. — *J. Neuroendocrinol.* 18: 526-533.
- Bee, M. A. & Swanson, E. M. (2007). Auditory masking of anuran advertisement calls by road traffic noise. — *Anim. Behav.* 74: 1765-1776.
- Blickley, J. L., Word, K. R., Krakauer, A. H., Phillips, J. L., Sells, S. N., Taff, C. C., Wingfield, J. C. & Patricelli, G. L. (2012). Experimental Chronic Noise Is Related to Elevated Fecal Corticosteroid Metabolites in Lekking Male Greater Sage-Grouse (*Centrocercus urophasianus*). — *PloS one* 7, e50462.
- Blount, J. D., Metcalfe, N. B., Birkhead, T. R. & Surai, P. F. (2003). Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. — *Science* 300: 125-127.
- Bortolotti, G. R., Mougeot, F., Martinez-Padilla, J., Webster, L. M. I. & Piertney, S. B. (2009). Physiological Stress Mediates the Honesty of Social Signals. — *Plos One* 4, 8.
- Bourne, G. R., Breden, F. & Allen, T. C. (2003). Females prefer carotenoid colored males as mates in the pentamorphic livebearing fish, *Poecilia parae*. — *Naturwissenschaften* 90: 402-405.

- Brepson, L., Troianowski, M., Voituron, Y. & Lengagne, T. (2012). Cheating for sex: inherent disadvantage or energetic constraint? — *Anim. Behav.* 84: 1253-1260.
- Brepson, L., Voituron, Y. & Lengagne, T. (2013). Condition-dependent ways to manage acoustic signals under energetic constraint in a tree frog. — *Behav. Ecol.* 24: 488-496.
- Brumm, H. (2004). The impact of environmental noise on song amplitude in a territorial bird. — *J. Anim. Ecol.* 73: 434-440.
- Brumm, H. & Slabbekoorn, H. (2005). Acoustic communication in noise. — In: *Advances in the Study of Behavior*, Vol 35. Elsevier Academic Press Inc, San Diego, p. 151-209.
- Buchanan, K. L. (2000). Stress and the evolution of condition-dependent signals. — *Trends Ecol. Evol.* 15: 156-160.
- Chloupek, P., Voslarova, E., Chloupek, J., Bedanova, I., Pistekova, V. & Vecerek, V. (2009). Stress in Broiler Chickens Due to Acute Noise Exposure. — *Acta Vet. Brno* 78: 93-98.
- Costantin, I. D., Marasco, V. & Moller, A. P. (2011). A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. — *J. Comp. Physiol. B-Biochem. Syst. Environ. Physiol.* 181: 447-456.
- Cunnington, G. M. & Fahrig, L. (2010). Plasticity in the vocalizations of anurans in response to traffic noise. — *Acta Oecol.* 36: 463-470.
- Eraud, C., Devevey, G., Gaillard, M., Prost, J., Sorci, G. & Faivre, B. (2007). Environmental stress affects the expression of a carotenoid-based sexual trait in male zebra finches. — *J. Exp. Biol.* 210: 3571-3578.
- Faivre, B., Gregoire, A., Preault, M., Cezilly, F. & Sorci, G. (2003). Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. — *Science* 300: 103-103.
- Forman, R. T. T. & Alexander, L. E. (1998). Roads and their major ecological effects. — *Annu. Rev. Ec. Syst.* 29: 207- 231.
- Forman, R. T. T. (2000). Estimate of the area affected ecologically by the road system in the United States. — *Conserv. Biol.* 14: 31-35.
- Fiedl, T. W. P. & Klump, G. M. (2002). The vocal behaviour of male European treefrogs (*Hyla arborea*): Implications for inter- and intrasexual selection. — *Behaviour* 139: 113-136.
- Gomez, D., Richardson, C., Lengagne, T., Plenet, S., Joly, P., Lena, J. P. & Thery, M. (2009). The role of nocturnal vision in mate choice: females prefer conspicuous males in the European tree frog (*Hyla arborea*). — *Proc. R Soc. B-Biol. Sci.* 276: 2351-2358.

- Gomez, D., Richardson, C., Lengagne, T., Derex, M., Plenet, S., Joly, P., Lena, J. P. & Thery, M. (2010). Support for a role of colour vision in mate choice in the nocturnal European treefrog (*Hyla arborea*). — *Behaviour* 147: 1753-1768.
- Gomez, D (2010) AVICOL, Version 4. A program to analyse spectrometric data. Available from the author upon request (dodogomez@yahoo.fr) or by download. Available at: [http:// sites.google.com/site/avicolprogram](http://sites.google.com/site/avicolprogram)
- Gomez, D., Thery, M., Gauthier, A. L. & Lengagne, T. (2011). Costly help of audiovisual bimodality for female mate choice in a nocturnal anuran (*Hyla arborea*). — *Behav. Ecol.* 22: 889-898.
- Halfwerk, W. & Slabbekoorn, H. (2009). A behavioural mechanism explaining noise-dependent frequency use in urban birdsong. — *Anim. Behav.* 78: 1301-1307.
- Halfwerk, W., Holleman, L. J. M., Lessells, C. M. & SLABBEKOORN, H. (2011). Negative impact of traffic noise on avian reproductive success. — *J. Appl. Ecol.* 48: 210-219.
- Halfwerk, W., Bot, S. & Slabbekoorn, H. (2012). Male great tit song perch selection in response to noise-dependent female feedback. — *Funct. Ecol.* 26: 1339-1347.
- Horak, P., Ots, I., Vellau, H., Spottiswoode, C. & MOLLER, A. P. (2001). Carotenoid-based plumage coloration reflects hemoparasite infection and local survival in breeding great tits. — *Oecologia* 126: 166-173.
- Karino, K. & Shinjo, S. (2004). Female mate preference based on male orange spot patterns in the feral guppy *Poecilia reticulata* in Japan. — *Ichthyol. Res.* 51: 316-320.
- Kennedy, D. & Milkman, R. D. (1956). Selective light absorption by the lenses of lower vertebrates, and its influence on spectral sensitivity. — *Biol. Bull.* 111: 375-386.
- Laiolo, P. (2010). The emerging significance of bioacoustics in animal species conservation. — *Biol. Conserv.* 143: 1635-1645.
- Lengagne, T., Aubin, T., Lauga, J. & Jouventin, P. (1999). How do king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) apply the mathematical theory of information to communicate in windy conditions? — *Proc. R Soc. B-Biol. Sci.* 266: 1623-1628.
- Lengagne, T. (2008). Traffic noise affects communication behaviour in a breeding anuran, *Hyla arborea*. — *Biol. Conserv.* 141: 2023-2031.
- Love, E. K. & Bee, M. A. (2010). An experimental test of noise-dependent voice amplitude regulation in Cope's grey treefrog, *Hyla chrysoscelis*. — *Anim. Behav.* 80: 509-515.
- Lowry, H., Lill, A. & Wong, B. B. M. (2012). How Noisy Does a Noisy Miner Have to Be? Amplitude Adjustments of Alarm Calls in an Avian Urban 'Adapter'. — *Plos One* 7, 5.

- Martnez-Padilla, J., Mougeot, F., Garcia, J. T., Arroyo, B. & Bortolotti, G. R. (2013). Feather corticosterone levels and carotenoid-based coloration in common buzzard (*buteo buteo*) nestlings. — *J. Rapt. Res.* 47: 161-173.
- McGraw, K. J. & Ardia, D. R. (2003). Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: An experimental test. — *Am. Nat.* 162: 704-712.
- Miller, P. J. O., Biassoni, N., Samuels, A. & Tyack, P. L. (2000). Whale songs lengthen in response to sonar. — *Nature* 405: 903-903.
- Monaghan, P., Metcalfe, N. B. & Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. — *Ecol. Lett.* 12: 75-92.
- Morgan, K. N. & Tromborg, C. T. (2007). Sources of stress in captivity. — *Appl. Anim. Behav. Sci.* 102: 262-302.
- Nemeth, E. & Brumm, H. (2009). Blackbirds sing higher-pitched songs in cities: adaptation to habitat acoustics or side-effect of urbanization? — *Anim. Behav.* 78: 637-641.
- Parris, K. M. & Schneider, A. (2009). Impacts of Traffic Noise and Traffic Volume on Birds of Roadside Habitats. — *Ecology and Society* 14: 23.
- Pirrer, S., De Valck, E. & Cluydts, R. (2011). Nocturnal road traffic noise assessment and sleep research: The usefulness of different timeframes and in- and outdoor noise measurements. — *Appl. Acoust.* 72: 677-683.
- Reijnen, R., Foppen, R. & Meeuwsen, H. (1996). The effects of traffic on the density of breeding birds in Dutch agricultural grasslands. — *Biol. Conserv.* 75: 255-260.
- Rheindt, F. E. (2003). The impact of roads on birds: Does song frequency play a role in determining susceptibility to noise pollution? — *J. Ornithol.* 144: 295-306.
- Richardson, C., Popovici, J., Bellvert, F. & Lengagne, T. (2009). Conspicuous colouration of the vocal sac of a nocturnal chorusing treefrog: carotenoid-based? — *Amphibia-Reptilia* 30: 576-580.
- Richardson, C. & Lengagne, T. (2010). Multiple signals and male spacing affect female preference at cocktail parties in treefrogs. — *Proc. R Soc. B-Biol. Sci.* 277: 1247-1252.
- Romero, L. M. & Butler, L. K. (2007). Endocrinology of stress. — *Int. J. Comp. Psych.* 20: 89-95.
- Ryan, M. J. & Brenowitz, E. A. (1985). The Role of Body Size, Phylogeny, and Ambient Noise in the Evolution of Bird Song. — *Am. Nat.* 126: 87-100.
- Shannon, C. E. & Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication.

- Slabbekoorn, H. & Peet, M. (2003). Ecology: Birds sing at a higher pitch in urban noise - Great tits hit the high notes to ensure that their mating calls are heard above the city's din. — *Nature* 424: 267-267.
- Smith, M. E., Kane, A. S. & Popper, A. N. (2004). Noise-induced stress response and hearing loss in goldfish (*Carassius auratus*). — *J. Exp. Biol.* 207: 427-435.
- Strasser, E. H. & Heath, J. A. (2013). Reproductive failure of a human-tolerant species, the American kestrel, is associated with stress and human disturbance. — *J. Appl. Ecol.* 50: 912-919.
- Toomey, M. B. & McGraw, K. J. (2012). Mate choice for a male carotenoid-based ornament is linked to female dietary carotenoid intake and accumulation. — *Bmc Evol. Biol.* 12: 12.
- Vorobyev, M. & Osorio, D. (1998). Receptor noise as a determinant of colour thresholds. — *Proc. R Soc. B-Biol. Sci.* 265: 351-358.
- Wright, A. J., Soto, N. A., Baldwin, N. A., Bateson, M., Beale, C. M., Clark, C., Deak, T., Edwards, E. F., Fernandez, A., Godinho, A., Hatch, L. T., Kakuschke, A., Lusseau, D., D., M., Romero, L. M., Weilgart, L. S., Wintle, B. A., Notarbartolo-di-Sciara, G. & Vidal, M. (2007). Anthropogenic Noise as a Stressor in Animals: A Multidisciplinary Perspective. — *Int. J. Comp. Psych.* 20: 250-273.
- Zafir, A. & Banu, N. (2009). Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. — *Stress.* 12: 167-177.

Le bruit de trafic routier rend-il les sopranos plus attirants ?

Introduction

Chez de nombreuses espèces, la communication acoustique joue un rôle déterminant dans les interactions sociales telles que la défense du territoire, la détection de proies ou de prédateurs mais aussi la sélection sexuelle (attraction et choix de partenaires sexuels). Dans le cas de la sélection sexuelle, les signaux émis par les mâles permettent aux femelles d'estimer leurs qualités. Les femelles sélectionnent ainsi généralement les mâles émettant des signaux coûteux à produire correspondant à des signaux puissants (forte amplitude), longs et rapides (Prestwich, 1994 ; Gerhardt & Huber, 2002). De tels signaux indiquent à la femelle un mâle possédant de bonnes réserves énergétiques, en bonne santé et ayant accès à des ressources de hautes qualités (Gil & Gahr, 2002 ; Berg et al. 2005; Ritschard & Brumm, 2012). De plus, les femelles montrent couramment une préférence pour les mâles émettant des signaux à basses fréquences (Giacoma et al. 1997 ; Tarano & Herrera, 2003 ; Gerhardt, 2005) indiquant des individus corpulents (de Orense & Tejedo-Madueno, 1990 ; Gerhardt, 1994 ; May-Collado et al. 2007 ; Martin et al. 2011). Sélectionner des mâles corpulents apporterait des bénéfices directs (accès à un territoire de meilleure qualité, forte probabilité de fertilisation : Bourne, 1993 ; Moya-Larano & Fox 2006) mais aussi indirects (descendance de meilleure qualité : Doty and Welch, 2001 ; Prokop et al. 2012 ; Woodgate et al. 2012) aux femelles.

Alors que ces systèmes de communication se sont développés au cours de l'évolution de manière à être les plus adaptés possible (optimisation de la propagation et de la détectabilité du signal) aux conditions environnementales (Wiley & richards, 1982 ; Guilford & Dawkins, 1991 ; Boncoraglio & Saino, 2007 ; Ey & Fischer, 2009), de nouvelles contraintes acoustiques dues au développement anthropique apparaissent. En effet, le développement des axes routiers implique un bouleversement de l'ambiance sonore des zones naturelles et les perturbations sonores dues au bruit du trafic routier sont parmi les plus importantes en milieu terrestre (Forman, 2000). Ainsi, de nombreuses études se sont intéressées à son impact sur les systèmes de communications acoustiques. Par exemple, il a été montré qu'en présence de bruit de trafic routier les mâles émettent des signaux plus aigus (ce qui permettrait au signal d'émerger du bruit de fond à basses fréquences), plus longs et plus puissants (Slabbekoorn & Peet, 2003 ; Brumm, 2004 ; Laiolo, 2010). De plus, certaines études ont mis en évidence qu'en condition de bruit de trafic routier la préférence des femelles

pour les signaux à basses fréquences semble s'atténuer (Bermudez-Cuamatzin et al, 2011 ; Halfwerk et al, 2011a ; des Aunay et al. 2014). Le bruit de trafic routier, par ses caractéristiques spectrales, impacte donc non seulement l'émission des signaux (émission de signaux aigus pour émerger du bruit de fond) mais aussi la réception des signaux (masquage des signaux graves) et par conséquent la sélection de partenaires sexuels. Alors que de très nombreuses études ont porté sur l'impact du bruit de trafic routier chez les oiseaux, les connaissances sur l'impact de cette nuisance sonore chez les amphibiens restent très parcellaires.

Nous avons cherché ici à déterminer expérimentalement l'impact du bruit de trafic routier sur les critères de sélection de partenaires sexuels chez la rainette verte (*Hyla arborea*). Il a été montré à plusieurs reprises que, chez cette espèce, les femelles basent en partie leurs choix de partenaires sur les signaux acoustiques émis par les mâles et ont une préférence pour les mâles émettant des chants graves (Richardson & Lengagne 2010 ; Richardson et al. 2010). Les signaux graves étant plus masqués que les signaux aigus, nous avons émis l'hypothèse que la préférence des femelles pour le premier type de signaux serait moins marquée en condition bruyante qu'en condition silencieuse.

Matériels et méthodes

Afin de déterminer si le bruit de trafic routier a un impact sur la sélection de partenaires sexuels, nous avons effectué une série de tests comportementaux sur des femelles *H. arborea*. Les femelles ont été capturées dans leur milieu naturel, dans une population localisée près de Lyon, France, sur le plateau Crémieu (5°21'7'E, 45°44'20'N). Elles ont été échantillonnées lorsqu'elles étaient en amplexus pour s'assurer qu'elles n'avaient pas encore pondu mais étaient prêtes à le faire et donc potentiellement réceptives aux chants des mâles.

En laboratoire, chaque femelle a eu à choisir entre deux leurres se différenciant sur leurs fréquences de chant (aiguës et graves, voir tableau 1). Ces tests ont été effectués dans deux conditions sonores différentes : une première dite « silencieuse » durant laquelle seul un bruit de chœur était diffusé en fond sonore (65 dB) et une seconde dite « bruyante » durant laquelle un bruit de trafic routier (72 dB) était diffusé en plus du bruit de chœur.

Préparations des tests

Les tests ont été effectués au sein d'une arène rectangulaire de dimension 360 x 130 x 36 cm (L x l x h), dont le sol était couvert de toile de jute imprégnée d'eau de la mare où les rainettes ont été prélevées afin de masquer l'odeur du tissu et limiter le stress des femelles dû au dépaysement. Les bords de l'arène étaient constitués de plaques de mousse isolante (Plastiform[®]) ayant pour but de limiter la réverbération du son. Deux haut-parleurs Monacor SP155X ont été disposés à chaque extrémité de l'arène. Chaque haut-parleur diffusait un chant de qualité différente (aigu ou grave). Afin que la distinction des deux leurres soit aisée pour les femelles et pour éviter un effet leader (Richardson et al. 2008), les signaux ont été diffusés de façon antiphonique de telle sorte que les bouts soient émis en alternance et qu'il y ait un silence d'une seconde et demie entre chacun. Autour de chaque haut-parleur, une zone dite de « choix » de 10 cm a été tracée. Un choix est considéré comme valide lorsque les femelles restent au moins 20 secondes dans l'une de ces deux zones de choix.

Déroulement des tests

Les tests se déroulaient de la même manière pour les deux conditions acoustiques :

Avant chaque test, les chants diffusés par les haut-parleurs ont été choisis aléatoirement. Au début du test, la femelle est placée dans une cloche d'acclimatation grillagée (9 cm de diamètre, 5 cm de hauteur) située au centre de l'arène pendant deux minutes. Cette période d'acclimatation lui permet d'écouter et d'évaluer les deux leurres avant de pouvoir effectuer un choix. Après ces 2 minutes, le couvercle de la cloche est retiré, la femelle dispose dès lors de 10 minutes pour choisir l'un des deux leurres. Un choix est considéré comme invalide lorsque les femelles restent dans la cloche plus de deux minutes après ouverture, sortent de l'arène et restent immobiles plus de deux minutes en dehors de la zone de choix. La latence du choix est notée pour chaque test.

Tableau 1 : Caractéristiques acoustiques des leurres utilisés durant les tests.

Caractéristiques du bout	Chant grave	Chant aigu
Fréquence (Hz)	2481,30	2746,09
Amplitude (db)	80,18	80,18
Vitesse Intra-Bout moyenne (chants/s)	7,3	7,3
Durée du bout (s)	3,412	3,412

Analyses statistiques

Les données de choix étant de type binomial (choix aigu = 0 ; choix grave = 1) et répétées entre individus (donc non indépendantes), nous avons choisi d'analyser l'impact du bruit de trafic routier sur le choix effectué par les femelles par des régressions logistiques à effets mixtes. Pour analyser l'impact du bruit de trafic routier sur la latence des choix (données non binomiales et non indépendantes), nous avons effectué des régressions linéaires à effets mixtes. Pour les deux types d'analyses, nous avons ainsi utilisé le traitement (condition silencieuse ou condition bruyante) comme effet fixe, l'indice corporel et l'individu comme effets aléatoires.

Résultats

Au cours de cette expérience, 113 femelles ont été testées : 25 ont répondu en chœur, 27 en route et 17 dans les deux situations.

Concernant les choix effectués par les femelles, nos résultats indiquent que les femelles ne montrent pas de préférence pour l'un des deux leurres en condition silencieuse (estimate $\pm$ SE = 0.41 ± 0.41 , Wald z test : $P = 0.321$). De plus, aucun effet du traitement sur les choix effectués par les femelles n'a été mis en évidence (estimate $\pm$ SE = -0.18 ± 0.56 , Wald z test : $P = 0.746$) (voir figure 1).

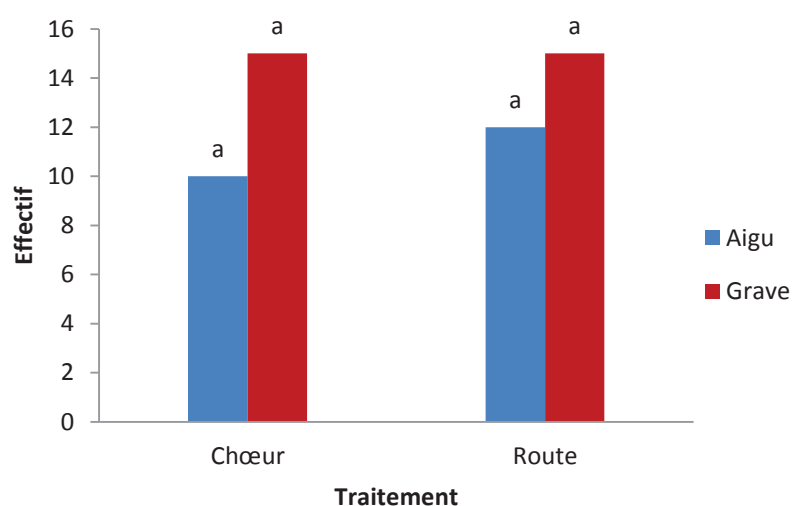


Figure 1 : Choix effectués par les femelles. En condition silencieuse, aucune préférence pour les chants graves n'a été mise en évidence ($P = 0.321$). De plus, le bruit de trafic routier n'impacte pas les choix effectués ($P = 0.746$).

Concernant la latence de choix, nos résultats indiquent que les femelles ne mettent pas plus de temps à choisir en condition bruyante qu'en condition silencieuse (estimate $\pm$ SE = 8.3 ± 17.7 , Wald z test : $P = 0.649$).

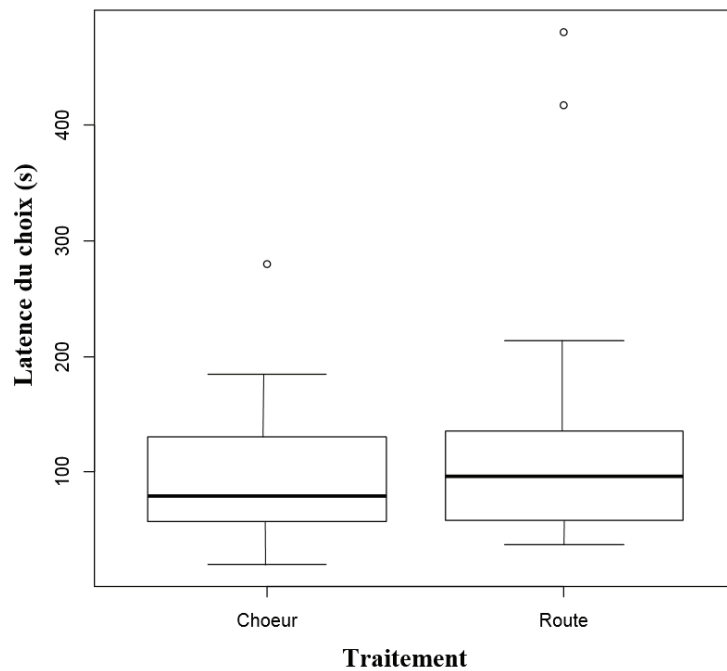


Figure 2 : Latences des choix effectués par les femelles. Le bruit de trafic routier n'impacte pas le temps nécessaire aux femelles pour choisir entre l'un des deux leurres ($P = 0.746$).

Discussion

D'après les résultats obtenus lors des tests effectués en condition silencieuse, les femelles ne montrent pas de préférence pour l'un des deux signaux acoustiques émis. Ceci diffère des résultats attendus, c'est-à-dire un déséquilibre de choix en faveur du signal acoustique grave. En effet, il a déjà été montré chez cette espèce qu'en absence de nuisance sonore, les femelles choisissent préférentiellement les mâles aux signaux acoustiques graves (Richardson et al. 2010 ; Richardson & Lengagne, 2010). Une telle différence de résultats ne semble pas due aux leurres utilisés. En effet, durant leurs expériences, Richardson et al. ont utilisé des leurres dont la différence de qualité était moindre que celle utilisée dans notre étude

(190 et 264.79 Hz de différence respectivement). Les femelles possèdent donc la capacité de discriminer entre deux leurres différents de 190 Hz et devraient donc discriminer plus aisément les deux signaux acoustiques, et leur préférence pour le leurre grave aurait dû se dégager de nos résultats. Cette absence de répétabilité dans les critères de sélection de partenaire sexuel pourrait s'expliquer par les différences de températures entre les tests effectués en 2010 et ceux effectués en 2013. En effet, d'après Gerhardt & Mudry (1980), une baisse de température entraîne une préférence pour les chants à basses fréquences chez la rainette verte de Caroline (*Hyla cinerea*). Or, lors des tests effectués en 2010, la température était de 16 ± 2 °C contre 20 ± 2 °C lors des tests effectués en 2013 ce qui peut expliquer ainsi l'absence de préférence pour les chants graves observée dans notre étude. Une dernière explication pourrait être liée à la puissance des tests. Lors des tests en conditions silencieuses, seules 25 femelles ont répondu. Or 60 % des femelles ont sélectionné les mâles au chant grave et un échantillonnage plus important aurait pu permettre de faire ressortir statistiquement la préférence des femelles pour les chants graves.

Nous avons émis l'hypothèse que le bruit de trafic routier entraînerait un changement des critères de sélection des femelles. En effet, certaines études ont montré expérimentalement qu'en présence de nuisances sonores à basses fréquences, les signaux acoustiques de hautes fréquences sont plus audibles car ils subissent un recouvrement fréquentiel moins important (Halfwerk et al, 2011a ; Pohl et al. 2012). Par exemple, dans leur étude sur la mésange charbonnière (*Parus major*), Pohl et al. (2012) ont montré qu'en condition de bruit de trafic routier, le seuil de détection des signaux à hautes fréquences est plus faible que le seuil de détection des signaux à basses fréquences. Ainsi, alors que nous nous attendions à des changements de critères de sélection et à une augmentation de la latence de choix, aucun impact du bruit de trafic routier n'a été observé. Il semblerait donc que, dans ces conditions expérimentales, le bruit de trafic routier ne soit pas une nuisance sonore suffisamment contraignante pour induire des changements dans les critères de choix de partenaires chez les femelles de la rainette verte. Le chant de *H. arborea* est composé de deux pics de fréquences : un premier pic variant de 1600 à 1800 Hz et un deuxième pic plus énergétique qui s'étend de 2000 à 2900 Hz. La présence de bruit tel que le trafic routier induit le recouvrement total du premier pic de fréquences du signal acoustique et un recouvrement partiel du second pic (Lengagne, 2008). Bien que cela n'ait pas été démontré, le deuxième pic de fréquences est le plus énergétique et il est possible que ce dernier porte suffisamment d'informations pour que la femelle puisse estimer la qualité des mâles. Ceci pourrait expliquer le fait qu'aucun changement de choix n'ait été observé dans notre étude.

Article 2: Multimodality: a way to cope with road traffic noise? The case of European treefrog (*Hyla arborea*).

Trojanowski M., Melot G., & Lengagne T.

Contexte :

Chez *H. arborea*, la communication est multimodale, les femelles se basent sur les signaux acoustiques mais aussi visuels pour sélectionner leurs partenaires sexuels. L'utilisation de la multimodalité peut se révéler être un avantage en condition bruyante. Effectivement, lorsqu'un des canaux sensoriels est perturbé par du bruit, les individus peuvent utiliser des signaux non impactés pour continuer à communiquer efficacement. En condition de bruit de trafic routier, alors que la communication acoustique est perturbée, l'utilisation de signaux visuels permettrait de continuer à communiquer efficacement.

Hypothèses :

H4 : En condition de bruit de trafic routier, les femelles basent davantage leur choix sur la base des signaux colorés que sur les signaux acoustiques.

Méthodes :

Les femelles avaient le choix entre deux leurres de qualités différentes : l'un représentait un mâle émettant un chant de bonne qualité mais ayant une coloration de mauvaise qualité (leurre 1), le deuxième leurre présentait les signaux inverses (leurre 2). Pour chaque femelle nous avons enregistré les choix effectués en condition silencieuse (témoin) et en condition de bruit de trafic routier.

Résultats :

En condition témoin les femelles choisissent davantage le leurre 1. Cette préférence se retrouve en condition expérimentale. De plus, la latence du choix n'est pas impactée par la présence du bruit de trafic routier.

Conclusions :

Les femelles ne basent pas d'avantage leurs choix de partenaires sexuels sur la coloration pour trois raisons potentielles : (1) le bruit de trafic routier n'est pas suffisamment contraignant et les signaux acoustiques restent toujours discriminables ; (2) les femelles n'ont

pas d'intérêt pour les bénéfices potentiels liés au choix des mâles les plus colorés ; (3) les femelles ne possèdent pas une plasticité comportementale suffisante pour effectuer un shift multimodal.

Article 3: Assessing immunocompetence in small size anuran species: the use of phytohaemagglutinin test with *Hyla arborea*

Josserand R., Troïanowski M., Grollet O., Desprat J., Lengagne T & Mondy N. (À soumettre)

Contexte :

Les capacités immunitaires ont un rôle important dans la fitness des individus. En effet, des capacités réduites peuvent impacter la survie ainsi que le succès reproducteur des animaux. Être capable de déterminer les capacités immunitaires d'un individu est donc important dans les problématiques de conservation et de sélection sexuelle. L'utilisation d'échantillons sanguins sur petits animaux pour déterminer les capacités immunitaires est difficile et il est dès lors nécessaire de développer des méthodes de mesures non invasives pour travailler sur ces espèces. Une injection de phytohémagglutinine (PHA) entraîne des réactions inflammatoires chez certaines espèces et donnerait des indications sur l'immunité cellulaire des individus injectés.

Hypothèses :

H5 : Une injection de PHA entraîne une réaction inflammatoire indicatrice de l'immunité cellulaire chez *H. arborea*.

Méthodes :

Nous avons tout d'abord cherché à déterminer la concentration de PHA à injecter pour obtenir une réaction inflammatoire. Nous avons ensuite effectué des mesures d'inflammation de la patte à différentes heures après injection pour déterminer le temps nécessaire pour obtenir une réponse inflammatoire. Enfin, afin de déterminer si la réponse observée est bien indicatrice de l'immunité cellulaire, nous avons effectué une injection de PHA et déterminé la composition sanguine sur un premier lot tandis que sur un second, nous avons effectué deux injections de PHA avant l'analyse sanguine.

Résultats :

La concentration retenue pour obtenir une réaction inflammatoire est de 1mg/20µl. La réaction inflammatoire atteint un pic 14 heures après injection et se prolonge jusqu'à 24 heures post-injections. De plus, une deuxième injection de PHA entraîne une

réaction inflammatoire plus importante et une augmentation du taux de lymphocytes dans le sang.

Conclusion :

Une injection de PHA entraîne bien une réaction inflammatoire chez *H. arborea* et permet ainsi de déterminer les capacités immunitaires des individus. De plus, le fait que la deuxième injection provoque une réaction plus importante confirme que la PHA est indicatrice de l'immunité cellulaire des animaux. Effectivement, cette immunité est à mémoire et répondra donc de manière plus importante lors d'une seconde rencontre avec un même pathogène. Cela est confirmé par le fait que le taux de lymphocytes est plus important après deux injections.

Assessing immunocompetence in small size anuran species: the use of phytohaemagglutinin test with *Hyla arborea*

Rémy Josserand, Mathieu Troïanowski, Odile Grollet, Julia Desprat, Thierry Lengagne,
Nathalie Mondy

Université de Lyon, F-69000, Lyon ; Université Lyon 1, UMR CNRS 5023, F – 69622,
Villeurbanne, France

Corresponding author: e-mail: nathalie.mondy@univ-lyon1.fr

Key-words: tree frog, inflammatory response, immune system, cell-mediated immunity, PHA

Introduction

Immunocompetence - the ability of a host to prevent and control infection by pathogen or parasite - is an important parameter to understand the proximal cause of population declines experienced by amphibians (e.g. Carey et al., 1999; Fisher 2007; Guangchun and Jacques 2011). Indeed, immunocompetence has been specifically suggested to induce significant fitness cost by reducing survival and /or the reproduction rate (Lochmiller and Deerenberg 2000; Møller and Saino, 2004) and/or to affect mate choice (Folstad and Karter, 1992). Amphibian immune system defenses involve both innate and adaptive defense mechanism. The innate immunity system provides rapid and non-specific protection. During this phase, resistance mechanisms recognize an external pathogen *via* broadly conserved molecular structures, and then respond to it (Boughton et al. 2011). In contrast, an adaptive immune response is characterized by specific memory allowing an individual to recognize and remember specific parasite and will often provide lifetime immunity against reinfection with the same parasite or pathogen (Carey et al., 1999). The adaptive immune response includes humoral immunity with production of highly specific antibodies and cell-mediated responses which involve T-lymphocytes and to lesser extent macrophages and polynuclear leucocytes (Gilbertson et al. 2003). Constitutive immunity provides a response that is always ready to act; it tends to be a rapid response and is unspecific in that it is elicited or effective against a variety of immune challenge (Boughton et al. 2011). In contrast induced responses

are only expressed after parasite infection, wounding or cancer recognition. This encompasses both innate and adaptive immunity. Because of the complexity of the physiological reactions triggered by infection, measuring and interpreting immunocompetence in wildlife study require standardized techniques.

Most of techniques used to measure immunocompetence needs blood sampling. Such techniques include, for example, the measure of natural antibodies and complement effectiveness using a hemolysis-hemagglutination assay, the measure of bactericidal capacity of plasma and the determination of leucocyte profile (e.g. Matson et al., 2006; Pigeon et al., 2013). Fewer non-invasive methods were developed. Among them, the phytohemagglutinin (PHA) challenge test is the most popular because it does not cause any physiological stress responses in the animal other than those associated with capture and handling (Merino et al., 1999). PHA challenge was used extensively in birds and in reptile (e.g. Meylan et al., 2010; review in Tella et al. 2008; Grasman et al. 2013) but more rarely in amphibians (Table 1). It can be applied in natural contexts because of its short-term and localized effects and its feasibility *in vivo* under field conditions. This test consists of a PHA injection which produces temporary localized swelling. The PHA molecules bind T-cell receptors regardless of their specificity and induce T-cell mitosis in mammals and birds (Vinkler et al. 2010). Recently, the use of PHA test as the surrogate of only T cell-mediated immunity was questioned (Kennedy and Nager, 2006; Vinkler et al., 2010). As a consequence, the immunological mechanisms involved in local and inflammatory process induced by PHA are not entirely understood and its interpretation as an index of acquired immune response is currently debated (Kennedy and Nager, 2006; Demas et al., 2011).

Methods requiring blood sampling cannot be applied in small size anuran species such as *Hyla arborea*. Individuals are too small (3 to 7g) to allow a blood sampling by cardiac puncture without risk of death of this protected species. This study aimed to test the possibility to use a PHA test with *H. arborea*, the European treefrog, and to identify the optimal procedure to measure immunocompetence in this species and more generally in small amphibian species. In addition, in order to clarify the true nature of the PHA response in *H. arborea*, we examined the white blood cell types that proliferate during the inflammatory response after one and two PHA injections.

Table 1. Measuring immunocompetence with PHA in amphibian species

(1) Lots of studies not mentioned in the table use PHA with spleen cell culture of *Xenopus leavis* (e.g. Kinney and Cohen, 2005)

Species (1)		method	e.g. reference
<i>Lithobates pipiens</i>	adult	Toe web injection, 2mg/ml, swelling measure at 24, 48 and 72 h	Gilbertson et al., 2003
<i>Lithobates spenocephalus</i>	tadpole	Tail injection, 1mg/ml, swelling measure at 24h	Venesky et al., 2012
<i>Rana sylvatica</i>	froglet	Thigh injection, 1mg/ml, swelling measure at 24 h	Gervasi et al., 2008
<i>Rhinella marina</i>	adult	Toe web injection, 1, 2 and 5mg/ml swelling measure at 6, 12, 24, 48 and 72 h	Brown et al., 2011

Materials and methods

Animal collection and rearing

Individuals were obtained from a population located near Lyon, France, on the Crémieu Plateau (5°21'7"E, 45°44'20"N). During springs 2011 (experiment 1), 2012 (experiment 2) and 2014 (experiment 3), treefrog male adults were captured individually by hand when calling at the pond. Males were individually housed in terrariums (25x17x15cm) with a water-filled basin and a tree branch. Terrarium were put to the housing room of the laboratory in which temperature was kept at $23.1 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$ (mean $\pm$ sd). During the entire experiment, males fed *ad libitum* with domestic crickets (*Acheta domesticus*) and were exposed to natural photoperiod.

Treatment inocula

PHA is a lectin derived from red kidney beans. PHA-P (n° L8754, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) is a mixture of five isolectins that are tetramers composed of varying proportions of two PHA subunits, L and E (Vinckler et al., 2010). In each experiment PHA were dissolved in phosphate-buffered saline (PBS, Dubelcco Sigma D5773).

Experimental protocols

Experiment 1: Determination of effective dose of PHA

This experiment allowed us to determine the capacity of PHA to induce an inflammatory response in *H. arborea*. Injection into a toe web and measure of thickness (e.g. Gilbertson et al., 2003; Brown et al, 2011) cannot be applied to small species such as *H. arborea*. So, using a syringe with a 26S-gauge needle, we injected 20 µl of PHA solution into the right leg muscle of *H. arborea*. In agreement with the ethic protocol, only nine frogs are used to test 0.25 mg, 0.5mg or 1mg of PHA per individual (3 individuals per dose). As a control, 20 µl of PBS was injected into the left leg of the same individual. Swelling was measured three times before and 2, 10, 12, 14, 24 and 48 hours after injection with a spessimeter (Mitutoyo, ID-C112, Japan) with an accuracy of 0.01 mm. Average measurement were then used given their high repeatability (N=30, F=1.5, P=0.23). In agreement with most studies, reaction to PHA expressed as the difference between and the change in thickness of the right PHA-inoculated leg and the change in thickness of the left PBS-inoculated leg. Data of experiment 1 was analyzed using ANOVA (*R 2.12.1* ; R Development Core Team, 2010).

Experiment 2: Validation of the measure of immunocompetence in H. arborea

The goal of experiment 2 was to develop and validate the measure of immunocompetence using PHA test. 90 males were sampling in April 2012 and rearing in the laboratory according the protocol described above. Twenty µl of PBS (N=45) or of PHA (N=45) were injected in the right leg of each frog (see results of experiment 1). The thickness of the leg was measured before injection and 12, 14, 16, 18, 20, 22 and 24 hours after injection. Linear mixed model (LMM) was used to test immunocompetence in this experiment and allowed us to assess the magnitude of individual changes between leg thickness before and after PHA injection. The leg thickness is explained by the interaction between time (after and before injection) and treatment (PHA and PBS), the mass of the individuals is used as covariate. The model included individual as a random effect acting on the intercept. In addition we used a matrix of variance-covariance of compound symmetry type because we detected heteroscedasticity between before and after injection (F=0.15; df=23; P<0.001). Computations were carried out with *R 2.12.1* (R Development Core Team, 2010).

Experiment 3: Validation of cellular immune response to PHA injection

3.1. Swelling measurement

The cell-mediated immune system has a memory and recognizes previously encountered antigens, it can mount a stronger response if the same antigen is encountered again (Kennedy & Nager 2006). In order to validate that swelling response observed in *H. arborea* is due to cellular immune response, 11 males were sampled in 2014 and divided in two groups: the first one (control) wherein males were injected only once (C-males, N=6) and the second one (experimented) wherein males were injected twice (E-males, N=5). According to result of experiment 1 and 2, 1 mg of PHA diluted in 20 µl of PBS was injected in the right leg of all males (C- and E-males). Male legs thickness was measured 16 hours after PHA injection. After this first inflammatory measure, C-males were euthanized for blood sampling according ethic protocol (see below) and E-males were housed 10 more days. After ten days, E-males received a second PHA injection in the same condition and legs thickness was measured 16 hours after injection. Males were then euthanized for blood sampling.

3.2. Blood sampling and leucocytes profiles

One drop of blood was smeared on a glass slide, air-dried and fixed with methanol. Blood smears were stained 30 min by immersion in May Grünwald-Giemsa (reference 320-07-1 and 320-31-1, RAL Reactive, Martillac, France). Identification and counting of different types of leucocyte were obtained with a light microscope oil immersion lens (1000X) in a monolayer-sector of the smear. Four types of leucocytes were considered: basophiles, monocytes, heterophiles and lymphocytes. We examined randomly selected and non-overlapping microscope fields in each smear and counted and identified leucocytes until a total of 100 white blood cells were reached (Fokidis et al. 2008). All slides were examined by a single observer (O.G) without knowledge of treatment that the samples were collected. Because it is often used to assess immunity, we examined the ratio of heterophils leucocytes to lymphocytes (H/L ratio). This measure is often used as an indicator of chronically elevated glucocorticoids resulting from “stressful” stimuli (Gross and Siegel 1986; Vleck et al. 2000; Bonier et al. 2007a), which can suppress lymphocyte numbers, in whole blood (Harmon 1998). Another measure of immunity is the total number of circulating leucocytes (total

leucocytes count = leucocyte numbers per 10 000 erythrocytes). Total leucocytes count (TLC) was obtained by counting the number of all erythrocytes in one microscopic visual field and multiplying it with the number of microscopic visual fields that were scanned in order to obtain 100 leucocytes, following Lobato et al. (2005) who found a high repeatability of this method. Count of lymphocytes which are important for T-cell mediated and antibody-mediated responses as well as nonspecific natural killer cell cytotoxicity and count of heterophiles which provide an important first line of defenses against bacterial infection were also analysed (Review in Grasman, 2002).

Data of experiment 3 were analyzed using Wilcoxon matched-pairs test to compare leg swelling between the first and the second injection and to compare H/L ratio and TLC after one or two PHA injection (R 2.12.1; R Development Core Team, 2010).

Results

Dose effect of PHA: experiment 1

The results of the different doses of PHA injection, as shown by the mean of increase in leg thickness over 48 hours, are illustrated in figure 1. The evolution of the leg thickness on 9 frogs injected with 20 µl of PBS revealed a swelling which occurred 2 hours after injection (ANOVA df=6, F=3.05, P=0.013; Fig. 1). This first peak of leg swelling also occurred with PHA whatever the dose used. The injection of 0.25 mg of PHA per individual induced similar increase of the leg thickness than this recorded with PBS injection (Fig. 1). On the contrary, the injection of 0.5 mg of PHA per individual produced a second increase of thickness reaching maximal value 0.34 mm (increase of 20 % on average) 12 hours after Injection. The amount of swelling induced by 1 mg of PHA was not different of results observed with 0.5 mg of this compound and remained stable until 24 hours after injection. Forty-eight hours after injection, the thickness of the leg was similar with the thickness of the thigh before PHA injection (ANOVA df=12, F=7.74, P<0.001). Because the two higher doses (0.5 and 1 mg) produced similar response times, we conducted all further trials with 0.5 mg/20µl.

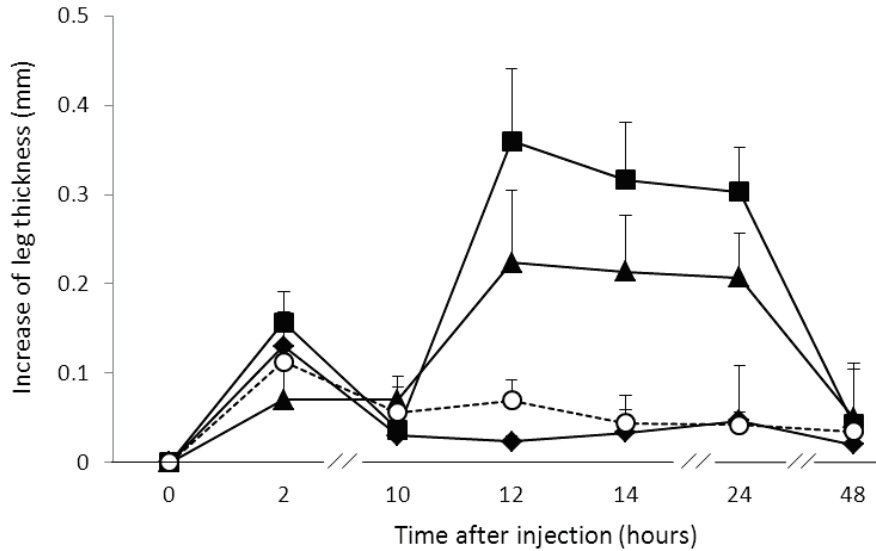


Figure 1. Increase (mean $\pm$ SEM) of leg thickness (mm) of *H. arborea* over 48h following injection of 0.25 (black diamond), 0.5 (black square) and 1 (black triangle) mg of PHA or 20 μ l of PBS (white circle).

Dynamics of the immune response: experiment 2

Results obtained on males injected with PBS (N=22) and with PHA (N=67) showed that the evolution of leg thickness in response to PHA injection differed among individuals and that the thickness of frog leg injected with PHA had significantly increased compared to frog thigh injected with PBS (parameter estimate = 0.21; DF = 86; $p < 0.001$, Fig. 2).

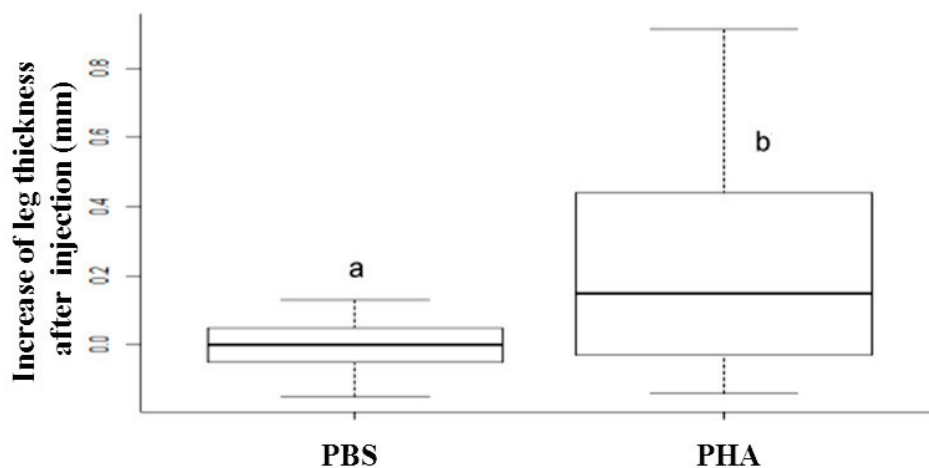


Figure 2. Increase (mean $\pm$ SEM) of leg thickness (mm) after injection of PBS or PHA (N=89).

Injection of PHA induced an inflammatory response in *H. arborea* that peaked since 14 hours after injection ($+0.21 \pm 0.18$ mm; Fig. 3) and remained stable afterwards. We can note that although the frog mass had a significant effect on the thickness leg before injection (parameter estimate 0.086; DF = 85; $P < 0.001$, fig 3A), the increase in leg thickness 14 hours after PHA injection was not correlated to the initial body mass (parameter estimate 0.03, $P = 0.09$, fig 3B).

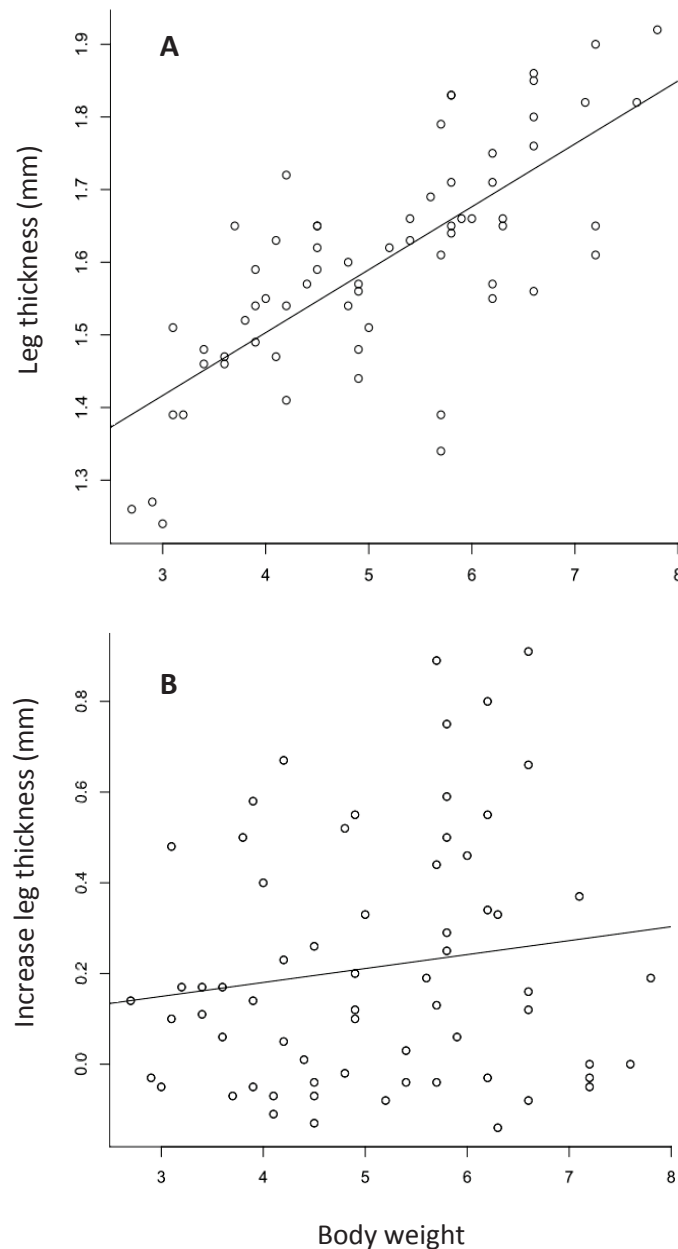


Figure 3. Leg thickness (mm) regressed on male mass before injection (A) and increase in leg thickness (mm) 14 hours after PHA injection regressed on male mass (B)

Validation of cellular immune response to PHA injection: Experiment 3

Before treatment leg thickness did not differ between groups ($W = 13$; $P = 0.78$). For both groups the first PHA injection induced significant swelling (all $P < 0.05$) and swelling intensity did not differ between groups ($W = 19$, $P = 0.925$). Ten days after the first injection, leg thickness of E-males went back to baseline ($W=9.5$, $P = 0.6$). After a second PHA injection, the swelling response was significantly more important in comparison with skin swelling observed at the first injection ($W=2$, $P=0.03$; Fig. 4).

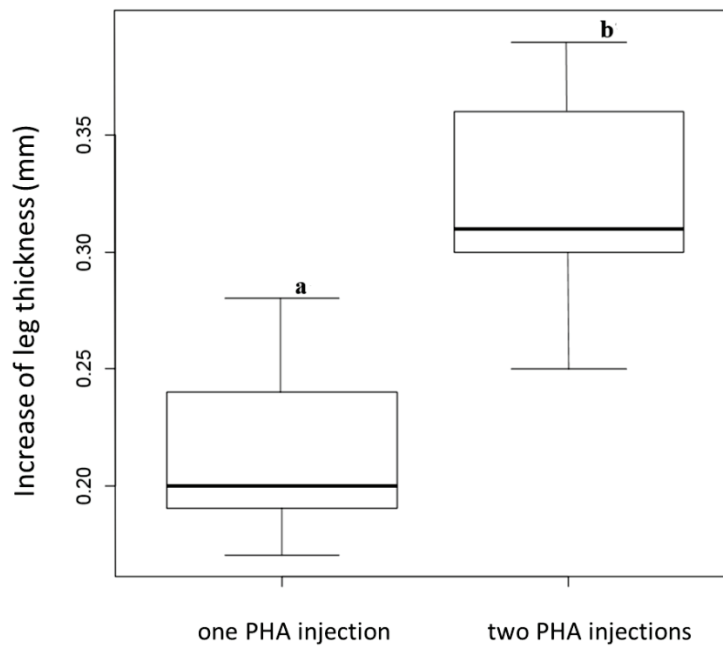


Figure 4. Increase of male leg thickness ((mean $\pm$ SEM) swelling (mm) after one or two PHA injection.

Hematological values presented in table 2 showed that two PHA injection lead to a higher leucocyte numbers per 10 000 erythrocytes ($W = 2$, $P = 0.04$; Table 2) than only one injection. Even if not significant, our results also show a higher H/L ratio for C-males compared to E-males ($W = 18$, $P = 0.06$; Table 2) and, we can note that the leg swelling after PHA injection was related to the TLC (parameter estimate =0.001, $P=0.06$).

Table 2. Cell counts (per 10 000 leucocytes) and H/L ratio recorded in blood sampled in *H. arborea* injected once (C-males) or twice (E-males) with PHA

Cell type (/10 000 erythrocytes)	C-males	E-males	<i>p</i> -value
	Mean $\pm$ SD	Mean $\pm$ SD	
H/L ratio	1.17 $\pm$ 0.24	0.72 $\pm$ 0.32	0.06
Leucocytes	63.35 $\pm$ 21.07	108.54 $\pm$ 36.03	0.04*
Lymphocytes	21.45 $\pm$ 4.72	55.44 $\pm$ 30.91	0.05*
Heterophiles	25.08 $\pm$ 12.66	32.75 $\pm$ 6.41	0.18

Discussion

Results obtained in this study suggested that PHA test is a suitable non-invasive method that can provide a measure of immunocompetence in *H. arborea*. After injection of PHA and PBS, a first peak of thickness, representing an increase on 15 %, rapidly occurred (2 hours on average). Only with a 0.5 and 1 mg/20 μ l of PHA injection, a second peak more intense (34 % of increase in leg thickness) occurred between 12 and 14 hours and remains stable until 24 hours after injection. Classically, the first peak will result in tissue damage due to the physical act of inserting a fine gauge sterile needle into the skin which initiates a response of the immune system. Then, PHA seems to engender a tissue damage reaction, followed by an adaptive response to it as a new antigen. Indeed, cytokines released from damages cells act as beacons for white blood cells (Kennedy and Nager 2006; Martin et al. 2006). Thus, there is a rapid recruitment and proliferation of white blood cells at the PHA injection site (Brown et al 2011) but not at the PBS injection site.

One approach to clarify the nature of immune system responses that underlie leg thickness changes after a PHA injection is to examine the cell types that accumulate at the injection site after one and two injections (Martin et al., 2006). In this study, even if it was only a trend, the swelling was linked to the proliferation of leucocyte. We have also shown that a second PHA injection induced a larger tissue swelling (49.7 % on average) than the first injection. In addition, TLC observed for E-males (2 injections) is considered more important than for C-males (1 injection) and the H/L ratio is higher for males injected only once, lymphocyte proportion is thus more important after a second injection. This suggests that the higher leukocyte number observed after the second PHA injection was due to a higher lymphocyte number. Taking together these results suggest that PHA responses can be associated with an acquired cell-mediated immune response. Indeed, because the cell-

mediated immune system has a memory and recognizes previously encountered antigens, it can mount a stronger response (higher leg thickness and higher lymphocytes proliferation in our case) if the same antigen is encountered again (Kennedy & Nager 2006; Tella et al. 2008).

Our results are in agreement with those obtained by Brown et al. (2011). Indeed, in their study, they showed that, in the cane toad *Rhinella marina*, PHA induces two swelling peaks. The first increase of leg thickness was observed 6 hours after PHA injection. This peak could be due to a rapid infiltration of eosinophils and neutrophils at the injection site and reveals a rapid innate immune response (Brown et al., 2011). In contrast, the second peak, more intense, of leg thickness which occurred 24 hours after PHA injection represented an influx of lymphocytes and may reflect cell-mediated immune activity. Even if the temporal evolution of white blood cells on the same animal after a PHA injection have not be measured in our study, the pattern of increase of the *H. arborea* leg in response to PHA injection seemed similar to the pattern observed with *R. marina* and blood analyses suggest the same processes. Although amphibians are an ancient lineage, immune traits are phylogenetically conservative (Zapata and Cooper, 1990). However, interspecific amphibian variation in the ability of lymphocytes to respond to PHA *in vitro* (e.g. Wiley and Meisner) suggests that comparing responses to PHA across species may be complicated by differences in investment among various immune components. A smaller swelling may not necessary indicate lower immunocompetence, but rather reflect a greater investment in the humoral rather than the cell-mediated immune system (Lee, 2006). However, results of experiment 2 in this study obtained with a consequent number of individuals clearly showed that the individuals respond with different amplitude (Fig. 2). Although different species may require slightly different methodologies, our results confirm that the PHA responses can provide a robust measure of anuran immune response.

One important constraint with the use of PHA is that is not a suitable technique for small size species (Brown et al., 2001). Though *H. arborea* was too small for toe web injection, we successfully injected PHA in leg and we reduce the number of measure by deleting the PBS control injection as suggested by Brown et al., 2011. By injecting only one leg and measuring leg thickness only once between 14 to 24 hours after injection, we can reduce handling time which causes an increase of stress hormone affecting immunosuppression (Martin et al., 2005). We also reduce the possibility of trauma during field work that may occur when injecting both one leg with PHA and the other with PBS.

There is now compelling evidence for mass deaths among amphibian populations in diverse geographic locations due to disease outbreaks associated with others environmental causes such as loses of habitat, pollution, increased temperature... (Phillips and Puschendorf 2013; Catenazzi et al. 2014). The pattern of losses appear to exceed normal population fluctuations and suggest one or more globally emerging diseases epidemics may place existing amphibian populations at risk of extinction (review in Carey et al. 1999). Although amphibians have effective and diverse immune defense, the failure of these defenses to prevent infections suggests that new disease agents may have recently emerged or that environmental stressors may be compromising the response of amphibian immune system. In addition to fundamental researches about host-pathogen interaction, and because immune response are highly variable depending on the context (season, sex, energy balance, individual stress...), field studies are indispensable to better understand the environment-immune interactions. The PHA test describe in this study will incorporate into field studies designed to assess threats to amphibian population viability.

Ethical note

Researchers obtained the European certificate that legally allows us to design and conduct experimental research work using live animal (and all work was done under approval of the ethic committee of Lyon 1 University (BH2012-15). In agreement with capture procedure, one week after manipulation, frogs were release *in natura* close their original pound.

Acknowledgement: We thank A. Clair, G. Mialdea and A. Dumet for their help with the breeding work.ECOAQUATRON

References

- Boughton RK, Joop G, Armitage SAO, 2011. Outdoor immunology: methodological considerations for ecologists. *Functional Ecology* 25:81-100.
- Broquet, T., Angelone, S., Jaquiere, J., Joly, P., Léna, J.P., Lengagne, T., Plénet, S., Luquet, E., Perrin, N., 2010 - Genetic Bottlenecks Driven by Population Disconnection. *Conservation Biology*, 24(6) : 1596-1605.

- Brown G, Shilton C, Shine R, 2011. Measuring amphibian immunocompetence: validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*. *Methods in Ecology and Evolution* 2:341-348.
- Carey C, Cohen N, Rollins-Smith L, 1999. Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology* 23:459-472.
- Catenazzi, A; Lehr, E; Vredenburg, VT.2014 Thermal Physiology, Disease, and Amphibian Declines on the Eastern Slopes of the Andes, *CONSERVATION BIOLOGY* Volume: 28 Issue: 2 Pages: 509-517
- Demas GE, Zysling DA, Beechler BR, Muehlenbein MP, French SS, 2011. Beyond phytohaemagglutinin: assessing vertebrate immune function across ecological contexts. *Journal of Animal Ecology* 80:710-730.
- Demas, G. E., Zysling, D. A., Beecher, B., Muehlenbein, M. P. and French, S. S. (2011). Beyond phytohemagglutinin: assessment of vertebrate immune function across ecological contexts. *Journal of Animal Ecology*, 80(4), 710-30.
- Duguet, R., & Melki, F. 2003. Les amphibiens de France, Belgique et Luxembourg. Collection Parthénopé, Ed. Biotopé, Mèze. 480p
- Fisher M, 2007. Potential interactions between amphibian immunity, infectious disease and climate change. *Animal Conservation* 10:420-421.
- Fokidis HB, EC Greiner, & P Deviche. 2008. Interspecific variation in avian blood parasites and hematology associated with the urban-rural gradient of a desert city. *Journal of Avian Biology* 39: 300-310.
- Folstad I, Karter A, 1992. Parasites, Bright Males, and the Immunocompetence Handicap. *American Naturalist*, v 139:603-622.
- Gervasi SS, Foufopoulos J, 2008. Costs of plasticity: responses to desiccation decrease post-metamorphic immune function in a pond-breeding amphibian. *Functional Ecology* 22:100-108.
- Gilbertson M-K, Haffner GD, Drouillard KG, Albert A, Dixon B, 2003. Immunosuppression in the northern leopard frog (*Rana pipiens*) induced by pesticide exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22:101-110.

- Guangchun C and Jacques R 2011 Antiviral Immunity in Amphibians, *Viruses* 2011, 3(11), 2065-2086;
- Grasman K, 2002. Assessing Immunological Function in Toxicological Studies of Avian Wildlife. *Integrative and Comparative Biology* 42:34-42.
- Gross, W.B. and P.B. Siegel, 1986: Effects of initial and second periods of fasting on heterophil / lymphocyte ratios and body weight. *Avian Dis.* 30, 345-346.
- Kennedy M, Nager R, 2006. The perils and prospects of using phytohaemagglutinin in evolutionary ecology *Trends in Ecology and Evolution* 21:653-655.
- Kinney KS, Cohen N., 2005. Increased splenocyte mitogenesis following sympathetic denervation in *Xenopus laevis*. *Developmental and comparative Immunology* 29, 287-293.
- Lobato E, Moreno J, Merino S, Sanz JJ, Arriero E (2005) Haematological variables are good predictors of recruitment in nestling pied flycatchers (*Ficedula hypoleuca*). *Ecoscience* 12:27–34
- Lochmiller R, Deerenberg C, 2000. Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88:87-98.
- Matson K, Cohen A, Klasing K, Ricklefs R, Scheuerlein A, 2006. No simple answers for ecological immunology: relationships among immune indices at the individual level break down at the species level in waterfowl. *Proceedings of the Royal Society B, London* 273:815-822.
- Martin LB, 2005; Trade-offs between molt and immune activity in two populations of House Sparrows (*Passer domesticus*) *Canadian Journal of Zoology* 83, 780-787.
- MARTIN LB, HAN P, LEWITTES J, KUHLMAN J, KLASING K, WIKELSK M, 2006. Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoecological technique *Functional Ecology* 20:290-299.
- Merino S., Martinez J., Møller A. P., Sanabria L., De Lope F., Pérez J., Rodrigues-Caabeiro F., 1999. Phytohaemagglutinin injection assay and physiological stress in nestling house martins. *Animal Behaviour* 58, 219-222
- Meylan S, Haussy C, Voituron Y, 2010. Physiological actions of corticosterone and its modulation by an immune challenge in reptiles. *General and Comparative Endocrinology* 169:158-166.

- Møller A, Saino N, 2004. Immune response and survival *Oikos* 104:299-304.
- Norris K, Evans MR 2000. Ecological immunology: life history trade-offs and immune defense in birds. *Behav. Ecol.* 11, 19-26
- Pigeon G, Bélisle M, Garant D, Cohen A, Pelletier F, 2013. Ecological immunology in a fluctuating environment: an integrative analysis of tree swallow nestling immune defense. *Ecology and Evolution* 3:1091-1103.
- Phillips, BL.; Puschendorf, R 2013. Do pathogens become more virulent as they spread? Evidence from the amphibian declines in Central America *PROCEEDINGS OF THE ROYAL SOCIETY B-BIOLOGICAL SCIENCES* Volume: 280 Issue: 1766 Article Number:20131290
- R Core Team (2010). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <http://www.R-project.org/>.
- Richardson, C., Léna, J.P., Joly P., **Lengagne, T.**, 2008 – Are leaders good mates ? A study of call timing and male quality in a chorus situation. *Animal Behaviour*, 76 : 1487-1495.
- Richardson, C., Popovici, J., Bellvert, F., Lengagne, T., 2009 – Conspicuous coloration of the vocal sac of a nocturnal chorusing treefrog : carotenoid-based ? *Amphibia-Reptilia*, 30 : 576-580.
- Scheldon BC, Verhulst S 1996. Ecological immunology : costly parasite defences and trade-offs in evolutionary ecology. *Tree* 11, 317-321
- Tella J, Lemus J, Carrete M, Blanco G, 2008. The PHA Test Reflects Acquired T-Cell Mediated Immunocompetence in Birds. *Plos one* 3(9): e3295.
- Venesky M, Wilcoxon T, Rensel M, Rollins-Smith L, Kerby J, Parris M, 2012. Dietary protein restriction impairs growth, immunity, and disease resistance in southern leopard frog tadpoles. *Oecologia* 169:23-31.
- Vinkler M, Bainova H, Albrecht T, 2010. Functional analysis of the skin-swelling response to phytohaemagglutinin. *Functional Ecology* 24:1081-1086.
- Vleck CM, Vertalino N, Vleck D, Bucher TL (2000) Stress, corticosterone and heterophil to lymphocyte ratios in free-living Adelie penguins. *Condor* 102:392–400

**Article 4: Traffic noise: a stressful event that reduce immune capacity
and colouration in the European treefrog *H. arborea*.**

Troïanowski M., Arcanjo C., Dumet A., Mondy N. & Lengagne T. (À soumettre)

Contexte :

Le bruit de trafic routier, en impactant les échanges sociaux mais aussi le bien-être des animaux, peut être une source de stress. Cette nuisance sonore est très répandue tant spatialement que temporellement ; les animaux seraient ainsi soumis à un stress chronique. À long terme, une élévation du niveau de stress peut induire une diminution des capacités immunitaires. De plus, une immunosuppression chez les individus soumis au bruit pourrait expliquer la perte de coloration observée en milieu bruyant. En effet, les caroténoïdes contenus dans le sac vocal possèdent des effets immunostimulants.

Hypothèses :

H6 : Une exposition chronique au bruit de trafic routier est un événement stressant et entraîne une immunosuppression.

H7 : L'immunosuppression en condition de bruit de trafic routier est due à de hauts niveaux de stress.

H8 : La perte de coloration est due à l'affaiblissement des capacités immunitaires.

Méthodes :

Nous avons réparti des mâles en trois lots : un lot en condition non stressante (« contrôle négatif »), un lot soumis à du bruit de trafic routier (« lot expérimental ») et un lot supplémenté en corticostérone (« contrôle positif »). Avant et après le traitement, nous avons effectué des mesures du niveau de corticostérone mais aussi de la coloration du sac vocal. Puis nous avons vérifié, par des mesures successives à la supplémentation, que les mâles du lot contrôle positif assimilent bien la corticostérone. Enfin, après les traitements, nous avons déterminé les capacités immunitaires des mâles par injection de PHA.

Résultats :

Le niveau de corticostérone a significativement augmenté après traitement pour le lot expérimental contrairement aux contrôles négatif et positif (bien qu'il y ait assimilation dans ce lot). Les réactions inflammatoires mesurées sont moins importantes pour les mâles du

lot expérimental et du lot contrôle positif par rapport aux mâles du lot contrôle négatif. De plus, la coloration des mâles de ces deux premiers lots diminue significativement. Enfin, il existe une forte tendance négative entre le niveau de stress et la réponse inflammatoire et aucune relation n'a été trouvée entre les capacités immunitaires et la perte de coloration.

Conclusions :

Le bruit de trafic routier provoque bien une augmentation du niveau de stress, une immunosuppression et une perte de coloration chez *H. arborea*. De plus, la corticostérone est bien assimilée mais non accumulée par les mâles du lot contrôle positif et cette supplémentation entraîne des résultats similaires à ceux observés chez les mâles du lot expérimental. Aussi, l'immunosuppression observée en condition bruyante est bien due à une élévation chronique du stress chez *H. arborea*. Cependant, cette immunosuppression n'explique pas la perte de coloration. Un impact combiné du stress sur l'immunité et du stress oxydant pourrait être à l'origine de cette perte de coloration.

Traffic noise: a stressful event that reduce immune capacity and colouration in the European treefrog *H. arborea*.

Troïanowski M., Arcanjo C., Dumet A., Mondy N. & Lengagne T.

INTRODUCTION

During past decades, road traffic has increased significantly to become one of the human activities with the strongest effects on the environment (Forman & Alexander 1998). One of the most important effects is noise pollution (Forman 2000, Jamrah et al. 2006) and several studies have investigated its impact on animal. Traffic noise presents an important challenge to species that communicate via acoustic signals due to its negative impact on the perception threshold (decrease of signal to noise ratio) (Bee & Swanson, 2007). Several studies suggest that this alteration might be an important cause of bird population decline near roads. This may be due to the key role of acoustic communication in behaviours such as reproduction, territory defence and predator detection (Reijnen et al. 1996; Rheindt 2003; Proppe et al. 2013). In many cases, vocal plasticity allows species to adapt their call structure to limit the noise masking effect. Depending on the species, emitters can increase the amplitude (Lombard effect) (Brumm 2004; Lowry et al. 2012), the duration (Love & Bee 2010) or the frequency of their signals (Slabbekoorn & Peet 2003; Nemeth & Brumm 2009; Parris & Schneider 2009).

However, traffic noise is more than an alteration of transmission channel characteristics, it is also a health threat that could decrease animal survival and could explain population decline. Many study performed on human show that a prolonged exposure to traffic noise lead to numerous health problem such as sleep disturbance (Skanberg & Ohrstrom 2006; Pirrera et al. 2010), myocardial infarction (Babisch 2008; Selander et al. 2009), hearing loss (Barbosa & Cardoso 2005) or stress (Prasher 1998; Babisch et al. 2001). While knowledge on the traffic noise impacts on human health is important, studies on non-human species are still very scarce. Indeed, although it was shown that laboratory species exposed to noise from different sources (vacuum or white noise for example) may have the same physiological troubles than those observed in human studies (Lenzi et al. 2003; Hu & Zheng 2008; Chloupek et al. 2008), almost nothing is know about traffic noise impacts on wild species health. It has been shown

that urban life might impacts animal physiology. Several species have higher baseline level of stress hormone in urban areas than conspecific living in rural habitat (Bonier et al. 2007; Zhang et al. 2011; Crino et al. 2011) and others present reduced immune capacity (Chavez-Zichinelli et al. 2013). Nevertheless, it is difficult to ensure that these physiological troubles are due to noise pollution because in many cases other parameters such as human disturbance, predator pressure or chemical pollution could also explain these results. Nonetheless, it was recently shown that an experimentally elevation of traffic noise lead to an elevation of stress level (Blickley et al. 2012 but see Crino et al. 2013). Indeed, after two month of treatment, lekking greater sage-grouse males (*Centrocercus urophasianus*) experimentally exposed to traffic noise showed a corticosterone (hormone commonly used to measure a stress response) level 16.7% higher than non-exposed ones. In the short term, a stress response is adaptive and has direct effects on behaviour, metabolism and energy allocation that enhance the probability of survival for an animal (Romero & Butler 2007). At the longer term (2-3 weeks), chronic stress can induce a maladaptive response and can lead to diseases such as diabetes, reproductive malfunction and immune suppression (Berger et al. 2005; Martin et al. 2005; Buchanan 2000; Wright et al. 2007). Indeed, corticosterone have many effects on immune system including inhibiting the synthesis, release and efficacy of cytokines; reducing activation and proliferation of T cells, B cells and macrophages; lowering the circulating level of lymphocytes or reducing the number of phagocytic cells at inflammation sites (Romero & Butler 2007; Martin 2009). Because traffic noise is widespread in space and time (Forman 2000; Jamrah et al. 2006), animal populations might experience a chronic stress level and could also face immunosuppression as observed in Chavez-Zichinelli et al. (2013). In addition, a high level of corticosterone can impact carotenoid-based coloration, with stressed animals becoming paler (Eraud et al. 2007; Martnez-Padilla et al. 2013). Carotenoids are pigments that animals cannot synthesize de novo which have multiple functions in addition to their role in coloration, including immune stimulation (Blount et al. 2003; McGraw & Ardia 2003). Their multiple functions mean there must be a trade-offs between ornamental carotenoid pigmentation and health function. Indeed, during an immune challenge, carotenoids may preferentially be used for immune function improvement rather than for coloration (Blount et al. 2003; Faivre et al. 2003; McGraw & Ardia 2003).

Here, we report the results of an experiment focussing on the impact of traffic noise on the European treefrog (*Hyla arborea* Linnaeus 1758). In this species it was shown that females mate discrimination is based on several acoustic parameters (Richardson & Lengagne 2010)

and on a carotenoid-dependent signal: the vocal sac coloration (Gomez al. 2009; Richardson et al. 2009). In addition, in a previous study we show that a chronic exposure to traffic noise induces a coloration lost (males become brighter after a chronic exposition to traffic noise) in *H. arborea* males (Troianowski et al. unpublished data). Nonetheless the precise mechanism explaining this coloration lost remains to be determined.

Through an experimental approach manipulating the endocrine status of animals this study attempts to determine the following: (i) if chronic exposure to traffic noise induces stress in *H. arborea*, (ii) if traffic noise may induces immunosuppression (iii) if high stress levels induces immune capacity modifications (iv) and, finally, if immunosuppression elicit a modification of vocal sac coloration.

MATERIAL AND METHODS

Capture and housing conditions

During the breeding season, 59 “naive” males (males never exposed to road traffic noise) were captured by hand when calling at the same pond located near Lyon, France, on the “Fondation Pierre Vérots” (N 45° 57' 24'' et E 4° 55' 14.6''). Males were transported by car in individual boxes to the housing room of our laboratory.

The duration of captivity was 14 days. Males were captured at day 0 (D0) and were immediately placed in individual terrariums (25x17x15 cm) with a water-filled basin and artificial foliage. The temperature was kept at $23.1 \pm 1.5^{\circ}\text{C}$. Each terrarium was placed under a fluorescent light (EXO TERRA Repti Glo 5.0) mimicking natural light (30% UVA and 5% UVB) with timers set for a photoperiod approximating natural conditions. Throughout their captivity, males were fed ad libitum with domestic crickets (*Acheta domesticus*).

After three days of acclimatisation (D1, D2 and D3), males were assigned to control (C-males; negative control; N=19), corticosterone-supplemented (S-males; positive control; N=20) or experimental groups (E-males; N=20) at random. This acclimatisation period is sufficient to observe natural calling behaviour in males (Brepson et al. 2013). Starting from the evening of D3, treatment lasted 10 days (see below). All males were released to the pond the night after the end of the experiment (D14).

Treatments

Males of the three groups were housed in the same conditions (see above for general characteristics) with the exception that E-males are housed in a separate room where traffic noise was broadcast (see “Playback files preparation” for acoustic conditions).

We manipulated circulating levels of corticosterone of S-males using a non-invasive method developed by Meylan et al. (2003). We diluted corticosterone (n° C2505, Sigma Aldrich®, Saint Louis, Missouri, US Sigma) in commercial pure sesame oil (3 µg corticosterone/ 1 µl oil). Corticosterone mixture was delivered transdermally to the treefrog. Then, we applied 4.5 µl of the hormone solution daily (D3 to D13) to the back of S-males. C- and E-males were treated similarly with 4.5 µl of sesame oil applied daily (10:00) during ten day. To ensure that corticosterone was assimilated by treefrogs, 23 additional males (separated in 11 C-males and 12 S-males) were captured to test corticosterone assimilation.

Playback files preparation

For the three groups, we broadcast treefrog chorus noises each night from 20:30 h to 00:30 h at 78 ± 1.4 dB(C-weighted) to reproduce the natural acoustic environment. For the chorus noise, we used an audio track from a previous study corresponding to calls produced by 10 males (Brepson et al. 2012). The experimental group was housed in a separate room wherein traffic noise was broadcast 24 hours a day at 76 ± 1.8 dB (value observed in the field during night; Bee & Swanson 2007, Pirrera et al. 2011) via an amplified loudspeaker (KH pas-100®, Sennheiser) connected to a CD player. The traffic noise audio file was prepared from recordings performed by the “Acoucity” team at a busy road near the city of Lyon (road N346). A Sennheiser microphone ME62-K6 was placed 10 meters from the road at a 1 m height and was connected to a SONY recorder. From a 1 h recording, a 20 min segment was selected and normalised to the same amplitude (mean ± 2 dB) using Avisoft software.

Hormone analyses

Corticosterone which is one of the most common hormones used to determine stress level in amphibians was analysed from saliva samples via enzyme-linked immunoassay (EIA) using protocols previously validated for amphibian (Janin et al. 2012). For the 59 males, saliva samples were performed on the pond (D0) and at the end of the experiment (D14). In

addition in order to validate the transdermal corticosterone assimilation, for the 23 additional males, saliva samples were performed before supplementation (T0) and, 30 minutes (T0.5), 1 (T1), 2 (T2) and 6 hours (T6) after supplementation for 4 S-males. In order to measure the effect of the frog manipulation on the corticosterone level, the same protocol was applied on 4 C-males at each time scale.

Briefly, within 3 min after the capture, a dry cotton ball of known weight was inserted into the frog's mouth during 30 seconds to collect saliva. Each cotton ball was immediately weight, put in a microtube equipped with a filter to retain the cotton fibre during centrifugation and stored at -80°C. Samples were reconstituted by addition of 150 µL of enzyme immunobuffer to the microtube and centrifugation of the cotton balls at 8000 rpm for 5 min at room temperature. Sample were diluted further and used for corticosterone analysis, which was carried out in duplicate with a colometric 96-well EIA assay kit (number 500651, Cayman Chemical Company). The concentration of corticosterone in saliva samples was calculated using a standard curve run in duplicate on each plate. We estimated the corticosterone concentration in 1 mg of saliva by dividing the measure in samples by the amount of collected saliva. A saliva pool from *H. arborea* was included as internal control of each plate.

Immune capacity measurement

Immune response was measured with a phytohemagglutinin (PHA) skin test. The PHA test is designed to quantify an animal's ability to mount a cell-mediated immune response (Martin et al. 2006; Brown et al. 2011) by injecting a small amount of PHA solution into an area of skin and measuring the thickness of the resultant swelling. According to a preliminary study (Josserand et al., unpublished data), 1 mg of PHA-P (n° L8754, Sigma Aldrich®, Saint Louis, Missouri, US Sigma) was diluted with 20 µl of sterile phosphate-buffered saline (PBS; n° 231.791.2, Sigma Aldrich®, Saint Louis, Missouri, US) to make an injectable solution. Using a 0.25 mL syringe (Hamilton Microliter #725) we injected 20 µl of this solution intramuscular in the right leg skin of each frog. We used a dial thickness gauge (Mitutoyo, ID-C112, NEUSS – Germany) to measure the thickness of leg skin prior to injection and 16 hours after injection (according to Josserand et al., unpublished data). After 3 seconds of contact with the leg muscle, three readings of thickness were taken in quick succession (with the gauge removed between each of these readings) and averaged to give a mean thickness value for each leg skin before and after injection.

Coloration measurement

The vocal sac coloration of each male was measured with reflectance spectrometry before and after the experiment (D1 and D14). We used a spectrometer (AvaSpec-3648SPU2, Avantes) with an Avantes AvaLight-DHS deuterium halogen light source lamp emitting in the range 200–1500 nm. The coaxial optic fibre (FCR-7UV200- 2-45, Avantes) had a terminal area (2 x 3 mm) cut at 45° to avoid specular reflectance and was protected by a silica window that guaranteed a constant distance between the detector and the measured patch. All spectra were taken relative to the dark and to a Spectralon white standard (Ocean Optics) and were then computed with software provided by Avantes. We took three reflectance spectra on the deflated vocal sac of each male. We averaged all of the spectra taken for a given individual before analysis. We analysed male vocal sac reflectance spectra using AVICOL, version 4 (Gomez 2010). Hue characteristics did not show any substantial variation among individuals (Gomez et al. 2011), and consequently, we retained only chroma and brightness to characterise male coloration. We computed the colour descriptors over the range 350–700 nm, which was likely best suited to the frog range of sensitivity (Kennedy and Milkman 1956). We computed brightness (mean light intensity) as the mean reflectance over this range and chroma (spectral purity) as the difference between maximal and minimal reflectance divided by the average reflectance.

Statistical analysis

We analysed the temporal variation in colour, skin thickness and corticosterone levels using linear mixed models, with the individual and the date of capture as a random effect, and the treatment (control, corticosterone-supplemented, experimental), the time (D1, D14) as fixed effects. We used linear regression to test a potential impact of corticosterone on immune capacity evolution (skin swelling) and to test a potential impact of immune capacity on vocal sac colouration (brightness and chroma) changes. In the first case we used the corticosterone evolution (corticosterone D14 – corticosterone D0) as fixed effect corrected by the mass of the males. In the second case we used the skin thickness (thickness D14 – thickness D13) as fixed effect corrected by the mass of the males. For corticosterone assimilation, we used Wilcoxon matched-pairs test to compare corticosterone level between groups. All analyses were performed using R 2.15.1 statistical analysis software (R development Core Team, 2010).

Ethical Note

The population from which the individuals were collected belongs to a metapopulation consisting of more than thousands treefrogs. Hence, our sampling did not significantly affect reproduction of the population. The transport from the natural habitat to the laboratory last approximately 45 minutes. During the transport, each male are placed in individual terrariums (25x17x15 cm). No effect of transport on health or mortality was observed. Experiments were performed in the EcoAquatron (approved by the Veterinary Services: approval number 692661201, University of Lyon 1). After the experiment, all males were examined by the EcoAquatron staff. No one of them showed weight loss and all males were in good condition and did not show any diseases symptoms.

RESULTS

Corticosterone assimilation

In a preliminary test, in order to check the corticosterone assimilation in our experiment, we measure the temporal assimilation of corticosterone after the application. Before supplementation, C- and S- males do not show any difference in stress level ($W = 45$, $P > 0.9$). Concerning C-group, males were significantly more stressed 1 and 2 hours after sesame oil application ($W = 2$, $P < 0.01$ and $W = 1$, $P < 0.05$ respectively) probably due to manipulation. Concerning E-group, males showed a significant increase of stress level 30 minutes to 6 hours post supplementation (all $P < 0.05$). Moreover, E-males were significantly more stressed than C-males at each time scale after supplementation (all $P < 0.05$, Fig. 1)).

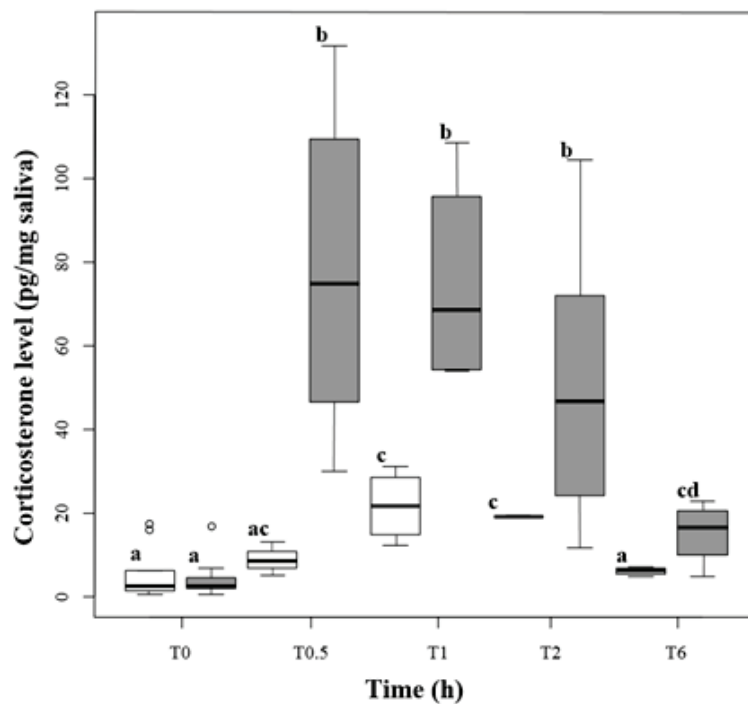


Figure 1. Corticosterone assimilation. Corticosterone level is presented both for C (white boxes) and S-males (grey boxes) before supplementation (T0) and 30 minutes (T0.5), 1 (T1), 2 (T2) and 6 hours (T6) after supplementation. At T0, corticosterone levels are similar between C and S-males. For S-Males, corticosterone level significantly rises at T0.5 when C-males corticosterone level do not show any change. This result confirms fast assimilation of corticosterone. Even if C-males show a significant rise of corticosterone at T1 (probably due to manipulation) corticosterone level is higher for S-males at each time scale after supplementation. 6 hours after supplementation corticosterone level is still high for S-males when it came back to baseline in C-males. Different letters represent significant difference between groups.

Impact of treatments on animal corticosterone level

Before the experiments start, there is no significant difference in corticosterone level between groups (all $P > 0.726$). In contrast, at the end of the experiment, our results show a significant effect of traffic noise exposure on stress level compared to control group (estimate $\pm$ SE = 3.387 ± 1.252 , Wald z test: $P = 0.009$). Surprisingly, no significant effect of corticosterone supplementation was detected (estimate $\pm$ SE = 1.703 ± 1.229 , Wald z test: $P = 0.1715$). Indeed, a significant increase of corticosterone level was observed in E-group (estimate $\pm$ SE = 2.027 ± 0.89 , Wald z test: $P = 0.027$) while there was no significant change in C- and S-

groups (estimate $\pm$ SE = -1.36 ± 0.87 , Wald z test: $P = 0.1282$; estimate $\pm$ SE = 0.344 ± 0.858 , Wald z test: $P = 0.69$ respectively) (Fig. 2).

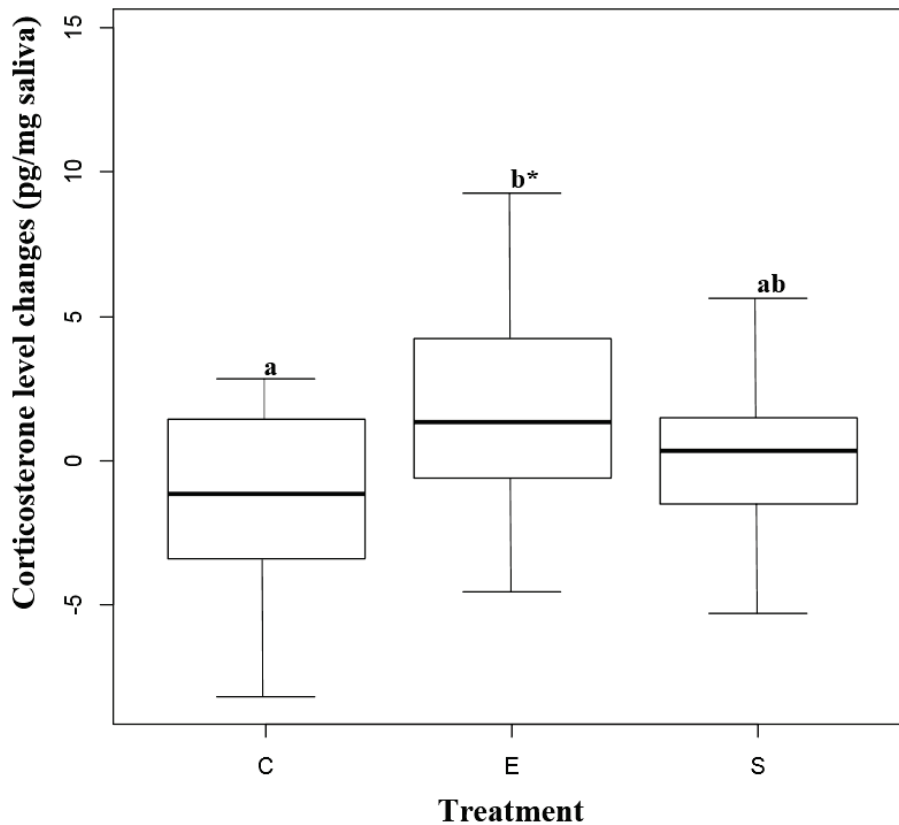


Figure 2. Modification of corticosterone level due to traffic noise exposure in *H. arborea*.

Changes in corticosterone between the first and last days of the experiment (D13-D1) are presented for each group (horizontal line: median value, box ends: upper and lower quartiles, whiskers: maximum and minimum values). Corticosterone level changes are different between C-and E-groups and we observed a significant increase of corticosterone in E-groups ($P < 0.001$). Different letters (a and b) represent significant difference between treatments, * represent a significant change in a treatment.

Impact of treatments on immune response

Before PHA injection, males from different groups did not present significant difference in skin thickness (all $P > 0.11$). In addition, a significant skin swelling was observed for the three groups (all $P < 1.10^{-4}$). Nonetheless, a significant effect of traffic noise exposure and corticosterone supplementation on immune response intensity was found compared to the control group. Indeed, both males of E and S-groups show an immune response significantly less important than C-males (estimate $\pm$ SE = -0.034 ± 0.012 , Wald z test: $P = 0.0067$;

estimate $\pm$ SE = -0.033 ± 0.012 , Wald z test: $P = 0.0079$ respectively) (See Figure 3). When testing for an impact of corticosterone change on skin swelling we found a tendency for a negative correlation between these two variables (Estimate $\pm$ SE = -0.017 ± 0.009 , $P = 0.091$).

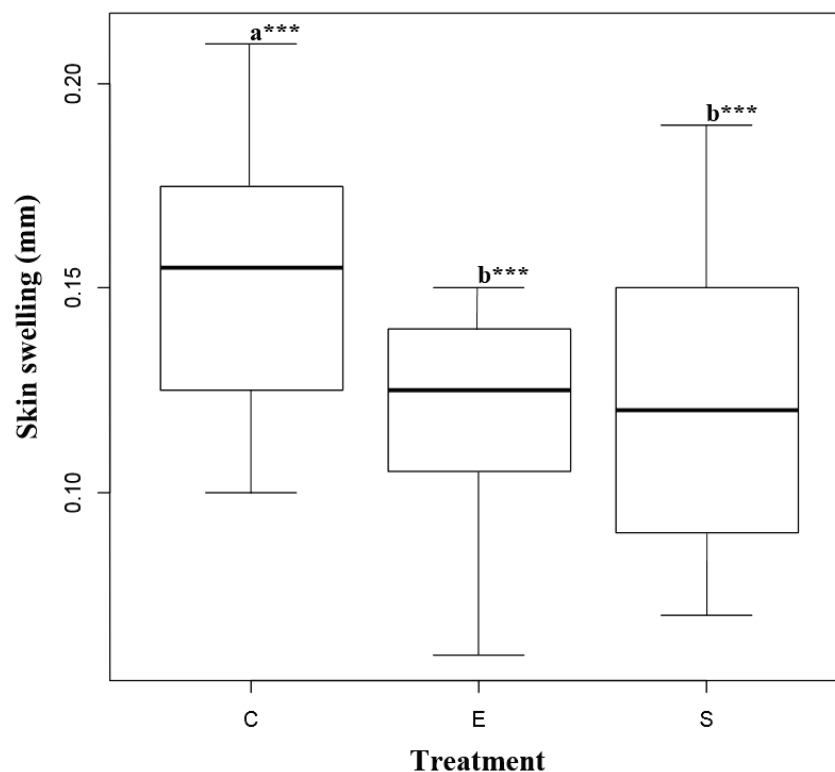


Figure 3. Impact of treatments on immune response. Skin swelling is presented for each group (horizontal line: median value, box ends: upper and lower quartiles, whiskers: maximum and minimum values). PHA injection induces significant swelling in all groups nonetheless swelling intensity is significantly less important in E- and S-groups. Different letters (a and b) represent significant difference between treatments, * represent a significant change in a treatment.

Impact of treatments on colouration

Concerning brightness characteristics, before the start of the experiment there was no significant difference between groups (all $P > 0.495$). Our results showed a significant effect of traffic noise exposition and corticosterone supplementation on brightness changes (estimate $\pm$ SE = 0.855 ± 0.28 , Wald z test: $P = 0.0035$; estimate $\pm$ SE = 0.842 ± 0.28 , Wald z test: $P = 0.004$ respectively). Indeed, while brightness in C-group did not significantly change (estimate $\pm$ SE = 0.032 ± 0.206 , Wald z test: $P = 0.877$), males of E- and S-group became significantly brighter (estimate $\pm$ SE = 0.887 ± 0.19 , Wald z test: $P < 1.10^{-4}$; estimate $\pm$ SE = 0.873 ± 0.19 , Wald z test: $P < 1.10^{-4}$ respectively) (Figure 4).

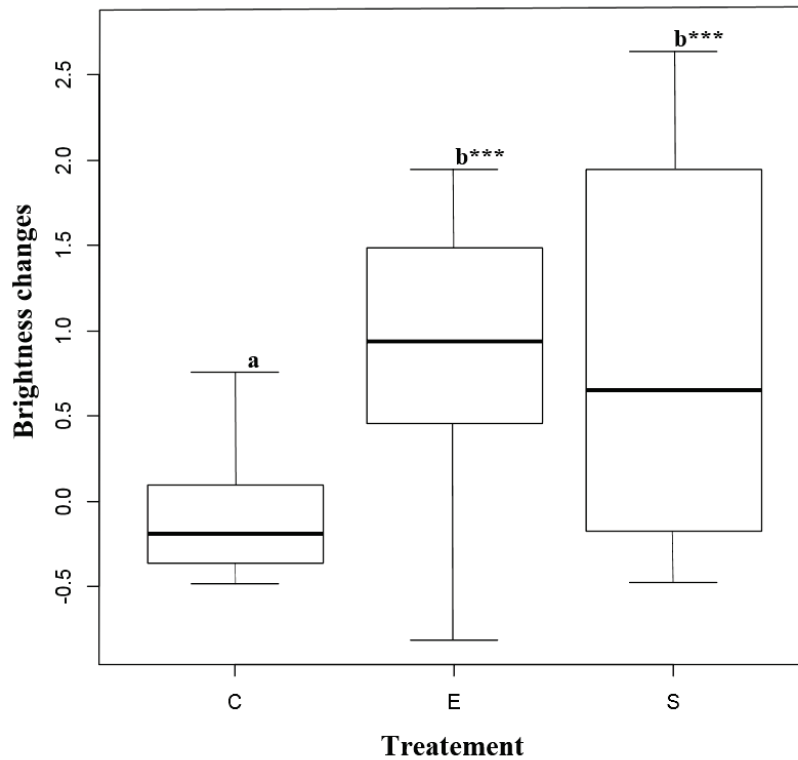


Figure 4. Brihtness lost due to treatments. Changes in brightness between the first and last days of the experiment (D13-D1) are presented for the three groups (horizontal line: median value, box ends: upper and lower quartiles, whiskers: maximum and minimum values). Positive value indicates colour loss while negative values indicate males that grew darker during the experiment. Brightness change was significantly different between C-group and E- and S-groups which became significantly brighter. Different letters (a and b) represent significant difference between treatments, * represent a significant change in a treatment.

Concerning chroma characteristics, there is no differences between groups before treatments (all $P > 0.456$). In addition, our results indicate that there is no effect of treatments on chroma evolution (all $P > 0.293$). Nonetheless, whereas chroma does not significantly decrease in C-groups (estimate $\pm$ SE = -0.062 ± 0.081 , Wald z test: $P = 0.443$), a significant decrease of this parameters was observed both in E and S-groups (estimate $\pm$ SE = -0.175 ± 0.075 , Wald z test: $P = 0.023$; estimate $\pm$ SE = -0.181 ± 0.076 , Wald z test: $P = 0.022$ respectively) (see Figure 5).

Both for brightness and chroma characteristics, no significant relationship whit skin swelling was found (all $P > 0.129$).

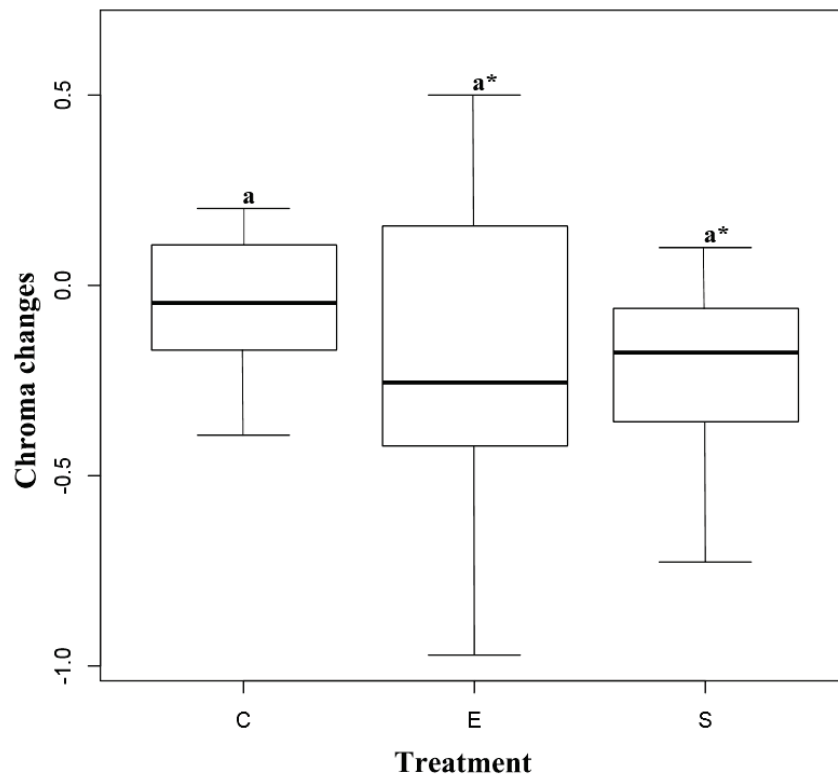


Figure 5. Chroma lost due to treatments. Changes in chroma between the first and last days of the experiment (D13-D1) are presented for the three groups (horizontal line: median value, box ends: upper and lower quartiles, whiskers: maximum and minimum values). Negative values indicate chroma loss. Chroma change was not different between groups (same letter for each group) but E- and S-groups show a significant decrease of chroma.

Both for brightness and chroma characteristics, no significant relationship with skin swelling was found (all $P > 0.129$).

DISCUSSION

In the present study, we tested the physiological effects of traffic noise on *H. arborea*. Indeed, a long term exposure to noise might be stressful for animals and thus might have immunosuppressive effects (Wright et al. 2007; Kight & Swaddle, 2011).

Our results showed that C-males do not show any change in corticosterone level suggesting that the housing conditions were not stressful for *H. arborea* whereas several studies have shown that captivity may be a stressful event for wild species (Morgan & Tromborg 2007; Dickens et al. 2009; Narayan et al. 2011). We can thus conclude that, in our housing condition, traffic noise is stressful for this wild species. In addition, a significant

impact of traffic noise exposure on corticosterone level, E-males exhibiting a significant increase of corticosterone level (+ 63.5%). Our results were in agreement with the recent experimental findings in lekking greater sage-grouse males (*Centrocercus urophasianus*) in which traffic noise increases stress level (Blickley et al. 2012). Because of its masking effect, traffic noise might be a threat for species using acoustic communication in social interaction. For instance, traffic noise may alter the efficiency of antipredator adaptations such as the perception of alarm signals, or it may reduce the distance between individuals in many species (Quinn et al. 2006; Chan et al. 2010). In addition, in the present study, traffic noise was broadcast round the clock and it seems thus probable that this noise affects the treefrog activity during this long period (resting, eating, basking...) and thus the well-being of animal (independently of its acoustic characteristics) which can become anxious and stressed (Wright et al. 2007). Surprisingly, our results also show that S-males were not more stressed after experiment. There could be two explanations: (i) males did not assimilate corticosterone contained in mixture, (ii) males did not accumulate corticosterone during treatment. With our corticosterone assimilation test, we showed that there is a significant increase of corticosterone level 30 minutes after supplementation and that corticosterone level is still high 6 hours post supplementation contrary to the control males who experienced only the manipulation. These results suggest that *H. arborea* assimilate corticosterone but do not accumulate it. Thus, although stress level of S-males did not rise after treatment, these males experiment a high stress level during several hours (6 hours after supplementation, corticosterone level of S-males is still four time higher than corticosterone level observed in E-males after treatment) and this could explain that immune response and coloration changes are similar in the two groups after ten days.

To test immune capacity, we measure skin swelling in response to PHA injection. Such injection is designed to quantify an animal's ability to mount a cell-mediated immune response (Martin et al. 2006; Tella et al. 2008; Brown et al. 2011). Because the cell-mediated immune system has a memory and recognizes previously encountered antigens, it can mount a stronger response if the same antigen is encountered again (Kennedy & Nager 2006; Tella et al. 2008). We then choose to measure immune response only once (at the end of the experiment) rather than twice (before and after experiment) because the second injection can lead to a greater skin swelling than the first one (see for example Brown et al. 2011). Hence, each animal is not its own control and we compared responses obtained by each group at the end of the experiment. Nevertheless, we assume that there is no difference in immune capacity between groups before treatment because there is no difference in measures

performed on body condition (mass and length), stress or colouration (brightness and chroma) between groups before treatment and it seems unlikely that groups differed only for immune capacity before treatment. Our results show that, whatever the treatment group, PHA injection induces an immune response with a significant skin swelling in each group. Nonetheless, there is a significant impact of treatment on swelling intensity. Indeed, skin swelling in E- and S-group is significantly less important than swelling observed for C-group (see figure 3). This result, in addition to the negative correlation between stress and immune response that we found (even if not significant), suggests that traffic noise impacts immune response through the immunosuppressive effect of corticosterone demonstrated in several studies (Saino et al. 2003; Martin et al. 2005; Lucas & French 2012). Road traffic noise, via its immunosuppressive effect, might be an important threat for amphibian community. Indeed, Carey et al. (1999) state that, in addition to habitat destruction or global warming, pathogens sensitivity and thus immunosuppression is an important source of amphibian populations decline observed through the world. Since, the impact of immunosuppression on amphibian survival was largely confirmed (Harvell et al. 2002 ; Lips et al. 2006 ; Pounds et al. 2006).

Finally, we showed that both traffic noise exposure and corticosterone supplementation negatively impact *H. arborea* vocal sac coloration. Indeed, males of these two treatment groups become brighter and less chromatic after treatment. This coloration lost was in agreement with our previous finding (Troianowski et al. in submission) and confirm that traffic noise can impact visual signalling in addition to acoustic communication. In the case of *H. arborea*, such coloration lost might impact sexual selection. Indeed, it was shown repeatedly that females preferentially mate with dark red males (Gomez et al. 2009; 2010). Thus, traffic noise might negatively impacts sexual selection by making males less attractive. Negative impact of traffic noise on sexual selection might be, in consequence, more important than previously thought. Indeed, it is now well known that traffic noise impacts acoustic communication (Laiolo 2010) nonetheless, in several species, female also used visual signals based on carotenoid for mate selection (Bourne et al., 2003; Karino & Shinjo, 2004; Taff et al. 2012; Toomey & McGraw 2012). Thus, traffic might impact sexual selection in a larger number of species than previously thought by altering both acoustic and visual communication. In addition, by its negative impact on immune system, traffic noise might lead to a higher parasitic load in animal and, in consequence, to a lower reproductive success (Hamilton & Zuk 1982; Korpimäki et al. 1995; Cramer & Cameron 2007)

Although we show that traffic noise, by itself, impacts male colouration the precise mechanism leading to such coloration lost remained to be found. Indeed, we don't find any

direct relation between colouration lost and immunosuppression. In addition to their immunosuppressive effect, stress-related hormones are involved in individual oxidative stress (Zafir & Banu, 2009; Costantini et al. 2008). In an experimental study, Costantini et al. (2008) showed that dietary administration of corticosterone caused a 32% increase of reactive oxygen metabolites in adult kestrels (*Falco tinnunculus*). This result has been confirmed by a recent meta-analysis (Costantini et al., 2011) showing that high corticosterone levels over a short period (4 days) can lead to an increase in oxidative stress in vertebrates. Furthermore, a study in mice (*Mus musculus*) showed that exposure to white noise increases oxidative stress level and has a negative impact on immune functions (Zheng & Ariizumi 2007). Because carotenoids are important stimulator of antioxidant processes ((Blount et al., 2003; McGraw & Ardia, 2003; Monaghan et al. 2009) and it was shown that carotenoid-based signals reflect animal oxidative status (Alonso-Alvarez & Galvan 2011; Grunst et al. 2014) they may be used for immunostimulation but also for antioxidant function rather than for colouration. So, it seems possible that colouration lost observed in the present study might be due to an effect of traffic noise on both immune capacity and oxidative stress. Further investigations are needed to test a potential effect of immunosuppression combined with oxidative stress on visual signals. Furthermore, as many species exhibit carotenoid-based signals, traffic noise may have a larger impact on wildlife than previously thought and we encourage future works to focus on these species for an overall estimation of traffic noise impact on wildlife.

ACKNOWLEDGMENTS

We warmly thank the “Fondation Pierre Vérots” for giving us access to the field site. This study was supported by a grant from the Conseil Général d’Isère.

REFERENCES

ALONSO-ALVAREZ, C. & GALVAN, I. (2011). Free Radical Exposure Creates Paler Carotenoid-Based Ornaments: A Possible Interaction in the Expression of Black and Red Traits. — Plos One 6, 8.

- BABISCH, W., FROMME, H., BEYER, A. & ISING, H. (2001). Increased catecholamine levels in urine in subjects exposed to road traffic noise - The role of stress hormones in noise research. — *Environment International* 26, 475-481.
- BABISCH, W. (2008). Road traffic noise and cardiovascular risk. — *Noise & Health* 10, 27-33.
- BARBOSA, A. S. M. & CARDOSO, M. R. A. (2005). Hearing loss among workers exposed to road traffic noise in the city of Sao Paulo in Brazil. — *Auris Nasus Larynx* 32, 17-21.
- BEE, M. A. & SWANSON, E. M. (2007). Auditory masking of anuran advertisement calls by road traffic noise. — *Animal Behaviour* 74, 1765-1776.
- BERGER, S., MARTIN, L. B., WIKELSKI, M., ROMERO, L. M., KALKO, E. K. V., VITOUSEK, M. N. & RODL, T. (2005). Corticosterone suppresses immune activity in territorial Galapagos marine iguanas during reproduction. — *Hormones and Behavior* 47, 419-429.
- BLICKLEY, J. L., WORD, K. R., KRAKAUER, A. H., PHILLIPS, J. L., SELLS, S. N., TAFF, C. C., WINGFIELD, J. C. & PATRICELLI, G. L. (2012). Experimental Chronic Noise Is Related to Elevated Fecal Corticosteroid Metabolites in Lekking Male Greater Sage-Grouse (*Centrocercus urophasianus*). — *PloS one* 7, e50462.
- BLOUNT, J. D., METCALFE, N. B., BIRKHEAD, T. R. & SURAI, P. F. (2003). Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. — *Science* 300, 125-127.
- BONIER, F., MARTIN, P. R., SHELDON, K. S., JENSEN, J. P., FOLTZ, S. L. & WINGFIELD, J. C. (2007). Sex-specific consequences of life in the city. — *Behavioral Ecology* 18, 121-129.
- BOURNE, G. R., BREDEN, F. & ALLEN, T. C. (2003). Females prefer carotenoid colored males as mates in the pentamorphic livebearing fish, *Poecilia parae*. — *Naturwissenschaften* 90, 402-405.
- BREPSON, L., TROIANOWSKI, M., VOITURON, Y. & LENGAGNE, T. (2012). Cheating for sex: inherent disadvantage or energetic constraint? — *Animal Behaviour* 84, 1253-1260.
- BREPSON, L., VOITURON, Y. & LENGAGNE, T. (2013). Condition-dependent ways to manage acoustic signals under energetic constraint in a tree frog. — *Behavioral Ecology* 24, 488-496.

- BROWN, G. P., SHILTON, C. M. & SHINE, R. (2011). Measuring amphibian immunocompetence: validation of the phytohemagglutinin skin-swelling assay in the cane toad, *Rhinella marina*. — *Methods in Ecology and Evolution* 2, 341-348.
- BRUMM, H. (2004). The impact of environmental noise on song amplitude in a territorial bird. — *Journal of Animal Ecology* 73, 434-440.
- BUCHANAN, K. L. (2000). Stress and the evolution of condition-dependent signals. — *Trends in Ecology & Evolution* 15, 156-160.
- CHAN, A., GIRALDO-PEREZ, P., SMITH, S. & BLUMSTEIN, D. T. (2011). Anthropogenic noise affects risk assessment and attention: the distracted prey hypothesis. — *Biology Letters* 6, 458-461.
- CHAVEZ-ZICHINELLI, C. A., MACGREGOR-FORS, I., QUESADA, J., ROHANA, P. T., ROMANO, M. C., VALDEZ, R. & SCHONDUBE, J. E. (2013). HOW STRESSED ARE BIRDS IN AN URBANIZING LANDSCAPE? RELATIONSHIPS BETWEEN THE PHYSIOLOGY OF BIRDS AND THREE LEVELS OF HABITAT ALTERATION. — *Condor* 115, 84-92.
- CHLOUPEK, P., VOŠLÁROVA, E., CHLOUPEK, J., BEDANOVA, I., PISTEKOVA, V. & VECEREK, V. (2009). Stress in Broiler Chickens Due to Acute Noise Exposure. — *Acta Veterinaria Brno* 78, 93-98.
- COSTANTINI, D., FANFANI, A. & DELL'OMO, G. (2008). Effects of corticosteroids on oxidative damage and circulating carotenoids in captive adult kestrels (*Falco tinnunculus*). — *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 178, 829-835.
- COSTANTINI, D., MARASCO, V. & MOLLER, A. P. (2011). A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. — *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* 181, 447-456.
- CRINO, O. L., JOHNSON, E. E., BLICKLEY, J. L., PATRICELLI, G. L. & BREUNER, C. W. (2013). Effects of experimentally elevated traffic noise on nestling white-crowned sparrow stress physiology, immune function and life history. — *Journal of Experimental Biology* 216, 2055-2062.
- CRINO, O. L., VAN OORSCHOT, B. K., JOHNSON, E. E., MALISCH, J. L. & BREUNER, C. W. (2011). Proximity to a high traffic road: Glucocorticoid and life history consequences for nestling white-crowned sparrows. — *General and Comparative Endocrinology* 173, 323-332.

- DICKENS, M. J., EARLE, K. A. & ROMERO, L. M. (2009). Initial transference of wild birds to captivity alters stress physiology. — *General and Comparative Endocrinology* 160, 76-83.
- ERAUD, C., DEVEVEY, G., GAILLARD, M., PROST, J., SORCI, G. & FAIVRE, B. (2007). Environmental stress affects the expression of a carotenoid-based sexual trait in male zebra finches. — *Journal of Experimental Biology* 210, 3571-3578.
- FAIVRE, B., GREGOIRE, A., PREAULT, M., CEZILLY, F. & SORCI, G. (2003). Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. — *Science* 300, 103-103.
- FORMAN, R. T. T. (2000). Estimate of the area affected ecologically by the road system in the United States. — *Conservation Biology* 14, 31-35.
- FORMAN, R. T. T. & ALEXANDER, L. E. (1998). Roads and their major ecological effects. — *Annual Review of Ecology and Systematics* 29, 207-+.
- GOMEZ, D., RICHARDSON, C., LENGAGNE, T., DEREX, M., PLENET, S., JOLY, P., LENA, J. P. & THERY, M. (2010). Support for a role of colour vision in mate choice in the nocturnal European treefrog (*Hyla arborea*). — *Behaviour* 147, 1753-1768.
- GOMEZ, D., RICHARDSON, C., LENGAGNE, T., PLENET, S., JOLY, P., LENA, J. P. & THERY, M. (2009). The role of nocturnal vision in mate choice: females prefer conspicuous males in the European tree frog (*Hyla arborea*). — *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 276, 2351-2358.
- GOMEZ, D., THERY, M., GAUTHIER, A. L. & LENGAGNE, T. (2011). Costly help of audiovisual bimodality for female mate choice in a nocturnal anuran (*Hyla arborea*). — *Behavioral Ecology* 22, 889-898.
- GRUNST, A. S., SALGADO-ORTIZ, J., ROTENBERRY, J. T. & GRUNST, M. L. (2014). Phaeomelanin- and carotenoid-based pigmentation reflect oxidative status in two populations of the yellow warbler (*Setophaga petechia*). — *Behavioral Ecology and Sociobiology* 68, 669-680.
- HU, B. H. & ZHENG, G. L. (2008). Membrane disruption: An early event of hair cell apoptosis induced by exposure to intense noise. — *Brain Research* 1239, 107-118.
- JAMRAH, A., AL-OMARI, A. & SHARABI, R. (2006). Evaluation of traffic noise pollution in Amman, Jordan. — *Environmental Monitoring and Assessment* 120, 499-525.
- JANIN, A., LENA, J. P., DEBLOIS, S. & JOLY, P. (2012). Use of Stress-Hormone Levels and Habitat Selection to Assess Functional Connectivity of a Landscape for an Amphibian. — *Conservation Biology* 26, 923-931.

- KARINO, K. & SHINJO, S. (2004). Female mate preference based on male orange spot patterns in the feral guppy *Poecilia reticulata* in Japan. — *Ichthyological Research* 51, 316-320.
- KENNEDY, M. W. & NAGER, R. G. (2006). The perils and prospects of using phytohaemagglutinin in evolutionary ecology. — *Trends in Ecology & Evolution* 21, 653-655.
- KENNEDY, D. & MILKMAN, R. D. (1956). SELECTIVE LIGHT ABSORPTION BY THE LENSES OF LOWER VERTEBRATES, AND ITS INFLUENCE ON SPECTRAL SENSITIVITY. — *Biological Bulletin* 111, 375-386.
- KIGHT, C. R. & SWADDLE, J. P. (2011). How and why environmental noise impacts animals: an integrative, mechanistic review. — *Ecology Letters* 14, 1052-1061.
- LAILOLO, P. (2010). The emerging significance of bioacoustics in animal species conservation. — *Biological Conservation* 143, 1635-1645.
- LENZI, P., FRENZILLI, G., GESI, M., FERRUCCI, M., LAZZERI, G., FORNAI, F. & NIGRO, M. (2003). DNA damage associated with ultrastructural alterations in rat myocardium after loud noise exposure. — *Environmental Health Perspectives* 111, 467-471.
- LOVE, E. K. & BEE, M. A. (2010). An experimental test of noise-dependent voice amplitude regulation in Cope's grey treefrog, *Hyla chrysoscelis*. — *Animal Behaviour* 80, 509-515.
- LOWRY, H., LILL, A. & WONG, B. B. M. (2012). How Noisy Does a Noisy Miner Have to Be? Amplitude Adjustments of Alarm Calls in an Avian Urban 'Adapter'. — *Plos One* 7, 5.
- LUCAS, L. D. & FRENCH, S. S. (2012). Stress-Induced Tradeoffs in a Free-Living Lizard across a Variable Landscape: Consequences for Individuals and Populations. — *Plos One* 7, 10.
- MARTIN, L. B., GILLIAM, J., HAN, P., LEE, K. & WIKELSKI, M. (2005). Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, *Passer domesticus*. — *General and Comparative Endocrinology* 140, 126-135.
- MARTIN, L. B., HAN, P., LEWITTES, J., KUHLMAN, J. R., KLASING, K. C. & WIKELSKI, M. (2006). Phytohemagglutinin-induced skin swelling in birds: histological support for a classic immunoeological technique. — *Functional Ecology* 20, 290-299.

- MARTIN, L. B. (2009). Stress and immunity in wild vertebrates: Timing is everything. — *General and Comparative Endocrinology* 163, 70-76.
- MARTNEZ-PADILLA, J., MOUGEOT, F., GARCIA, J. T., ARROYO, B. & BORTOLOTTI, G. R. (2013). FEATHER CORTICOSTERONE LEVELS AND CAROTENOID-BASED COLORATION IN COMMON BUZZARD (*BUTEO BUTEO*) NESTLINGS. — *Journal of Raptor Research* 47, 161-173.
- MCGRAW, K. J. & ARDIA, D. R. (2003). Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: An experimental test. — *American Naturalist* 162, 704-712.
- MEYLAN, S., DUFTY, A. M. & CLOBERT, J. (2003). The effect of transdermal corticosterone application on plasma corticosterone levels in pregnant *Lacerta vivipara*. — *Comparative Biochemistry and Physiology a-Molecular & Integrative Physiology* 134, 497-503.
- MONAGHAN, P., METCALFE, N. B. & TORRES, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. — *Ecology Letters* 12, 75-92.
- MORGAN, K. N. & TROMBORG, C. T. (2007). Sources of stress in captivity. — *Applied Animal Behaviour Science* 102, 262-302.
- NARAYAN, E. J., COCKREM, J. F. & HERO, J. M. Urinary corticosterone metabolite responses to capture and captivity in the cane toad (*Rhinella marina*). — *General and Comparative Endocrinology* 173, 371-377.
- NEMETH, E. & BRUMM, H. (2009). Blackbirds sing higher-pitched songs in cities: adaptation to habitat acoustics or side-effect of urbanization? — *Animal Behaviour* 78, 637-641.
- PARRIS, K. M. & SCHNEIDER, A. (2009). Impacts of Traffic Noise and Traffic Volume on Birds of Roadside Habitats. — *Ecology and Society* 14, 23.
- PIRRERA, S., DE VALCK, E. & CLUYDTS, R. (2010). Nocturnal road traffic noise: A review on its assessment and consequences on sleep and health. — *Environment International* 36, 492-498.
- PRASHER, D. (1998). Traffic noise increases stress by driving up cortisol. — *Lancet* 352, 1201-1201.
- PROPPE, D. S., STURDY, C. B. & ST CLAIR, C. C. (2013). Anthropogenic noise decreases urban songbird diversity and may contribute to homogenization. — *Global Change Biology* 19, 1075-1084.

- QUINN, J. L., WHITTINGHAM, M. J., BUTLER, S. J. & CRESSWELL, W. (2006). Noise, predation risk compensation and vigilance in the chaffinch *Fringilla coelebs*. — *Journal of Avian Biology* 37, 601-608.
- REIJNEN, R., FOPPEN, R. & MEEUWSEN, H. (1996). The effects of traffic on the density of breeding birds in Dutch agricultural grasslands. — *Biological Conservation* 75, 255-260.
- RHEINDT, F. E. (2003). The impact of roads on birds: Does song frequency play a role in determining susceptibility to noise pollution? — *Journal Fur Ornithologie* 144, 295-306.
- RICHARDSON, C. & LENGAGNE, T. (2010). Multiple signals and male spacing affect female preference at cocktail parties in treefrogs. — *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* 277, 1247-1252.
- RICHARDSON, C., POPOVICI, J., BELLVERT, F. & LENGAGNE, T. (2009). Conspicuous colouration of the vocal sac of a nocturnal chorusing treefrog: carotenoid-based? — *Amphibia-Reptilia* 30, 576-580.
- ROMERO, L. M. & BUTLER, L. K. (2007). Endocrinology of stress. — *International Journal of Comparative Psychology* 20, 89-95.
- SAINO, N., SUFFRITTI, C., MARTINELLI, R., RUBOLINI, D. & MOLLER, A. P. (2003). Immune response covaries with corticosterone plasma levels under experimentally stressful conditions in nestling barn swallows (*Hirundo rustica*). — *Behavioral Ecology* 14, 318-325.
- SELANDER, J., NILSSON, M. E., BLUHM, G., ROSENLUND, M., LINDQVIST, M., NISE, G. & PERSHAGEN, G. (2009). Long-Term Exposure to Road Traffic Noise and Myocardial Infarction. — *Epidemiology* 20, 272-279.
- SKANBERG, A. & OHRSTROM, E. (2006). Sleep disturbances from road traffic noise: A comparison between laboratory and field settings. — *Journal of Sound and Vibration* 290, 3-16.
- SLABBEKOORN, H. & PEET, M. (2003). Ecology: Birds sing at a higher pitch in urban noise - Great tits hit the high notes to ensure that their mating calls are heard above the city's din. — *Nature* 424, 267-267.
- STRASSER, E. H. & HEATH, J. A. (2013). Reproductive failure of a human-tolerant species, the American kestrel, is associated with stress and human disturbance. — *Journal of Applied Ecology* 50, 912-919.

- TAFF, C. C., STEINBERGER, D., CLARK, C., BELINSKY, K., SACKS, H., FREEMAN-GALLANT, C. R., DUNN, P. O. & WHITTINGHAM, L. A. (2012). Multimodal sexual selection in a warbler: plumage and song are related to different fitness components. — *Animal Behaviour* 84, 813-821.
- TELLA, J. L., LEMUS, J. A., CARRETE, M. & BLANCO, G. (2008). The PHA Test Reflects Acquired T-Cell Mediated Immunocompetence in Birds. — *Plos One* 3, 9.
- TOOMEY, M. B. & MCGRAW, K. J. (2012). Mate choice for a male carotenoid-based ornament is linked to female dietary carotenoid intake and accumulation. — *Bmc Evolutionary Biology* 12, 12.
- WRIGHT, A. J., SOTO, N. A., BALDWIN, N. A., BATESON, M., BEALE, C. M., CLARK, C., DEAK, T., EDWARDS, E. F., FERNANDEZ, A., GODINHO, A., HATCH, L. T., KAKUSCHKE, A., LUSSEAU, D., D., M., ROMERO, L. M., WEILGART, L. S., WINTLE, B. A., NOTARBARTOLO-DI-SCIARA, G. & VIDAL, M. (2007). Anthropogenic Noise as a Stressor in Animals: A Multidisciplinary Perspective. — *International Journal of Comparative Psychology* 20, 250-273.
- ZAFIR, A. & BANU, N. (2009). Modulation of in vivo oxidative status by exogenous corticosterone and restraint stress in rats. — *Stress-the International Journal on the Biology of Stress* 12, 167-177.
- ZHANG, S. P., LEI, F. M., LIU, S. L., LI, D. M., CHEN, C. & WANG, P. Z. (2011). Variation in baseline corticosterone levels of Tree Sparrow (*Passer montanus*) populations along an urban gradient in Beijing, China. — *Journal of Ornithology* 152, 801-806.
- ZHENG, K. C. & ARIIZUMI, M. (2007). Modulations of immune functions and oxidative status induced by noise stress. — *Journal of Occupational Health* 49, 32-38.

DISCUSSION

D) Communication et bruit de trafic routier : adaptation à long terme ou plasticité ?

Le bruit de trafic routier est le bruit d'origine anthropique le plus important en milieu terrestre (Forman, 2000) et se caractérise par de hauts niveaux de bruit à très basses fréquences (Warren et al. 2006 ; Wood & Yezerinac, 2006 ; Pohl et al. 2009). Face à cette nouvelle perturbation sonore, de nombreuses modifications de la structure des chants mais aussi du comportement ont été observées (Laiolo, 2010 ; Slabbekoorn, 2013). Ainsi, chez de nombreuses espèces, il a été montré que les individus vivant en ville, ou dans des milieux perturbés par le bruit de trafic routier, émettent des chants plus aigus, plus puissants ou plus longs que leurs congénères vivant dans des zones calmes (Slabbekoorn & Peet, 2003 ; Brumm, 2004 ; Hamao et al. 2011). Ces études corrélatives ne permettent cependant pas de déterminer si de telles modifications sont dues à une forte pression de sélection et donc à une évolution à long terme des signaux (sélection de petits mâles aux fréquences aigus par exemple) ou à une réponse plastique de la part des individus. Pourtant, certains indices laissent suggérer qu'il s'agit bien là d'une réponse à court terme des individus. Par exemple, développer une forte plasticité nécessite un fort développement cérébral (Crusio et al. 1993 ; Biegler et al. 2001 ; Changizi, 2003). En effet, il existe une relation positive entre la taille de l'hypothalamus et les capacités d'apprentissage (Biegler et al. 2001). Or, il a été montré que les espèces d'oiseaux adaptées à la vie urbaine possèdent un cerveau plus volumineux que celles vivant en milieu rural (Maklakov et al. 2011 ; Sol et al. 2013) ce qui permet probablement une forte plasticité vocale.

Au cours de ma thèse, afin de déterminer si une réponse à court terme existe chez *H. arborea*, j'ai expérimentalement exposé des mâles à du bruit de trafic routier et déterminé s'ils étaient capables de modifier la structure de leurs chants rapidement face à cette perturbation acoustique. Cette méthodologie permet d'isoler le bruit de tout autre effet confondant et donc de tester spécifiquement l'effet du bruit de trafic routier sur l'émission des signaux acoustiques. Dans nos conditions expérimentales, les mâles ne modifient pas la structure de leurs chants (vitesse d'émission, durée ou fréquence) en réponse à la diffusion de bruit de trafic routier. Pourtant, chez certaines espèces, une telle plasticité vocale a été montrée (Halfwerk & Slabbekoorn, 2009 ; Verzijden et al. 2010). Par exemple, de manière

similaire aux tests que j'ai effectués, Bermudez-Cuamatzin et al. (2011) ont enregistré les chants de rosélins familiers (*Carpodacus mexicanus*) sous différents niveaux de bruit : en condition de faible nuisance sonore tout d'abord (44-57 dB) puis en condition de forte nuisance sonore (56-65 dB). Les résultats montrent que les individus étudiés augmentent la fréquence de leurs chants pendant la diffusion de bruit de trafic puis réémettent des chants à leurs fréquences d'origine lorsque la nuisance sonore cesse. De plus, chez les anoures, comme cela a été montré chez les oiseaux, les modifications de la fréquence du chant seraient dues à de la plasticité vocale. En effet, Parris et al. (2009) ont montré que les individus de rainettes brunes et de grenouillettes communes émettent des signaux plus aigus en milieu bruyant qu'en milieu silencieux, bien que les individus en milieu bruyant ne soient pas plus petits que ceux en milieu silencieux. Il n'y aurait donc pas eu sélection des individus plus petits chantant plus aigus. De plus, Cunningham & Fahrig (2010) ont montré expérimentalement que les anoures, dont les fréquences étaient différentes entre les sites bruyants et silencieux, sont capables d'augmenter la fréquence de leurs chants durant la diffusion de bruit de trafic routier. Ainsi, certains anoures peuvent bien faire preuve de plasticité vocale bien que le chant chez ces espèces soit considéré comme inné et stéréotypé. D'un point de vue mécanistique, deux solutions peuvent expliquer la modification de la fréquence des chants à court terme. D'une part, Halfwerk & Slabbekoorn (2009) ont démontré que chez la mésange charbonnière l'augmentation de fréquence du chant est due à une sélection de notes aiguës dans le répertoire de chant : lors de la diffusion de bruit de trafic routier, les mésanges vont chanter moins de notes graves et émettre davantage de notes aiguës (Figure 6 a.). Bermudez-Cuamatzin et al. (2011) ont quant à eux démontré que le roselin familial chante les mêmes notes en conditions de faibles et de fortes nuisances sonores mais augmentent la fréquence fondamentale de ces notes en présence de bruit (Figure 6 b.). Dans le cas des anoures, les individus possèdent généralement un répertoire très simple ne leur permettant pas de sélectionner les notes les plus aiguës en réponse au bruit de trafic routier. La plasticité observée serait donc due à un mécanisme d'augmentation de la fréquence du chant sans sélection de notes (Figure 6 b.).

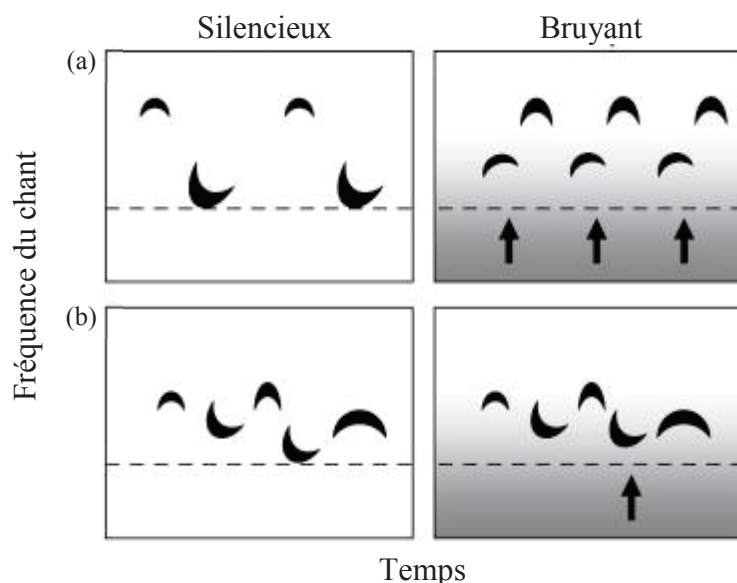


Figure 6. Mécanismes expliquant l'augmentation de fréquences observée en condition bruyante. (a) Mécanisme de sélection des notes comparable à celui observé chez la mésange charbonnière. (b) Mécanisme d'augmentation de fréquence des notes comparable à celui observé chez le roselin familial. D'après Slabbekoorn 2013.

Ces différentes études démontrent que les anoues peuvent répondre de manières rapides à de nouvelles perturbations sonores. Comment dès lors expliquer que, chez *H. arborea*, les mâles ne modifient pas la structure de leurs chants à court terme ? Deux explications pourraient être avancées : (1) comme dans le cas de l'étude de Cunningham et Fahrig (2009), seules les espèces dont le chant est grandement masqué par le bruit de trafic routier modifient leurs chants. Or, chez la rainette verte, le chant est composé de deux pics de fréquences. Un premier vers 1800 Hz complètement masqué par le bruit de trafic et un deuxième plus énergétique vers 2800 Hz très peu masqué. Dès lors, les mâles n'auraient pas la nécessité de modifier la structure de leurs chants pour communiquer efficacement en milieu bruyant. (2) les mâles ne possèdent pas une plasticité vocale suffisante pour modifier leurs chants à court terme. La capacité des individus à modifier leurs comportements rapidement en réponse à des changements environnementaux provient d'un processus de sélection important. En effet, une meilleure plasticité, qui permet une maximisation du nombre de réponses comportementales possibles (afin de pouvoir répondre de manière adaptée à un maximum de conditions environnementales), nécessite une complexification du réseau neuronal (Snell-Rood, 2013). Si, au cours de l'évolution, les espèces n'ont pas été confrontées à un environnement acoustique très variable, une telle complexification du réseau neuronal n'a pas pu avoir lieu et les individus ne peuvent pas faire preuve de plasticité vocale (Stephens, 1991 ;

Moran, 1992 ; Mery & Burns, 2010 ; Snell-Rood, 2013). Cependant, les résultats que j'ai obtenus lors des tests de l'impact du bruit de trafic routier sur les critères de sélection des femelles laissent penser que l'absence de modifications de la structure du chant chez les mâles s'explique par le fait que le bruit n'est pas assez contraignant. Tout d'abord, les femelles ne sélectionnent pas davantage les mâles aux chants aigus en condition de bruit de trafic routier. Or, des études ont montré qu'une augmentation de la fréquence des signaux permet d'augmenter la portée du signal en condition bruyante (Parris et al. 2009 ; Nemeth & Brumm, 2010 ; Pohl et al. 2012) et que les femelles détectent mieux et sélectionnent ces signaux aigus en présence de bruit de trafic routier (Halfwerk et al. 2011a ; Pohl et al. 2012 ; des Aunay et al. 2014). De plus, j'ai montré que les femelles ne mettent pas plus de temps pour effectuer leurs choix de partenaires en milieu bruyant qu'en milieu silencieux, même si le bruit qui masque le signal devrait rendre les choix effectués par les femelles plus longs et moins précis (Bee & Swanson, 2007). Ensemble, ces résultats suggèrent que la perception des signaux acoustiques n'est pas impactée et donc que le bruit de trafic routier n'est pas une contrainte acoustique importante chez *H. arborea*.

II) Conséquences de la pollution sonore sur les comportements liés à la reproduction.

Alors que certaines espèces ont réussi à s'établir avec succès dans les milieux perturbés par le bruit de trafic routier, certaines autres sont exclues de ces milieux (Rheindt, 2003 ; Peris & Pescador, 2004 ; Parris & Schneider, 2009). Il en résulte une forte homogénéité dans la diversité d'espèces rencontrées dans différentes villes. Ce phénomène est appelé « homogénéisation urbaine de l'avifaune » (Clergeau et al. 2006 ; McKinney, 2006 ; Devictor et al. 2007). Une telle diminution de la diversité d'espèces pourrait s'expliquer en partie par l'impact du bruit de trafic routier sur la reproduction. La communication acoustique joue un rôle déterminant dans les comportements de reproduction que ce soit pour la détection des sites de reproductions ou des partenaires sexuels, ou encore pour l'estimation de la qualité et le choix de ces derniers. Le bruit de trafic routier, en masquant la communication acoustique, pourrait avoir un impact important sur la reproduction.

Tout d'abord, les femelles doivent détecter les sites et/ou les territoires de reproduction. Le bruit peut directement impacter la perception des signaux à longues distances en impliquant une baisse de l'activité de chants des individus comme cela a été montré chez de nombreuses espèces d'anoues (Sun & Narins, 2005 ; Lengagne, 2008 ;

Cunnington & Fahrig, 2011). Par exemple, Sun et Narins (2005) ont soumis des chœurs de quatre espèces d'anoures (*Microhyla butleri*, *Rana nigrovittata*, *Kaloula pulchra* et *Rana taipehensis*) à différents bruits d'origine anthropique et ont montré que trois espèces d'anoures diminuent significativement leur activité de chant. Chez les anoures, les mâles se réunissent généralement en chœur et chantent pour attirer les femelles sur le site de reproduction. Une diminution de l'activité de chant en réponse au bruit de trafic routier aurait donc un impact important sur la détectabilité des sites de reproduction par les femelles et pourrait donc impacter le maintien des populations en zones bruyantes. De plus, chez certaines espèces, le territoire de reproduction représente un critère important dans le choix de partenaires et il est donc indispensable que les femelles puissent détecter facilement les mâles et que ceux-ci puissent défendre efficacement leur territoire. Les mâles défendent un territoire pour avoir accès aux meilleures ressources alimentaires et/ou aux meilleurs sites de reproduction (Slabbekoorn & Ripmeester, 2008). Les caractéristiques du chant telles que la taille du répertoire ou la fréquence des signaux peuvent transmettre des informations sur la capacité des mâles à se battre mais aussi sur leur motivation à se défendre (Ten Cate et al. 2002 ; Ripmeester et al. 2007). Une transmission efficace des signaux permet donc de prévenir les potentiels compétiteurs de ne pas approcher et de garder son territoire tout en évitant les conflits (Slabbekoorn & Ripmeester, 2008). Le bruit de trafic routier, en filtrant les basses fréquences des vocalisations, pourrait alors impacter l'efficacité de la défense du territoire car les potentiels compétiteurs pourraient ne pas percevoir le mâle ou le percevoir de moins bonne qualité que ce qu'il n'est.

Une fois sur le site de reproduction, les femelles doivent localiser spécifiquement les mâles. Or, le bruit de trafic routier rend la détection et la localisation de ces derniers par les femelles plus difficiles (Bee & Swanson, 2007 ; Pohl et al. 2009). Au cours de mes travaux de thèse, j'ai montré que la détection des signaux acoustiques par les femelles n'est pas impactée. Le temps nécessaire pour choisir un mâle (et donc estimer sa qualité) n'est pas plus long en condition de bruit de trafic routier qu'en condition silencieuse. Pourtant, dans leur étude, Pohl et al. (2009) ont testé la capacité de mésanges charbonnières (*P. major*) à détecter un signal acoustique en condition silencieuse ou en présence de bruit. Les auteurs ont ainsi mis en évidence qu'en condition de bruit de trafic routier le seuil de détection du signal est de 18 dB plus élevé qu'en condition silencieuse. Chez *H. arborea*, ces seuils de détection ne sont pas connus mais il est possible que le ratio signal/bruit (80/74 dB) n'impacte pas le seuil de détection en milieu bruyant. Ces difficultés de détection des signaux pourraient être à l'origine du faible succès reproducteur observé chez le bruant des roseaux (*Emberiza*

schoeniclus) (Gross et al. 2010). En effet, chez cette espèce, 43,2 % des mâles ne trouvent pas de partenaires sexuelles dans des zones perturbées par le bruit de trafic routier contre seulement 7,8 % pour les mâles vivant en zones silencieuses. De plus, les individus ne trouvant pas de partenaires sont ceux émettant des chants graves recouverts par le bruit de trafic routier.

À courte distance, lorsque les femelles ont détecté et localisé les mâles, le bruit de trafic routier peut impacter leurs capacités à discriminer et évaluer la qualité de ces derniers. Bien qu'au cours de ma thèse je n'aie pas mis en évidence que les signaux aigus sont mieux perçus en condition de bruit de trafic routier, des études menées sur les oiseaux ont montré l'inverse (Halfwerk et al. 2011a ; Pohl et al. 2012). Effectivement, chez le canari (*Serinus canariales*), les femelles choisissent préférentiellement les mâles aux chants graves en condition silencieuse mais choisissent les mâles aux chants aigus en condition bruyante (des Aunay et al. 2014). La fréquence du chant est généralement un signal reflétant honnêtement la taille des mâles (de Orense & Tejedo-Madueno, 1990 ; Gerhardt, 1994 ; May-Collado et al. 2007 ; Martin et al. 2011) dont la femelle peut tirer des bénéfices directs et indirects (Bourne, 1993 ; Doty and Welch, 2001 ; Moya-Larano & Fox 2006 ; Prokop et al. 2012 ; Woodgate et al. 2012), le bruit favoriserait donc les mâles de petites tailles ayant des chants plus aigus. Au cours de ma thèse, j'ai de plus cherché à déterminer la capacité des femelles à effectuer un shift multimodal en réponse à la diffusion de bruit de trafic routier. Utiliser des signaux, dont la transmission et la perception ne sont pas impactées par le bruit de trafic routier, permettrait à la femelle de toujours percevoir des informations sur la qualité des mâles (Rowe, 1999 ; Candolin, 2003 ; Hebets & Papaj, 2005 ; Partan & Marler, 2005 ; Uetz et al. 2009). En réponse au bruit de trafic routier, les femelles *H. arborea* ne basent pas davantage leur choix de partenaires sur la coloration du sac vocal. Cependant, Partan et al. (2010) ont montré que les populations d'écureuils gris (*Sciurus carolinensis*) vivant en milieu urbain utilisent plus les signaux visuels (mouvements de queue) que les individus vivant en milieu rural. Cela qui suggère que le bruit de trafic routier peut favoriser l'utilisation des signaux visuels pour communiquer. En condition urbaine et en milieux perturbés par le bruit de trafic routier, les systèmes de communications pourraient donc évoluer vers un développement des signaux visuels, afin de maintenir une communication efficace, mais aussi vers des individus de petites tailles aux chants aigus plus audibles.

Enfin, lorsque le choix de partenaires sexuels a été effectué, le bruit de trafic routier peut impacter le succès reproducteur des individus. Au cours de ma thèse, bien que je n'aie pas montré que les femelles détectent mieux les mâles aux chants aigus moins attractifs, j'ai

démontré que le bruit de trafic routier par lui-même rend les mâles plus pâles. Or, chez *H. arborea* (Gomez et al. 2009 ; 2010) ainsi que chez de nombreuses espèces, les traits sexuels colorés interviennent dans le choix de partenaires effectué par les femelles, les mâles les plus colorés étant généralement sélectionnés (Dawson & Bortolotti, 2006 ; Mougeot et al. 2010). Ainsi, le bruit de trafic routier, en impactant les signaux colorés, rendrait les mâles moins attractifs pour les femelles. De tels impacts viennent s'ajouter à ceux déjà bien connus sur la communication acoustique chez les oiseaux. En effet, en condition de bruit de trafic routier, les mâles aux chants aigus et donc de qualité moindre sont mieux perçus. Or, chez certaines espèces, l'investissement des femelles dans la ponte dépend de la qualité des mâles (Holveck & Riebel, 2009). Les femelles, n'ayant accès qu'à des mâles de moins bonne qualité, investiraient alors moins d'énergie dans la production des œufs ainsi que dans les soins parentaux (Halfwerk et al. 2011b). Il a ainsi été montré que, dans les milieux perturbés par le bruit de trafic routier, la taille des pontes est moins importante et que le nombre d'oisillons quittant le nid est moins important qu'en milieu silencieux (Halfwerk et al. 2011b, Kight et al. 2012). Par exemple, chez la mésange charbonnière (*P.major*), les femelles en milieu perturbé par le bruit de trafic routier pondent en moyenne 10 % d'œufs en moins que leurs congénères des zones silencieuses. De plus, chez les anoues, la fréquence du chant est directement liée à la taille des individus, les mâles les plus gros émettant les chants les plus graves (de Orense & Tejedo-Madueno, 1990 ; Richardson et al. 2010).

III) Le bruit de trafic routier : une menace physiologique

La présence d'espèces en milieu bruyant ne signifie pas que ces espèces ne sont pas impactées et qu'il n'y a pas de coûts à vivre dans ce milieu. En effet, certaines espèces en milieux urbains montrent par exemple un haut niveau de stress (Ruiz et al. 2002 ; Bonier et al. 2007 ; Zhang et al. 2011, Strasser & Health, 2013) et de faibles défenses immunitaires (Lucas & French, 2012). Le bruit de trafic routier pourrait en partie expliquer ces observations. En effet, au cours de ma thèse, j'ai exposé expérimentalement des mâles rainettes à 74 dB de bruit pendant 10 jours et montré que cette exposition entraînait une augmentation du niveau de corticostérone d'environ 64 %. Deux autres études ont déterminé expérimentalement les effets physiologiques d'une exposition chronique à du bruit de trafic routier sur la faune sauvage. Ainsi, chez le tétras des armoises (*C. urophasianus*), une exposition chronique à du bruit de trafic routier (51.7 ± 0.8 dBA) pendant environ deux mois et demi entraîne une

augmentation du niveau de corticostérone de l'ordre de 17 % (Blickley et al. 2012a), alors qu'une exposition à du bruit (60 dBA) pendant 5 jours n'implique aucun stress chez les bruants à couronne blanche des montagnes juvéniles (*Zonotrichia leucophrys oriantha*) (Crino et al. 2013). Il est possible que le fait que Crino et al. (2013) n'aient pas observé d'augmentation du niveau de stress dans leurs études soit dû au fait que leur exposition au bruit de trafic routier était trop courte. Cependant, mes propres résultats ainsi que ceux de Blickley et al. (2012) montrent que les hauts niveaux de stress observés en milieu urbain sont dus en partie au bruit de trafic routier. Si une augmentation du taux de corticostérone sur le court terme est adaptatif (réallocation des ressources, comportement de fuite...), un haut taux de corticostérone est maladaptatif sur le long terme. En effet, de nombreux effets délétères ont été observés. Par exemple, la corticostérone inhibe la croissance (les individus seront donc plus petits et potentiellement moins attractifs, Hayes, 1995 ; Crook et al. 2008) ainsi que la reproduction des individus (Green et al. 1984 ; Romero & Butler, 2007). Une exposition chronique à un taux de corticostérone élevé induit une apoptose importante des cellules de Leydig responsables en grande partie de la production de testostérone (Hardy et al. 2005). Les mâles produiront donc des traits sexuels primaires et secondaires moins développés et peuvent même devenir moins fertiles (Abd-Aziz et al. 2012).

De plus, un stress chronique peut engendrer une immunosuppression (Martin et al. 2005 ; Berger et al. 2005). En effet, j'ai démontré expérimentalement au cours de ma thèse qu'une exposition chronique (10 jours) à du bruit de trafic routier entraîne une réduction des capacités immunitaires chez les mâles et que cette immunosuppression est due à l'élévation du taux de corticostérone. D'autres études récentes ont expérimentalement montré qu'une exposition prolongée à des bruits de synthèse impliquait une immunosuppression chez les animaux (Van Raaij et al. 1996 ; Zheng & Ariizumi, 2007 ; Kight & Swaddle, 2011). De tels résultats suggèrent que le bruit de trafic routier peut avoir des effets importants sur la survie des espèces. Le système immunitaire est le système de défense le plus efficace et le plus sophistiqué contre les espèces parasites (ectoparasites, virus, bactéries...) Ainsi, les capacités immunitaires jouent un rôle déterminant dans la santé et donc la survie des individus (Møller & Saino, 2004) et influencent également le choix de partenaires sexuels (Hamilton & Zuk, 1982 ; Folstad & Carter, 1992). Par exemple, Martin et al. (2001) ont montré que, chez les oiseaux, les individus avec les plus faibles capacités immunitaires font face à une plus forte mortalité de leur descendance à cause d'un plus fort parasitisme. En 1999, Carey et al. cherchent à déterminer les causes du déclin observé des populations d'amphibiens à travers le monde et émettent l'hypothèse que, outre la destruction des habitats, le réchauffement

climatique ou l'empoisonnement, la diminution des capacités immunitaires des amphibiens joue un rôle important dans leur disparition. En effet, selon les auteurs, les amphibiens font face à une forte immunosuppression (notamment à cause de l'apparition de nouvelles sources de stress) et sont donc devenus plus vulnérables aux pathogènes. Depuis, l'impact des pathogènes, et donc l'importance de l'immunité dans le maintien des populations d'amphibiens a été confirmé (Harvell et al. 2002 ; Lips et al. 2006 ; Pounds et al. 2006). Le bruit de trafic routier, de par son effet immunosuppresseur, représente donc une menace importante pour la survie et le maintien des populations d'amphibiens.

Enfin, une récente méta-analyse (Costantini et al. 2011) a montré qu'une exposition prolongée à de hauts taux de corticostérone induit une augmentation du niveau de stress oxydant chez les animaux. Une faible augmentation du niveau de stress oxydant est observée après seulement 3 jours de suppléments à la corticostérone et cette augmentation devient très importante après 3 semaines (Costantini et al. 2011). De plus, Zheng et Ariizumi (2007) ont observé qu'une exposition à du bruit blanc (90 dB) 5 heures par jour pendant 4 semaines implique une augmentation des dégâts oxydatifs chez la souris. Ainsi, le bruit de trafic routier, en augmentant le niveau de stress des individus (Blickley et al. 2012a ; cette thèse), pourrait en parallèle impacter le niveau de stress oxydant des espèces. Le stress oxydant s'observe lorsque les défenses antioxydantes ne peuvent plus neutraliser complètement les espèces réactives de l'oxygène (ROS), il y a donc un déséquilibre de la balance oxydative en faveur des pro-oxydants par rapport aux antioxydants (Costantini 2008 ; Monaghan et al. 2009). Les ROS non neutralisées vont alors réagir avec les biomolécules et les oxyder. Sur le long terme, le stress oxydant représente une vraie menace pour les individus. En effet, une forte concentration de ROS peut engendrer une dégradation de l'ADN (Balaban et al. 2005 ; Falnes et al. 2007), une réduction des télomères entraînant la sénescence des cellules (Richter & von Zglinicki, 2007) ou encore une dégradation de la structure et de la fonction des membranes cellulaires (Hulbert et al. 2006). Certains comportements comme la reproduction sont très demandeurs en énergie et produisent des ROS (Alonso-Alvarez et al. 2004 ; Wiersma et al. 2004). Il existerait donc un trade-off entre allouer les ressources à la reproduction ou à la lutte contre le stress oxydant.

IV) Des solutions pour limiter la pollution sonore.

Le bruit de trafic routier peut donc avoir de nombreux impacts sur le maintien des populations. En effet, en masquant les signaux acoustiques, le bruit impacte de nombreux comportements vitaux (reproduction, approvisionnement, défense du territoire) et le stress qu'il induit peut avoir de nombreux effets sur la santé des animaux (immunosuppression, stress oxydant) et donc sur leur survie. Il semble dès lors indispensable de limiter les nuisances sonores dans les zones naturelles et urbaines afin de limiter la perte de biodiversité observée (Rheindt 2003 ; Barber et al. 2011 ; Slabbekoorn, 2013). Chez l'être humain, les effets néfastes du bruit de trafic routier ont été démontrés très tôt (dans les années 1960 à Londres et 1970 à Paris) et des articles de loi visent à protéger les populations humaines d'une telle nuisance. Ainsi, afin de limiter le niveau de bruit de trafic routier, de nombreuses solutions existent et comprennent : (1) la diminution de la source de bruit ; (2) la diminution de la propagation du bruit.

Le bruit de trafic routier provient d'une part du bruit émis par les moteurs en marche mais aussi du bruit de roulement dû au contact « pneu-chaussée ». Ainsi l'intensité du bruit dépend de la nature des véhicules, de la densité et de la vitesse du trafic ou encore du type de revêtement utilisé. De nombreux moyens peuvent permettre de limiter le niveau de la source de bruit. Tout d'abord, une diminution de 50 % de la densité du trafic provoque une diminution du niveau de bruit de l'ordre de 3 dB (Langlois, 2002 ; Durussell et al. 2007). De plus, le bruit émis par un véhicule bruyant (VB), comme les poids lourds et les deux-roues motorisés, est en moyenne 10 à 15 fois plus élevé (+ 10 à +12 dB(A)) que le bruit d'un véhicule non bruyant (Durussell et al. 2007 ; Office des ponts et chaussées du canton de Berne 2010). Ainsi, les nuisances sonores provenant d'un trafic composé à 7 % de VB sont pour moitié provoquées par les VB et pour moitié par les véhicules peu bruyants représentant pourtant plus de 90 % des véhicules totaux. Limiter le nombre de VB permet une diminution du niveau de bruit allant de 1.5 dB (pour une diminution de 50 %) à 3 dB (suppression totale du trafic des VB). La régulation de la vitesse pourrait elle aussi jouer un rôle important. En effet, une diminution de la vitesse de 80 à 50 km/h entraîne une diminution de près de 3 dB. Rouler moins vite, en plus de limiter les risques de collisions mortelles pour les animaux et le risques d'accidents pour les conducteurs, permettrait de limiter la nuisance sonore. Enfin, le style de conduite a une influence directe sur les nuisances sonores. Pour une voiture, un démarrage « sportif » provoque un niveau sonore d'environ 10 dB(A) plus élevé qu'un démarrage « feutré ». Cet écart peut s'élever à plus de 20 dB(A) pour les motos. De même, le régime de fonctionnement du moteur est directement lié aux nuisances sonores ; par exemple, un moteur à 4000 tours/minute fait autant de bruit que 32 moteurs à 2000

tours/minute (Durussell et al. 2007). Ainsi, la composition du trafic (nombre et type de véhicules), la vitesse de circulation et le style de conduite sont des paramètres déterminants pour le niveau de bruit émis.

Sur les routes déjà construites aux abords de zones protégées et de réserves naturelles, limiter (voire supprimer) l'accès aux poids lourds ainsi que diminuer la vitesse de circulation et sensibiliser les gens à une conduite plus feutrée permettraient de diminuer le niveau de bruit de manière drastique dans ces zones sans que cela représente le moindre coût financier.

Ensuite, une modification des infrastructures routières peut permettre d'une part de diminuer la source de bruit mais aussi sa propagation. Tout d'abord, une modification du revêtement permettrait de fortement diminuer le bruit de roulement des véhicules. En effet, les revêtements denses provoquent une compression importante de l'air entre les pneus et la chaussée alors que les revêtements ouverts permettent une libre circulation de l'air au niveau de la zone de contact pneu-chaussée. Ainsi, favoriser l'utilisation des chaussées ouvertes permettrait de diminuer le niveau du bruit de trafic routier de 3 dB environ. De plus, les murs antibruit représentent une solution efficace pour atténuer la propagation du bruit. L'efficacité de tels équipements va dépendre : (1) de la distance entre l'écran et la source de bruit, plus l'écran sera proche de la source plus l'atténuation du bruit sera efficace ; (2) de la hauteur de l'écran, plus il est haut plus la zone à l'arrière sera au calme ; (3) de ses propriétés absorbantes ; (4) de sa forme, un écran cunéiforme (un talus de terre, par exemple) est moins efficace qu'un écran présentant la forme d'un mur vertical. Par exemple, un écran de 3 mètres en forme de « T » et composé de matière absorbante sera aussi efficace qu'un écran de 10 mètres droit et non absorbant (Slabbekoorn & Ripmeester, 2008). Ainsi, sur les routes déjà existantes aux abords des zones protégées et des réserves naturelles, un changement de la chaussée et la mise en place de barrières antibruit permettraient de limiter fortement les nuisances sonores liées au bruit de trafic routier. Cependant, ces méthodes sont coûteuses (de 500 à 2000 pour 1 mètre de mur antibruit). Dans les zones où des murs antibruit ne sont pas déjà construits la solution la plus intéressante serait de modifier la chaussée. Dans les zones où, au contraire, des murs ont déjà été construits, il suffirait d'augmenter la hauteur des barrières et/ou de les équiper de matières absorbantes à leurs sommets pour réduire significativement le niveau de bruit de l'autre côté et ainsi limiter les impacts négatifs du bruit sur les populations humaines et animales.

Concernant les axes routiers à construire, une solution simple et efficace pour limiter le niveau du bruit dans les zones protégées est tout simplement d'éloigner la source du bruit. En effet, le simple fait de doubler la distance entre la source du bruit et les habitats naturels

permettraient de diminuer le niveau du bruit de 6 dB. Ainsi, des législations imposant une distance minimale entre l'axe routier et les zones protégées permettrait de limiter d'une part la mortalité des animaux par collision, la pollution chimique et visuelle mais aussi les effets néfastes du bruit de trafic routier sur les populations animales sans augmenter pour autant le coût de construction.

Enfin, alors que le bruit prédominant à plus de 80 km/h est celui des pneus sur la chaussée, à 50 km/h le bruit de trafic est principalement dû au bruit du moteur (Langlois, 2002). Ainsi, dans les zones urbaines, où la vitesse est limitée à 50 km/h, l'utilisation de véhicules électriques permettrait de supprimer (ou presque) les nuisances sonores dues au bruit de trafic routier. De plus, le développement de transports en commun électriques pour remplacer les véhicules à moteur à explosion permettrait là encore de réduire de manière radicale le niveau de bruit. De telles solutions impliqueraient de forts coûts économiques pour le remplacement du parc automobile actuel par des véhicules électriques ainsi qu'une évolution progressive des habitudes de vie pour favoriser l'utilisation de transports en commun. Cependant, favoriser ce genre de véhicules peut avoir de très nombreux effets bénéfiques tant pour les animaux vivant en milieu urbain que pour les êtres humains. Comme nous l'avons vu, le bruit de trafic routier a de nombreux effets sur l'être humain (insomnie engendrant de l'irascibilité et une diminution de l'efficacité dans le travail, diabète, infarctus, stress...) et diminuer cette nuisance sonore augmenterait le bien-être humain, ce qui aboutirait à des protagonistes moins stressés et plus efficaces au travail, moins sujets à la dépression et moins malades (ce qui représenterait des économies importantes pour la Sécurité sociale). De plus, les véhicules sont à l'origine d'une forte pollution chimique pouvant avoir de graves effets sur la santé humaine (pneumonie, cancer du poumon, maladies cardiovasculaires) mais aussi sur l'environnement (modifications climatiques locales). Favoriser l'utilisation de véhicules électriques en milieu urbain aurait ainsi des effets bénéfiques très importants sur la santé humaine mais aussi sur l'environnement.

Ainsi, de nombreuses solutions existent pour limiter l'impact du bruit de trafic routier sur les populations animales mais sont à utiliser différemment en fonction des cas. Dans le cas des routes déjà construites passant aux abords de zones protégées, la régulation du trafic permettrait de limiter le niveau de bruit sans aucun coût financier. La rénovation des routes pour utiliser des chaussées plus aérées permettrait aussi de limiter le bruit. Dans les zones où sont déjà construites des barrières antibruit leur rénovation (augmentation de la taille, utilisation de matières absorbantes) permettrait d'augmenter considérablement leur efficacité et donc de diminuer le niveau de bruit. Enfin, pour les routes à construire, des distances

minimales à respecter entre la route et les zones protégées permettraient de diminuer fortement la perturbation acoustique liée au trafic routier.

CONCLUSION

Les travaux exposés dans cette thèse m'ont permis d'aborder certains aspects de l'impact du bruit de trafic routier sur la rainette verte tant sur les systèmes de communication que sur la physiologie des individus. J'ai ainsi pu montrer que les mâles ne modifiaient pas la structure de leurs chants en réponse à la diffusion de bruit de trafic routier. De plus, en condition de bruit de trafic routier, les femelles ne modifient pas leurs critères de sélection de partenaires sexuels. Cela pourrait être dû au fait que les rainettes vertes ne possèdent pas une plasticité suffisante pour modifier leurs comportements ou alors que le bruit de trafic routier ne contraint pas suffisamment la perception des signaux acoustiques pour que les mâles modifient la structure de leurs chants et que les femelles modifient leurs critères de sélection de partenaires sexuels. De plus, j'ai montré que le bruit de trafic routier entraînait une perte de coloration du sac vocal chez les mâles. À l'heure actuelle, les études s'intéressent exclusivement à l'impact du bruit de trafic routier sur les espèces utilisant les signaux acoustiques pour communiquer. Cependant, nous avons montré que les espèces utilisant des signaux visuels colorés peuvent eux aussi voir leur communication impactée par le bruit de trafic routier. Ainsi, le bruit de trafic routier pourrait perturber les systèmes de communication d'un panel d'espèces beaucoup plus large que ce qui est supposé jusqu'à présent. Une telle perte de couleur pourrait être due aux effets physiologiques du bruit de trafic routier sur les rainettes. En effet, les mâles que nous avons exposés pendant 10 jours à du bruit de trafic routier ont présenté une augmentation significative de leurs niveaux de stress ainsi qu'une diminution de leurs capacités immunitaires. De plus, nous avons pu montrer que l'immunosuppression observé en milieu bruyant est due à l'augmentation du niveau de corticostérone chez les individus. Les caroténoïdes intervenant dans la coloration du sac vocal auraient ainsi pu être réalloués à la lutte contre les effets physiologiques du bruit (immunostimulation et stimulation des défenses antioxydantes). Ainsi, le travail novateur que nous avons réalisé en écophysiologie dresse un tableau alarmant sur les conséquences physiologiques d'une exposition chronique à du bruit de trafic routier et suggère un impact sur les communautés animales bien plus important que décrit jusqu'à présent.

Le bruit de trafic routier peut donc avoir un impact sur les communautés animales plus important que ce que nous pensions jusqu'à présent en impactant la communication acoustique chez de nombreuses espèces mais aussi la physiologie des animaux et l'expression des signaux visuels.

PERSPECTIVES

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis d'élargir nos connaissances sur les impacts que peut avoir une exposition prolongée au bruit de trafic routier mais a aussi permis de soulever des points qu'il semble important de prendre en considération lors de l'étude de l'impact du bruit sur la fitness des individus et l'évolution des signaux.

1) Un impact insoupçonné sur les signaux colorés

Au cours de cette thèse, nous avons pour la première fois montré que le bruit de trafic routier peut impacter la communication basée sur les signaux colorés. En effet, une exposition prolongée au bruit de trafic engendre une perte de coloration chez les individus. Or, les traits sexuels secondaires colorés peuvent occuper une part importante dans la fitness des individus. En effet, selon Hamilton & Zuk (1982) et Folstad & Carter (1992), les traits sexuels secondaires (chants, colorations...) très développés sont le reflet de l'état sanitaire des mâles mais aussi de leurs capacités immunitaires, un mâle très ornementé aurait une forte résistance aux parasites et une forte immunité. Par conséquent, il allouerait son énergie au développement des traits sexuels secondaires tout en supportant l'effet immunosuppresseur de la testostérone, hormone responsable du développement des traits sexuels secondaires (Grossman, 1985 ; Enstrom et al. 1997 ; Bortolotti et al. 2006 ; Peters 2000 ; Deviche & Cortez, 2005; Arch & Narins, 2009 ; Pasch et al. 2011). Ainsi, choisir les mâles avec les caractères sexuels les plus développés apporterait des bénéfices directs (limite la transmission de parasites, mâles ayant plus d'énergie à allouer aux soins parentaux, mâles plus fertiles ; Korpimäki et al. 1995 ; Able, 1996 ; Liljedal et al. 1999) et indirects (transmission de gènes de résistance à la descendance ; Hamilton et Zuk 1982 ; Folstad et Carter 1992) aux femelles. Chez *H. arborea*, une exposition chronique au bruit de trafic routier induit une perte de coloration caroténoïdes-dépendante (sac vocal) ainsi qu'une immunosuppression.

Le bruit de trafic routier pourrait renforcer l'hypothèse de Folstad & Carter (1992) : certains mâles ayant des systèmes immunitaires extrêmement performants et développés seraient moins impactés par une potentielle immunosuppression et pourraient continuer à investir dans le développement des traits sexuels secondaires exagérés. Ainsi, les femelles, à travers les signaux colorés ont alors une indication sur les capacités immunitaires des mâles (Faivre et al. 2003 ; Dawson & Bortolotti 2006; Mougeot et al. 2010) et donc sur leurs capacités à faire face à une immunosuppression liée à la testostérone mais aussi au bruit de trafic routier (corticostérone). Les signaux, quant à eux, pourraient évoluer vers une exagération encore plus importante. Il semble dès lors indispensable pour des études futures de considérer à la fois signaux acoustiques et les signaux visuels pour estimer pleinement l'impact du bruit de trafic routier sur l'évolution des systèmes de communication et sur la sélection sexuelle.

2) L'importance de la susceptibilité au stress dans la réponse des individus au bruit

Au cours de mon travail de thèse, j'ai pu confirmer que le bruit de trafic routier est une source de stress pour les animaux (Blickley et al. 2012a) et entraîne une augmentation du niveau de corticostérone. Si une élévation du taux de corticostérone engendre une immunosuppression et une élévation du stress oxydant sur le long terme (Costantini et al. 2011 ; Martin et al. 2005 ; Berger et al. 2005), elle impacte aussi le comportement des animaux. En effet, de hauts taux de corticostérone sont à l'origine d'une diminution de l'activité de chant chez certaines espèces (Marler & Ryan, 1996 ; Leary et al. 2008) mais aussi d'une diminution de l'approvisionnement (Landys et al. 2006 ; Cottin et al. 2014). Les études sur la conséquence du bruit ont également montré que le bruit peut impliquer une diminution de l'activité de chant (Sun & Narins, 2005 ; Lengagne, 2008) ou encore des prises alimentaires (Quinn et al. 2006 ; Halfwerk et al. 2011b ; Leonard & Horn, 2012). Alors que l'effet masquant du bruit est la raison principale invoquée, la susceptibilité des individus au stress peut elle aussi expliquer ces modifications comportementales. Dans une récente étude, Naguib et al. (2013) ont montré que l'impact du bruit sur les individus dépend plus de la personnalité des individus (décrite comme un gradient allant de « téméraire » à « timide » et « d'explorateur rapide » à « explorateur lent ») que du masquage acoustique dû au bruit. Ainsi, selon sa personnalité, chaque individu réagit différemment à un stress (Cockrem 2006 ; 2013), certains seraient très « stressables » alors que d'autres seraient peu « stressables » (Cockrem et al. 2009). La réponse au stress des individus serait alors déterminante pour le

maintien des espèces et une forte sélection en faveur des individus les moins stressables pourrait avoir lieu (voir Partecke et al. 2006 par exemple).

3) Études au niveau populationnel chez *H. arborea*.

Ce travail de thèse a permis de déterminer l'impact du bruit de trafic routier au niveau de l'individu. Il semble maintenant important de déterminer son impact au niveau populationnel. Tout d'abord, il serait extrêmement intéressant de déterminer si les effets du bruit sur l'individu se retrouvent au niveau populationnel. Pour cela, il sera nécessaire de comparer entre elles des populations soumises à du bruit de trafic routier depuis plusieurs années et des populations jamais soumises au bruit de trafic routier. Nous pourrons ensuite effectuer des mesures morphologiques (taille et masse), des traits sexuels secondaires (chants et couleurs du sac vocal) et physiologiques sur un grand nombre d'individus de populations différentes. De nombreux facteurs peuvent impacter la présence d'individus et donc les caractéristiques morphologiques d'une population (température, proximité de forêt, profondeur du site de ponte, présence de poissons...) Il sera donc nécessaire d'échantillonner des individus sur un grand nombre de sites exposés ou non au bruit de trafic routier afin de contrôler le rôle et le poids des différents facteurs environnementaux. De plus, aucune plasticité vocale n'a été observée chez nos individus. Il serait donc intéressant de suivre l'évolution des caractéristiques d'une population pour déterminer si les caractéristiques des individus évoluent face à la pression de sélection importante que peut représenter le bruit. En effet, au cours des générations, les individus les plus audibles, les moins stressables et ayant une forte immunité pourraient être sélectionnés.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abd-Aziz, N. A. A., Durairajanayagam, D., Chatterjee, A. & Chatterjee, R. (2012). Corticosterone-Induced Attenuation of Epididymal Sperm Fertility in Rats. In *2012 Ieee Colloquium on Humanities, Science & Engineering Research*. New York: Ieee.

Able, D. J. (1996). The contagion indicator hypothesis for parasite-mediated sexual selection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 2229-2233.

Alatalo, R. V. & Mappes, J. (1996). Tracking the evolution of warning signals. *Nature* **382**, 708-710.

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. *Ecology Letters* **7**, 363-368.

Arch, V. S. & Narins, P. M. (2009). Sexual hearing: The influence of sex hormones on acoustic communication in frogs. *Hearing Research* **252**, 15-20.

Babisch, W., Ising, H., Gallacher, J. E. J., Elwood, P. C., Sweetnam, P. M., Yarnell, J. W. G., Bainton, D. & Baker, L. A. (1990). Traffic noise, work noise and cardiovascular risk-factors - the caerphilly and speedwell collaborative heart-disease studies. *Environment International* **16**, 425-435.

Babisch, W., Ising, H., Gallacher, J. E. J., Sharp, D. S. & Baker, I. A. (1993). Traffic noise and cardiovascular risk - the speedwell study, 1st phase - outdoor noise-levels and risk-factors. *Archives of Environmental Health* **48**, 401-405.

Babisch, W., Ising, H., Gallacher, J. E. J., Sweetnam, P. M. & Elwood, P. C. (1999). Traffic noise and cardiovascular risk: The caerphilly and speedwell studies, third phase-10-year follow up. *Archives of Environmental Health* **54**, 210-216.

Babisch, W., Fromme, H., Beyer, A. & Ising, H. (2001). Increased catecholamine levels in urine in subjects exposed to road traffic noise - The role of stress hormones in noise research. *Environment International* **26**, 475-481.

Babisch, W. F., Beule, B., Schust, M., Kersten, N. & Ising, H. (2005). Traffic noise and risk of myocardial infarction. *Epidemiology* **16**, 33-40.

Babisch, W. (2008). Road traffic noise and cardiovascular risk. *Noise & Health* **10**, 27-33.

Balaban, R. S., Nemoto, S. & Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* **120**, 483-495.

Barber, J. R., Burdett, C. L., Reed, S. E., Warner, K. A., Formichella, C., Crooks, K. R., Theobald, D. M. & Fristrup, K. M. (2011). Anthropogenic noise exposure in protected natural areas: estimating the scale of ecological consequences. *Landscape Ecology* **26**, 1281-1295.

Barber, J. R., Crooks, K. R. & Fristrup, K. M. (2010). The costs of chronic noise exposure for terrestrial organisms. *Trends in Ecology & Evolution* **25**, 180-189.

Barbosa, A. S. M. & Cardoso, M. R. A. (2005). Hearing loss among workers exposed to road traffic noise in the city of Sao Paulo in Brazil. *Auris Nasus Larynx* **32**, 17-21.

Bee, M. A. & Swanson, E. M. (2007). Auditory masking of anuran advertisement calls by road traffic noise. *Animal Behaviour* **74**, 1765-1776.

Bennert, T., Hanson, D., Maher, A. & Vitillo, N. (2005). Influence of pavement surface type on tire/pavement generated noise. *Journal of Testing and Evaluation* **33**, 94-100.

Berg, M. L., Beintema, N. H., Welbergen, J. A. & Komdeur, J. (2005). Singing as a handicap: the effects of food availability and weather on song output in the Australian reed warbler *Acrocephalus australis*. *Journal of Avian Biology* **36**, 102-109.

Berg, A. & Greenfield, M. D. (2005). Sexual selection in insect choruses: Influences of call power and relative timing. *Journal of Insect Behavior* **18**, 59-75.

Berger, S., Martin, L. B., Wikelski, M., Romero, L. M., Kalko, E. K. V., Vitousek, M. N. & Rodl, T. (2005). Corticosterone suppresses immune activity in territorial Galapagos marine iguanas during reproduction. *Hormones and Behavior* **47**, 419-429.

Bermudez-Cuamatzin, E., Rios-Chelen, A. A., Gil, D. & Garcia, C. M. (2009). Strategies of song adaptation to urban noise in the house finch: syllable pitch plasticity or differential syllable use? *Behaviour* **146**, 1269-1286.

Bermudez-Cuamatzin, E., Rios-Chelen, A. A., Gil, D. & Garcia, C. M. (2011). Experimental evidence for real-time song frequency shift in response to urban noise in a passerine bird. *Biology Letters* **7**, 36-38.

Biegler, R., McGregor, A., Krebs, J. R. & Healy, S. D. (2001). A larger hippocampus is associated with longer-lasting spatial memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 6941-6944.

Blickley, J. L., Word, K. R., Krakauer, A. H., Phillips, J. L., Sells, S. N., Taff, C. C., Wingfield, J. C. & Patricelli, G. L. (2012a). Experimental Chronic Noise Is Related to Elevated Fecal Corticosteroid Metabolites in Lekking Male Greater Sage-Grouse (*Centrocercus urophasianus*). *Plos One* **7**, e50462.

Blickley, J. L., Blackwood, D. & Patricelli, G. L. (2012b). Experimental Evidence for the Effects of Chronic Anthropogenic Noise on Abundance of Greater Sage-Grouse at Leks. *Conservation Biology* **26**, 461-471.

Blount, J. D., Metcalfe, N. B., Birkhead, T. R. & Surai, P. F. (2003). Carotenoid modulation of immune function and sexual attractiveness in zebra finches. *Science* **300**, 125-127.

Boeckle, M., Preininger, D. & Hodl, W. (2009). Communication in noisy environments i: acoustic signals of *Staurois latopalmatus boulenger* 1887. *Herpetologica* **65**, 154-165.

Boncoraglio, G. & Saino, N. (2007). Habitat structure and the evolution of bird song: a meta-analysis of the evidence for the acoustic adaptation hypothesis. *Functional Ecology* **21**, 134-142.

Bonier, F., Martin, P. R., Sheldon, K. S., Jensen, J. P., Foltz, S. L. & Wingfield, J. C. (2007). Sex-specific consequences of life in the city. *Behavioral Ecology* **18**, 121-129.

Bortolotti, G. R., Blas, J., Negro, J. J. & Tella, J. L. (2006). A complex plumage pattern as an honest social signal. *Animal Behaviour* **72**, 423-430.

Bourne, G. R. (1993). Proximate costs and benefits of mate acquisition at leks of the frog *ololygon-rubra*. *animal behaviour* **45**, 1051-1059.

Bradbury, J. W. (1981). The evolution of leks. Natural selection and social behavior. Chiron Press, New York, 138-169.

Bradbury, J. W. & Vehrencamp, S. L. (1998). "Principles of Animals Communication." Sinauer Associates, Sunderland.

Brown, T. J. & Handford, P. (2000). Sound design for vocalizations: Quality in the woods, consistency in the fields. *Condor* **102**, 81-92.

Brumm, H. & Todt, D. (2004). Male-male vocal interactions and the adjustment of song amplitude in a territorial bird. *Animal Behaviour* **67**, 281-286.

Brumm, H. (2004). The impact of environmental noise on song amplitude in a territorial bird. *Journal of Animal Ecology* **73**, 434-440.

Brumm, H., Voss, K., Kollmer, I. & Todt, D. (2004). Acoustic communication in noise: regulation of call characteristics in a New World monkey. *Journal of Experimental Biology* **207**, 443-448.

Brumm, H. & Slabbekoorn, H. (2005). Acoustic communication in noise. In *Advances in the Study of Behavior, Vol 35*, vol. 35, pp. 151-209. San Diego: Elsevier Academic Press Inc.

Brumm, H. & Slater, P. J. B. (2006). Ambient noise, motor fatigue, and serial redundancy in chaffinch song. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **60**, 475-481.

Brumm, H., Schmidt, R. & Schrader, L. (2009). Noise-dependent vocal plasticity in domestic fowl. *Animal Behaviour* **78**, 741-746.

Brumm, H. & Zollinger, S. A. (2011). The evolution of the Lombard effect: 100 years of psychoacoustic research. *Behaviour* **148**, 1173-1198.

Candolin, U. (2003). The use of multiple cues in mate choice. *Biological Reviews* **78**, 575-595.

Capranica, R. R. & Moffat, A. J. M. (1983). Neurobehavioral correlates of sound communication in anurans. In "Adv. Vert. Neuroethol" (J. P. Ewert, R. R. Capranica & D. J. Ingle, Eds.) Plenum Press, New York.

Carey, C., Cohen, N. & Rollins-Smith, L. (1999). Amphibian declines: an immunological perspective. *Developmental and Comparative Immunology* **23**, 459-472.

Carmichael, J. C. (1955). Noise Health Hazards in the Air Force. *Public Health Reports* **70**, 1251-1256.

Chang, E. F. & Merzenich, M. M. (2003). Environmental noise retards auditory cortical development. *Science* **300**, 498-502.

Changizi, M. A. (2003). Relationship between number of muscles, behavioral repertoire size, and encephalization in mammals. *Journal of Theoretical Biology* **220**, 157-168.

Chapuis, C. (1971). Un exemple de l'influence du milieu sur les émissions vocales des oiseaux : l'évolution des chants en forêt équatoriale. *Rev. Ecol.* **25**, 183-202.

Chloupek, P., Voslarova, E., Chloupek, J., Bedanova, I., Pistekova, V. & Vecerek, V. (2009). Stress in Broiler Chickens Due to Acute Noise Exposure. *Acta Veterinaria Brno* **78**, 93-98.

Clergeau, P., Croci, S., Jokimaki, J., Kaisanlahti-Jokimaki, M. L. & Dinetti, M. (2006). Avifauna homogenisation by urbanisation: Analysis at different European latitudes. *Biological Conservation* **127**, 336-344.

Cockrem, J. (2006). Corticosterone stress responses and avian personalities. *Journal of Ornithology* **147**, 6-6.

Cockrem, J. F., Barrett, D. P., Candy, E. J. & Potter, M. A. (2009). Corticosterone responses in birds: Individual variation and repeatability in Adelie penguins (*Pygoscelis adeliae*) and other species, and the use of power analysis to determine sample sizes. *General and Comparative Endocrinology* **163**, 158-168.

Cockrem, J. F. (2013). Corticosterone responses and personality in birds: Individual variation and the ability to cope with environmental changes due to climate change. *General and Comparative Endocrinology* **190**, 156-163.

Costantini, D. (2008). Oxidative stress in ecology and evolution: lessons from avian studies. *Ecology Letters* **11**, 1238-1251.

Costantini, D., Marasco, V. & Moller, A. P. (2011). A meta-analysis of glucocorticoids as modulators of oxidative stress in vertebrates. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **181**, 447-456.

Cottin, M., MacIntosh, A. J. J., Kato, A., Takahashi, A., Debin, M., Raclot, T. & Ropert-Coudert, Y. (2014). Corticosterone administration leads to a transient alteration of foraging behaviour and complexity in a diving seabird. *Marine Ecology Progress Series* **496**, 249-262.

Crino, O. L., Johnson, E. E., Blickley, J. L., Patricelli, G. L. & Breuner, C. W. (2013). Effects of experimentally elevated traffic noise on nestling white-crowned sparrow

stress physiology, immune function and life history. *Journal of Experimental Biology* **216**, 2055-2062.

Crook, T. C., Flatt, T. & Smiseth, P. T. (2008). Hormonal modulation of larval begging and growth in the burying beetle *Nicrophorus vespilloides*. *Animal Behaviour* **75**, 71-77.

Crusio, W. E., Schwegler, H. & Brust, I. (1993). Covariations between hippocampal mossy fibers and working and reference memory in spatial and nonspatial radial maze tasks in mice. *European Journal of Neuroscience* **5**, 1413-1420.

Cunnington, G. M. & Fahrig, L. (2010). Plasticity in the vocalizations of anurans in response to traffic noise. *Acta Oecologica-International Journal of Ecology* **36**, 463-470.

Cynx, J., Lewis, R., Tavel, B. & Tse, H. (1998). Amplitude regulation of vocalizations in noise by a songbird, *Taeniopygia guttata*. *Animal Behaviour* **56**, 107-113.

Daniel, E. (2007). Noise and hearing loss: A review. *Journal of School Health* **77**, 225-231.

Dawkins, R. & Krebs, J. R. (1978). Animal signals: Information or manipulation? In "Behavioral Ecology" (J. R. Krebs & N. B. Davies, eds.), pp 282-309. Blackwell, Oxford.

Dawson, R. D. & Bortolotti, G. R. (2006). Carotenoid-dependent coloration of male American kestrels predicts ability to reduce parasitic infections. *Naturwissenschaften* **93**, 597-602.

de Kluizenaar, Y., Gansevoort, R. T., Miedema, H. M. E. & de Jong, P. E. (2007). Hypertension and road traffic noise exposure. *Journal of Occupational and Environmental Medicine* **49**, 484-492.

Deboer, S. F., Vandergugten, J. & Slangen, J. L. (1989). Plasma-catecholamine and corticosterone responses to predictable and unpredictable noise stress in rats. *Physiology & Behavior* **45**, 789-795.

Deinzer, R., Kleineidam, J. C., Kastka, J., Scheidt, U., Halbach, M. & Steingruber, H. J. (1994). Heart-rate and cortisol secretion in persons subjected to traffic noise and public speech stress. *Journal of Psychophysiology* **8**, 256-257.

De-Orense, R. M. M. & Tejedo-Madueno, M. (1990). Size-based mating pattern in the tree frog *Hyla-arborea*. *Herpetologica* **46**, 176-182.

des Aunay, G. H., Slabbekoorn, H., Nagle, L., Passas, F., Nicolas, P. & Draganoiu, T. I. (2014). Urban noise undermines female sexual preferences for low-frequency songs in domestic canaries. *Animal Behaviour* **87**, 67-75.

Deviche, P. & Cortez, L. (2005). Androgen control of immunocompetence in the male house finch, *Carpodacus mexicanus* Muller. *Journal of Experimental Biology* **208**, 1287-1295.

Devictor, V., Julliard, R., Couvet, D., Lee, A. & Jiguet, F. (2007). Functional homogenization effect of urbanization on bird communities. *Conservation Biology* **21**, 741-751.

Doty, G. V. & Welch, A. M. (2001). Advertisement call duration indicates good genes for offspring feeding rate in gray tree frogs (*Hyla versicolor*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* **49**, 150-156.

Dunn, D. E., Davis, R. R., Merry, C. J. & Franks, J. R. (1991). Hearing-loss in the chinchilla from impact and continuous noise exposure. *Journal of the Acoustical Society of America* **90**, 1979-1985.

Durussell, Pfander, Widmer, Tilbury, Pham, Luy, Coquerand, Magnin, Litzistorf, Bochatay & Zbinden. (2007). Bruit du trafic routier –Assainissement; Références légales, constat et mesures de protection.

Ellinger, N. & Hödl, W. (2003). Habitat acoustics of a Neotropical lowland rainforest. *Bioacoustics-the International Journal of Animal Sound and Its Recording* **13**, 297-322.

Endler, J. A. (1991). Variation in the appearance of guppy color patterns to guppies and their predators under different visual conditions. *Vision Research* **31**, 587-608.

Endler, J. A. (1992). Signals, signal conditions, and the direction of evolution. *American Naturalist* **139**, S125-S153.

Endler, J. A. (1993). Some general-comments on the evolution and design of animal communication-systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **340**, 215-225.

Enstrom, D. A., Ketterson, E. D. & Nolan, V. (1997). Testosterone and mate choice in the dark-eyed junco. *Animal Behaviour* **54**, 1135-1146.

Estes, W. A. & Mannan, R. W. (2003). Feeding behavior of Cooper's Hawks at urban and rural nests in southeastern Arizona. *Condor* **105**, 107-116.

Ey, E. & Fischer, J. (2009). The "acoustic adaptation hypothesis" - a review of the evidence from birds, anurans and mammals. *Bioacoustics-the International Journal of Animal Sound and Its Recording* **19**, 21-48.

Fahrig, L., Pedlar, J. H., Pope, S. E., Taylor, P. D. & Wegner, J. F. (1995). Effect of road traffic on amphibian density. *Biological Conservation* **73**, 177-182.

Faivre, B., Gregoire, A., Preault, M., Cezilly, F. & Sorci, G. (2003). Immune activation rapidly mirrored in a secondary sexual trait. *Science* **300**, 103-103.

Falnes, P. O., Klungland, A. & Alseth, I. (2007). Repair of methyl lesions in DNA and RNA by oxidative demethylation. *Neuroscience* **145**, 1222-1232.

Fernandez Juridic, E., Poston, R., De Collibus, K., Morgan, T., Bastain, B., Martin, C., Jones, K. & Treminio, R. (2005). Microhabitat selection and singing behavior pattern of mal house finches (*carpodacus mexicanus*) in urban parks in a heavily urbanized landscape in the western us. *Urban Habitats* **3**, 49-69

Flower, T. (2011). Fork-tailed drongos use deceptive mimicked alarm calls to steal food. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **278**, 1548-1555.

Folstad, I. & Karter, A. J. (1992). Parasites, bright males, and the immunocompetence handicap. *American Naturalist* **139**, 603-622.

Forman, R. T. T. & Alexander, L. E. (1998). Roads and their major ecological effects. *Annual Review of Ecology and Systematics* **29**, 207-+.

Forman, R. T. T. (2000). Estimate of the area affected ecologically by the road system in the United States. *Conservation Biology* **14**, 31-35.

Forman, R. T. T., Reineking, B. & Hersperger, A. M. (2002). Road traffic and nearby grassland bird patterns in a suburbanizing landscape. *Environmental Management* **29**, 782-800.

Francis, C. D., Ortega, C. P. & Cruz, A. (2011a). Noise Pollution Filters Bird Communities Based on Vocal Frequency. *Plos One* **6**, 8.

Francis, C. D., Ortega, C. P. & Cruz, A. (2011b). Different behavioural responses to anthropogenic noise by two closely related passerine birds. *Biology Letters* **7**, 850-852.

Friedl, T. W. P. & Klump, G. M. (1997). Some aspects of population biology in the European treefrog, *Hyla arborea*. *Herpetologica* **53**, 321-330.

Gerhardt, H. C. & Mudry, K. M. (1980). Temperature effects on frequency preferences and mating call frequencies in the green treefrog, *Hyla-cinerea* (anura, hylidae). *Journal of Comparative Physiology* **137**, 1-6.

Gerhardt, H. C. (1994). The evolution of vocalization in frogs and toads. *Annual Review of Ecology and Systematics* **25**, 293-324.

Gerhardt, H. C. & Huber, F. (2002). « Acoustic Communication in Insects and Anurans. » University of Chicago Press, Chicago.

Gerhardt, H. C. & Schwartz, J. J. (2002). Auditory tuning and frequency preferences in anurans. In “Anuran Communication” (M. J. Ryan, Ed.), pp. 73-85. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.

Gerhardt, H. C. (2005). Acoustic spectral preferences in two cryptic species of grey treefrogs: implications for mate choice and sensory mechanisms. *Animal Behaviour* **70**, 39-48.

Ghalambor, C. K., McKay, J. K., Carroll, S. P. & Reznick, D. N. (2007). Adaptive versus non-adaptive phenotypic plasticity and the potential for contemporary adaptation in new environments. *Functional Ecology* **21**, 394-407.

Giacoma, C., Zugolaro, C. & Beani, L. (1997). The advertisement calls of the green toad (*Bufo viridis*): Variability and role in mate choice. *Herpetologica* **53**, 454-464.

Gil, D. & Gahr, M. (2002). The honesty of bird song: multiple constraints for multiple traits. *Trends in Ecology & Evolution* **17**, 133-141.

Glorig, A. & Summerfield, A. (1958). Noise - is it a health problem. *Jama-Journal of the American Medical Association* **168**, 370-376.

Gomez, D., Richardson, C., Lengagne, T., Plenet, S., Joly, P., Lena, J. P. & Thery, M. (2009). The role of nocturnal vision in mate choice: females prefer conspicuous males in the European tree frog (*Hyla arborea*). *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **276**, 2351-2358.

Gomez, D., Richardson, C., Lengagne, T., Derex, M., Plenet, S., Joly, P., Lena, J. P. & Thery, M. (2010). Support for a role of colour vision in mate choice in the nocturnal European treefrog (*Hyla arborea*). *Behaviour* **147**, 1753-1768.

Goodwin, S. E. & Shriver, W. G. (2011). Effects of Traffic Noise on Occupancy Patterns of Forest Birds. *Conservation Biology* **25**, 406-411.

Grafe, T. U. & Thein, J. (2001). Energetics of calling and metabolic substrate use during prolonged exercise in the European treefrog *Hyla arborea*. *Journal of Comparative Physiology B-Biochemical Systemic and Environmental Physiology* **171**, 69-76.

Grafe, T. U. & Wanger, T. C. (2007). Multimodal signaling in male and female foot-flagging frogs *Staurois guttatus* (Ranidae): An alerting function of calling. *Ethology* **113**, 772-781.

Grafe, T. U., Preininger, D., Sztatecsny, M., Kasah, R., Dehling, J. M., Proksch, S. & Hodl, W. (2012). Multimodal Communication in a Noisy Environment: A Case Study of the Bornean Rock Frog *Staurois parvus*. *Plos One* **7**, 8.

Grazuleviciene, R., Lekaviciute, J., Deikus, J., Mozgeris, G. & Merkevicus, S. (2005). Urban traffic noise and myocardial infarction risk. In *6Th International Conference Environmental Engineering, Vols 1 and 2*, pp. 84-88. Vilnius-40: Vilnius Gediminas Technical Univ Press, Technika.

Green, W. H., Campbell, M. & David, R. (1984). Psychosocial dwarfism - a critical-review of the evidence. *Journal of the American Academy of Child and Adolescent Psychiatry* **23**, 39-48.

Griefahn, B., Marks, A. & Robens, S. (2006). Noise emitted from road, rail and air traffic and their effects on sleep. *Journal of Sound and Vibration* **295**, 129-140.

Gross, K., Pasinelli, G. & Kunc, H. P. (2010). Behavioral Plasticity Allows Short-Term Adjustment to a Novel Environment. *American Naturalist* **176**, 456-464.

Grossman, C. J. (1985). Interactions between the gonadal-steroids and the immune system. *Science* **227**, 257-261.

Guilford, T. & Dawkins, M. S. (1991). Receiver psychology and the evolution of animal signals. *Animal Behaviour* **42**, 1-14.

Halfwerk, W. & Slabbekoorn, H. (2009). A behavioural mechanism explaining noise-dependent frequency use in urban birdsong. *Animal Behaviour* **78**, 1301-1307.

Halfwerk, W., Bot, S., Buikx, J., van der Velde, M., Komdeur, J., ten Cate, C. & Slabbekoorn, H. (2011a). Low-frequency songs lose their potency in noisy urban conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 14549-14554.

Halfwerk, W., Holleman, L. J. M., Lessells, C. M. & Slabbekoorn, H. (2011b). Negative impact of traffic noise on avian reproductive success. *Journal of Applied Ecology* **48**, 210-219.

Halonen, J. I., Vahtera, J., Stansfeld, S., Yli-Tuomi, T., Salo, P., Pentti, J., Kivimäki, M. & Lanki, T. (2012). Associations between Nighttime Traffic Noise and Sleep: The Finnish Public Sector Study. *Environmental Health Perspectives* **120**, 1391-1396.

Hamao, S., Watanabe, M. & Mori, Y. (2011). Urban noise and male density affect songs in the great tit *Parus major*. *Ethology Ecology & Evolution* **23**, 111-119.

Hamilton, W. D. & Zuk, M. (1982). Heritable true fitness and bright birds - a role for parasites. *Science* **218**, 384-387.

Hardy, M. P., Gao, H. B., Dong, Q., Ge, R. S., Wang, Q., Chai, W. R., Feng, X. & Sottas, C. (2005). Stress hormone and male reproductive function. *Cell and Tissue Research* **322**, 147-153.

Harvell, C. D., Mitchell, C. E., Ward, J. R., Altizer, S., Dobson, A. P., Ostfeld, R. S. & Samuel, M. D. (2002). Ecology - Climate warming and disease risks for terrestrial and marine biota. *Science* **296**, 2158-2162.

Hayes, T. B. (1995). Interdependence of corticosterone-hormones and thyroid-hormones in larval toads (*Bufo boreas*) .1. thyroid hormone-dependent and hormone-independent effects of corticosterone on growth and development. *Journal of Experimental Zoology* **271**, 95-102.

Hebets, E. A. & Papaj, D. R. (2005). Complex signal function: developing a framework of testable hypotheses. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **57**, 197-214.

Herrera-Montes, M. I. & Aide, T. M. (2011). Impacts of traffic noise on anuran and bird communities. *Urban Ecosystems* **14**, 415-427.

Heuschele, J., Mannerla, M., Gienapp, P. & Candolin, U. (2009). Environment-dependent use of mate choice cues in sticklebacks. *Behavioral Ecology* **20**, 1223-1227.

Holveck, M. J. & Riebel, K. (2010). Low-quality females prefer low-quality males when choosing a mate. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **277**, 153-160.

Hu, B. H. & Zheng, G. L. (2008). Membrane disruption: An early event of hair cell apoptosis induced by exposure to intense noise. *Brain Research* **1239**, 107-118.

Hu, Y. & Cardoso, G. C. (2009). Are bird species that vocalize at higher frequencies preadapted to inhabit noisy urban areas? *Behavioral Ecology* **20**, 1268-1273.

Hulbert, A. J., Faulks, S. C. & Buffenstein, R. (2006). Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice. *Journals of Gerontology Series a-Biological Sciences and Medical Sciences* **61**, 1009-1018.

Ingle, S. T., Pachpande, B. G., Wagh, N. D. & Attarde, S. B. (2005). Noise exposure and hearing loss among the traffic policemen working at busy streets of Jalgaon urban centre. *Transportation Research Part D-Transport and Environment* **10**, 69-75.

Ising, H., Dienel, D., Gunther, T. & Markert, B. (1980). Health-effects of traffic noise. *International Archives of Occupational and Environmental Health* **47**, 179-190.

Jakovljevic, B., Belojevic, G., Paunovic, K. & Stojanov, V. (2006). Road traffic noise and sleep disturbances in an urban population: Cross-sectional study. *Croatian Medical Journal* **47**, 125-133.

Jakovljevic, B., Paunovic, K. & Belojevic, G. (2009). Road-traffic noise and factors influencing noise annoyance in an urban population. *Environment International* **35**, 552-556.

Jamrah, A., Al-Omari, A. & Sharabi, R. (2006). Evaluation of traffic noise pollution in Amman, Jordan. *Environmental Monitoring and Assessment* **120**, 499-525.

Jaquier, J., Broquet, T., Aguilar, C., Evanno, G. & Perrin, N. (2010). Good genes drive female choice for mating partners in the lek-breeding european treefrog. *Evolution* **64**, 108-115.

Jensen, K., Hahn, N. E., Palme, R., Saxton, K. & Francis, D. D. (2010). Vacuum-Cleaner Noise and Acute Stress Responses in Female C57BL/6 Mice (*Mus musculus*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* **49**, 300-306.

Jouventin, P., Aubin, T. & Lengagne, T. (1999). Finding a parent in a king penguin colony: the acoustic system of individual recognition. *Animal Behaviour* **57**, 1175-1183.

Kight, C. R. & Swaddle, J. P. (2011). How and why environmental noise impacts animals: an integrative, mechanistic review. *Ecology Letters* **14**, 1052-1061.

Kight, C. R., Saha, M. S. & Swaddle, J. P. (2012). Anthropogenic noise is associated with reductions in the productivity of breeding Eastern Bluebirds (*Sialia sialis*). *Ecological Applications* **22**, 1989-1996.

Korpimäki, E., Tolonen, P. & Bennett, G. F. (1995). Blood parasites, sexual selection and reproductive success of European kestrels. *Ecoscience* **2**, 335-343.

Laiolo, P. (2010). The emerging significance of bioacoustics in animal species conservation. *Biological Conservation* **143**, 1635-1645.

Lampe, U., Schmoll, T., Franzke, A. & Reinhold, K. (2012). Staying tuned: grasshoppers from noisy roadside habitats produce courtship signals with elevated frequency components. *Functional Ecology* **26**, 1348-1354.

Landys, M. M., Ramenofsky, M. & Wingfield, J. C. (2006). Actions of glucocorticoids at a seasonal baseline as compared to stress-related levels in the regulation of periodic life processes. *General and Comparative Endocrinology* **148**, 132-149.

Langlois, P. (2002). Les enrobés, les revêtements silencieux. Laboratoire des chaussées, Québec.

Laskemoen, T., Kleven, O., Fosroy, F., Robertson, R. J., Rudolfson, G. & Lifjeld, J. T. (2010). Sperm quantity and quality effects on fertilization success in a highly promiscuous passerine, the tree swallow *Tachycineta bicolor*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **64**, 1473-1483.

Leary, C. J., Garcia, A. M., Knapp, R. & Hawkins, D. L. (2008). Relationships among steroid hormone levels, vocal effort and body condition in an explosive-breeding toad. *Animal Behaviour* **76**, 175-185.

Lengagne, T., Aubin, T., Lauga, J. & Jouventin, P. (1999a). How do king penguins (*Aptenodytes patagonicus*) apply the mathematical theory of information to communicate in windy conditions? *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **266**, 1623-1628.

Lengagne, T., Aubin, T., Jouventin, P. & Lauga, J. (1999b). Acoustic communication in a king penguin colony: importance of bird location within the colony and of the body position of the listener. *Polar Biology* **21**, 262-268.

Lengagne, T. & Slater, P. J. B. (2002). The effects of rain on acoustic communication: tawny owls have good reason for calling less in wet weather. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **269**, 2121-2125

Lengagne, T. (2008). Traffic noise affects communication behaviour in a breeding anuran, *Hyla arborea*. *Biological Conservation* **141**, 2023-2031.

Lenzi, P., Frenzilli, G., Gesi, M., Ferrucci, M., Lazzeri, G., Fornai, F. & Nigro, M. (2003). DNA damage associated with ultrastructural alterations in rat myocardium after loud noise exposure. *Environmental Health Perspectives* **111**, 467-471.

Leonard, M. L. & Horn, A. G. (2012). Ambient noise increases missed detections in nestling birds. *Biology Letters* **8**, 530-532.

Liao, G. Y., Sakhaeifar, M. S., Heitzman, M., West, R., Waller, B., Wang, S. Y. & Ding, Y. M. (2014). The effects of pavement surface characteristics on tire/pavement noise. *Applied Acoustics* **76**, 14-23.

Liljedal, S., Folstad, I. & Skarstein, F. (1999). Secondary sex traits, parasites, immunity and ejaculate quality in the Arctic charr. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **266**, 1893-1898.

Lips, K. R., Brem, F., Brenes, R., Reeve, J. D., Alford, R. A., Voyles, J., Carey, C., Livo, L., Pessier, A. P. & Collins, J. P. (2006). Emerging infectious disease and the loss of biodiversity in a Neotropical amphibian community. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 3165-3170.

Lowry, H., Lill, A. & Wong, B. B. M. (2012). How Noisy Does a Noisy Miner Have to Be? Amplitude Adjustments of Alarm Calls in an Avian Urban 'Adapter'. *Plos One* **7**, 5.

Lowry, H., Lill, A. & Wong, B. B. M. (2013). Behavioural responses of wildlife to urban environments. *Biological Reviews* **88**, 537-549.

Lucas, L. D. & French, S. S. (2012). Stress-Induced Tradeoffs in a Free-Living Lizard across a Variable Landscape: Consequences for Individuals and Populations. *Plos One* **7**, 10.

Lugli, M., Yan, H. Y. & Fine, M. L. (2003). Acoustic communication in two freshwater gobies: the relationship between ambient noise, hearing thresholds and sound spectrum. *Journal of Comparative Physiology a-Neuroethology Sensory Neural and Behavioral Physiology* **189**, 309-320.

Luther, D. & Gentry, K. (2013). Sources of background noise and their influence on vertebrate acoustic communication. *Behaviour* **150**, 1045-1068.

Maklakov, A. A., Immler, S., Gonzalez-Voyer, A., Ronn, J. & Kolm, N. (2011). Brains and the city: big-brained passerine birds succeed in urban environments. *Biology Letters* **7**, 730-732.

Manabe, K., Sadr, E. I. & Dooling, R. J. (1998). Control of vocal intensity in budgerigars (*Melopsittacus undulatus*): Differential reinforcement of vocal intensity and the Lombard effect. *Journal of the Acoustical Society of America* **103**, 1190-1198.

Mappes, J., Marples, N. and Endler, J. A. (2005). The complex business of survival by aposematism. *Trends in Ecology & Evolution* **20**, 598-603.

Marler, P. (1967). Animal communication signals. *Science* **157**, 769-&.

Marler, C. A. & Ryan, M. J. (1996). Energetic constraints and steroid hormone correlates of male calling behaviour in the tungara frog. *Journal of Zoology* **240**, 397-409.

Marten, K. & Marler, P. (1977). Sound-transmission and its significance for animal vocalization .1. temperate habitats. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **2**, 271-290.

Martin, T. E., Moller, A. P., Merino, S. & Clobert, J. (2001). Does clutch size evolve in response to parasites and immunocompetence? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2071-2076.

Martin, L. B., Gilliam, J., Han, P., Lee, K. & Wikelski, M. (2005). Corticosterone suppresses cutaneous immune function in temperate but not tropical House Sparrows, *Passer domesticus*. *General and Comparative Endocrinology* **140**, 126-135.

Martin, J. P., Doucet, S. M., Knox, R. C. & Mennill, D. J. (2011). Body size correlates negatively with the frequency of distress calls and songs of Neotropical birds. *Journal of Field Ornithology* **82**, 259-268.

May-Collado, L. J., Agnarsson, I. & Wartzok, D. (2007). Reexamining the Relationship Between Body Size and Tonal Signals Frequency in Whales: A Comparative Approach Using a Novel Phylogeny. *Marine Mammal Science* **23**, 524-552.

McAuliffe, M. J., Gibson, E. M. R., Kerr, S. E., Anderson, T. and LaShell, P. J. (2013). Vocabulary influences older and younger listeners' processing of dysarthric speech. *Journal of the Acoustical Society of America* **134**, 1358-1368.

McGraw, K. J. & Ardia, D. R. (2003). Carotenoids, immunocompetence, and the information content of sexual colors: An experimental test. *American Naturalist* **162**, 704-712.

McKinney, M. L. (2006). Urbanization as a major cause of biotic homogenization. *Biological Conservation* **127**, 247-260.

Mery, F. & Burns, J. G. (2010). Behavioural plasticity: an interaction between evolution and experience. *Evolutionary Ecology* **24**, 571-583.

Meyer, A. F., Peterson, R. L. & Bell, H. E. (1953). Noise as a factor in health. *American Journal of Public Health* **43**, 978-988.

Mockford, E. J. & Marshall, R. C. (2009). Effects of urban noise on song and response behaviour in great tits. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **276**, 2979-2985.

Moller, A. P. & Saino, N. (2004). Immune response and survival. *Oikos* **104**, 299-304.

Moller, A. P. (2008). Flight distance of urban birds, predation, and selection for urban life. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **63**, 63-75.

Monaghan, P., Metcalfe, N. B. & Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* **12**, 75-92.

Moran, N. A. (1992). The evolutionary maintenance of alternative phenotypes. *American Naturalist* **139**, 971-989.

Mougeot, F., Martinez-Padilla, J., Bortolotti, G. R., Webster, L. M. I. & Piertney, S. B. (2010). Physiological stress links parasites to carotenoid-based colour signals (vol 23, pg 643, 2010). *Journal of Evolutionary Biology* **23**, 1579-1579.

Moya-Larano, J. & Fox, C. W. (2006). Ejaculate size, second male size, and moderate polyandry increase female fecundity in a seed beetle. *Behavioral Ecology* **17**, 940-946.

Mun, S., Cho, D. S. & Choi, T. M. (2007). Influence of pavement surface noise: the Korea Highway Corporation test road. *Canadian Journal of Civil Engineering* **34**, 809-816.

Naguib, M., van Oers, K., Braakhuis, A., Griffioen, M., de Goede, P. & Waas, J. R. (2013). Noise annoys: effects of noise on breeding great tits depend on personality but not on noise characteristics. *Animal Behaviour* **85**, 949-956.

Nemeth, E. & Brumm, H. (2009). Blackbirds sing higher-pitched songs in cities: adaptation to habitat acoustics or side-effect of urbanization? *Animal Behaviour* **78**, 637-641.

Nemeth, E. & Brumm, H. (2010). Birds and Anthropogenic Noise: Are Urban Songs Adaptive? *American Naturalist* **176**, 465-475.

Office des ponts et chaussées du canton de Berne (2010). OPC Dimension

Ohrstrom, E., Skanberg, A., Svensson, H. & Gidlof-Gunnarsson, A. (2006). Effects of road traffic noise and the benefit of access to quietness. *Journal of Sound and Vibration* **295**, 40-59.

Otte, D. (1974). Effects and functions in the evolution of signaling systems. *A. rev. Ecol. System.* **5**, 385-417.

Parris, K. M. & Schneider, A. (2009). Impacts of Traffic Noise and Traffic Volume on Birds of Roadside Habitats. *Ecology and Society* **14**, 23.

Parris, K. M., Velik-Lord, M. & North, J. M. A. (2009). Frogs Call at a Higher Pitch in Traffic Noise. *Ecology and Society* **14**, 24.

Partan, S. & Marler, P. (1999). Behavior - Communication goes multimodal. *Science* **283**, 1272-1273.

Partan, S. R. & Marler, P. (2005). Issues in the classification of multimodal communication signals. *American Naturalist* **166**, 231-245.

Partan, S. R., Fulmer, A. G., Gounard, M. A. M. & Redmond, J. E. (2010). Multimodal alarm behavior in urban and rural gray squirrels studied by means of observation and a mechanical robot. *Current Zoology* **56**, 313-326..

Partecke, J., Schwabl, I. & Gwinner, E. (2006). Stress and the city: Urbanization and its effects on the stress physiology in European Blackbirds. *Ecology* **87**, 1945-1952.

Peris, S. J. & Pescador, M. (2004). Effects of traffic noise on passerine populations in Mediterranean wooded pastures. *Applied Acoustics* **65**, 357-366.

Peters, A. (2000). Testosterone treatment is immunosuppressive in superb fairy-wrens, yet free-living males with high testosterone are more immunocompetent. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **267**, 883-889.

Pirrerera, S., De Valck, E. & Cluydts, R. (2010). Nocturnal road traffic noise: A review on its assessment and consequences on sleep and health. *Environment International* **36**, 492-498.

Pirrerera, S., De Valck, E. & Cluydts, R. (2011). Nocturnal road traffic noise assessment and sleep research: The usefulness of different timeframes and in- and outdoor noise measurements. *Applied Acoustics* **72**, 677-683.

Pohl, N. U., Slabbekoorn, H., Klump, G. M. & Langemann, U. (2009). Effects of signal features and environmental noise on signal detection in the great tit, *Parus major*. *Animal Behaviour* **78**, 1293-1300.

Pohl, N. U., Leadbeater, E., Slabbekoorn, H., Klump, G. M. & Langemann, U. (2012). Great tits in urban noise benefit from high frequencies in song detection and discrimination. *Animal Behaviour* **83**, 711-721.

Potash, L. M. (1972). Noise-induced changes in calls of japanese-quail. *Psychonomic Science* **26**, 252-&.

Potvin, D. A., Parris, K. M. & Mulder, R. A. (2011). Geographically pervasive effects of urban noise on frequency and syllable rate of songs and calls in silvereyes (*Zosterops lateralis*). *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **278**, 2464-2469.

Pounds, J. A., Bustamante, M. R., Coloma, L. A., Consuegra, J. A., Fogden, M. P. L., Foster, P. N., La Marca, E., Masters, K. L., Merino-Viteri, A., Puschendorf, R. et al. (2006). Widespread amphibian extinctions from epidemic disease driven by global warming. *Nature* **439**, 161-167.

Prasher, D. (1998). Traffic noise increases stress by driving up cortisol. *Lancet* **352**, 1201-1201.

Preininger, D., Boeckle, M., Sztatecsny, M. & Hodl, W. (2013). Divergent Receiver Responses to Components of Multimodal Signals in Two Foot-Flagging Frog Species. *Plos One* **8**, 9.

Prestwich, K. N. (1994). The energetics of acoustic signaling in anurans and insects. *American Zoologist* **34**, 625-643.

Prokop, Z. M., Michalczyk, L., Drobniak, S. M., Herdegen, M. & Radwan, J. (2012). Meta-analysis suggests choosy females get sexy sons more than "good genes". *Evolution* **66**, 2665-2673.

Proppe, D. S., Sturdy, C. B. & St Clair, C. C. (2013). Anthropogenic noise decreases urban songbird diversity and may contribute to homogenization. *Global Change Biology* **19**, 1075-1084.

Quinn, J. L., Whittingham, M. J., Butler, S. J. & Cresswell, W. (2006). Noise, predation risk compensation and vigilance in the chaffinch *Fringilla coelebs*. *Journal of Avian Biology* **37**, 601-608.

Rabin, L. A. & Greene, C. M. (2002). Changes to acoustic communication systems in human-altered environments. *Journal of Comparative Psychology* **116**, 137-141.

Reijnen, R. & Foppen, R. (1994). The effects of car traffic on breeding bird populations in woodland .1. evidence of reduced habitat quality for willow warblers (*Phylloscopus-trochilus*) breeding close to a highway. *Journal of Applied Ecology* **31**, 85-94.

Reijnen, R., Foppen, R., Terbraak, C. & Thissen, J. (1995). The effects of car traffic on breeding bird populations in woodland .3. reduction of density in relation to the proximity of main roads. *Journal of Applied Ecology* **32**, 187-202.

Reijnen, R., Foppen, R. & Meeuwsen, H. (1996). The effects of traffic on the density of breeding birds in Dutch agricultural grasslands. *Biological Conservation* **75**, 255-260.

Rheindt, F. E. (2003). The impact of roads on birds: Does song frequency play a role in determining susceptibility to noise pollution? *Journal Fur Ornithologie* **144**, 295-306.

Richardson, C., Joly, P., Lena, J. P., Plenet, S. & Lengagne, T. (2010). The challenge of finding a high-quality male: a treefrog solution based on female assessment of male calls. *Behaviour* **147**, 1737-1752.

Richardson, C., Lena, J. P., Joly, P. & Lengagne, T. (2008). Are leaders good mates? A study of call timing and male quality in a chorus situation. *Animal Behaviour* **76**, 1487-1495.

Richardson, C., Popovici, J., Bellvert, F. & Lengagne, T. (2009). Conspicuous colouration of the vocal sac of a nocturnal chorusing treefrog: carotenoid-based? *Amphibia-Reptilia* **30**, 576-580.

Richardson, C. & Lengagne, T. (2010). Multiple signals and male spacing affect female preference at cocktail parties in treefrogs. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **277**, 1247-1252.

Richter, T. & von Zglinicki, T. (2007). A continuous correlation between oxidative stress and telomere shortening in fibroblasts. *Experimental Gerontology* **42**, 1039-1042.

Ripmeester, E. A. P., de Vries, A. M. & Slabbekoorn, H. (2007). Do blackbirds signal motivation to fight with their song? *Ethology* **113**, 1021-1028.

Ripmeester, E. A. P., Mulder, M. & Slabbekoorn, H. (2010). Habitat-dependent acoustic divergence affects playback response in urban and forest populations of the European blackbird. *Behavioral Ecology* **21**, 876-883.

Ritschard, M. & Brumm, H. (2013). Zebra finch song reflects current food availability. *Evolutionary Ecology* **26**, 801-812.

Romero, L. M. & Butler, L. K. (2007). Endocrinology of stress. *International Journal of Comparative Psychology* **20**, 89-95.

Rowe, C. (1999). Receiver psychology and the evolution of multicomponent signals. *Animal Behaviour* **58**, 921-931.

Ruiz, G., Rosenmann, M., Novoa, F. F. & Sabat, P. (2002). Hematological parameters and stress index in rufous-collared sparrows dwelling in urban environments. *Condor* **104**, 162-166.

Ryan, M. J. & Brenowitz, E. A. (1985). The Role of Body Size, Phylogeny, and Ambient Noise in the Evolution of Bird Song. *American Naturalist* **126**, 87-100.

Salaberria, C. & Gil, D. (2010). Increase in song frequency in response to urban noise in the great tit *Parus major* as shown by data from the madrid (spain) city noise map. *Ardeola* **57**, 3-11.

Schieber, J. P. & Mery, J. (1967). Laboratory study of disturbance of nocturnal sleep by automobile traffic noise. *Travail Humain* **30**, 343-&.

Schieber, J. P. & Mery, J. (1968). Experimental disturbances of onset and of first 2 hours of night-sleep by automobile traffic noises. *Ergonomics* **11**, 85-&.

Schulz, A., Strelzyk, F., de Sa, D. S. F., Naumann, E., Vogele, C. and Schachinger, H. (2013). Cortisol rapidly affects amplitudes of heartbeat-evoked brain potentials- Implications for the contribution of stress to an altered perception of physical sensations? *Psychoneuroendocrinology* **38**, 2686-2693.

Selander, J., Nilsson, M. E., Bluhm, G., Rosenlund, M., Lindqvist, M., Nise, G. & Pershagen, G. (2009). Long-Term Exposure to Road Traffic Noise and Myocardial Infarction. *Epidemiology* **20**, 272-279.

Shannon, C. E. & Weaver, W. (1949). The mathematical theory of communication.

Shieh, B. S., Liang, S. H., Chen, C. C., Loa, H. H. & Liao, C. Y. (2012). Acoustic adaptations to anthropogenic noise in the cicada *Cryptotympana takasagona* Kato (Hemiptera: Cicadidae). *Acta Ethologica* **15**, 33-38.

Skanberg, A. & Ohrstrom, E. (2006). Sleep disturbances from road traffic noise: A comparison between laboratory and field settings. *Journal of Sound and Vibration* **290**, 3-16.

Slabbekoorn, H. & Smith, T. B. (2002). Habitat-dependent song divergence in the little greenbul: An analysis of environmental selection pressures on acoustic signals. *Evolution* **56**, 1849-1858.

Slabbekoorn, H. & Peet, M. (2003). Ecology: Birds sing at a higher pitch in urban noise - Great tits hit the high notes to ensure that their mating calls are heard above the city's din. *Nature* **424**, 267-267.

Slabbekoorn, H. (2004). Habitat-dependent ambient noise: Consistent spectral profiles in two African forest types. *Journal of the Acoustical Society of America* **116**, 3727-3733.

Slabbekoorn, H. & Ripmeester, E. A. P. (2008). Birdsong and anthropogenic noise: implications and applications for conservation. *Molecular Ecology* **17**, 72-83.

Slabbekoorn, H. (2013). Songs of the city: noise-dependent spectral plasticity in the acoustic phenotype of urban birds. *Animal Behaviour* **85**, 1089-1099.

Smith, G. C. & Carlile, N. (1993). Food and feeding ecology of breeding silver gulls (*Larus-novaehollandiae*) in urban Australia. *Colonial Waterbirds* **16**, 9-17.

Snell-Rood, E. C. (2013). An overview of the evolutionary causes and consequences of behavioural plasticity. *Animal Behaviour* **85**, 1004-1011.

Sol, D., Lapiedra, O. & Gonzalez-Lagos, C. (2013). Behavioural adjustments for a life in the city. *Animal Behaviour* **85**, 1101-1112.

Soldani, P., Pellegrini, A., Gesi, M., Lenzi, P., Cristofani, R. & Paparelli, A. (1997). SEM/TEM investigation of rat cardiac subcellular alterations induced by changing duration of noise stress. *Anatomical Record* **248**, 521-532.

Spellerberg, I. F. (1998). Ecological effects of roads and traffic: a literature review. *Global Ecology and Biogeography* **7**, 317-333.

Stephens, D. W. (1991). Change, regularity, and value in the evolution of animal learning. *Behavioral Ecology* **2**, 77-89.

Strasser, E. H. & Heath, J. A. (2013). Reproductive failure of a human-tolerant species, the American kestrel, is associated with stress and human disturbance. *Journal of Applied Ecology* **50**, 912-919.

Sun, J. W. C. & Narins, P. A. (2005). Anthropogenic sounds differentially affect amphibian call rate. *Biological Conservation* **121**, 419-427.

Tarano, Z. & Herrera, E. A. (2003). Female preferences for call traits and male mating success in the neotropical frog *Physalaemus enesefae*. *Ethology* **109**, 121-134.

Taylor, P. W., Roberts, J. A. & Uetz, G. W. (2005). Flexibility in the multi-modal courtship of a wolf spider, *Schizocosa ocreata*. *Journal of Ethology* **23**, 71-75.

ten Cate, C., Slabbekoorn, H. & Ballintijn, M. R. (2002). Birdsong and male-male competition: Causes and consequences of vocal variability in the collared dove (*Streptopelia decaocto*). *Advances in the Study of Behavior, Vol 31* **31**, 31-75.

Tolhurst, G. C. (1956). Speech reception and temporary hearing loss as a function of exposure to high-level noise. *Journal of the Acoustical Society of America* **28**, 557-560.

Uetz, G.W., Roberts, J.A. & Taylor, P.W. (2009). Multimodal communication and mate choice in wolf spiders: female response to multimodal versus unimodal signals. *Animal Behaviour*, 78: 299-305.

VanRaaij, M. T. M., Oortgiesen, M., Timmerman, H. H., Dobbe, C. J. G. & VanLoveren, H. (1996). Time-dependent differential changes of immune function in rats exposed to chronic intermittent noise. *Physiology & Behavior* **60**, 1527-1533.

Vargas-Salinas, F. & Amezcuita, A. (2014). Abiotic noise, call frequency and stream-breeding anuran assemblages. *Evolutionary Ecology* **28**, 341-359.

Verzijden, M. N., Ripmeester, E. A. P., Ohms, V. R., Snelderwaard, P. & Slabbekoorn, H. (2010). Immediate spectral flexibility in singing chiffchaffs during experimental exposure to highway noise. *Journal of Experimental Biology* **213**, 2575-2581.

Wagner, H., Kautz, D. & Poganiatz, I. (1997). Principles of acoustic motion detection in animals and man. *Trends in Neurosciences* **20**, 583-588.

Warren, P. S., Katti, M., Ermann, M. & Brazel, A. (2006). Urban bioacoustics: it's not just noise. *Animal Behaviour* **71**, 491-502.

Waser, P. M. & Brown, C. H. (1986). Habitat acoustics and primate communication. *American Journal of Primatology* **10**, 135-154.

Wheeler, D. E. (1950). Noise-induced hearing loss. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery* **51**, 344-355.

Wiersma, P., Selman, C., Speakman, J. R. & Verhulst, S. (2004). Birds sacrifice oxidative protection for reproduction. *Proceedings of the Royal Society B-Biological Sciences* **271**, S360-S363.

Wiley, R. H. & Richards, D. G. (1978). Physical constraints on acoustic communication in atmosphere - implications for evolution of animal vocalizations. *Behavioral Ecology and Sociobiology* **3**, 69-94.

Wiley, R. H. & Richards, D. G. (1982). Adaptations for acoustics communication in birds: Sound transmission and signal detection. In "Acoustic Communication in Birds." (D. E. Kroodsma & E. H. Miller, Eds.) Vol. 1, pp. 131-181. Academic Press, New York.

Wilgers, D. J. & Hebets, E. A. (2011). Complex courtship displays facilitate male reproductive success and plasticity in signaling across variable environments. *Current Zoology* **57**, 175-186.

Wood, W. E. & Yezerinac, S. M. (2006). Song sparrow (*Melospiza melodia*) song varies with urban noise. *Auk* **123**, 650-659.

Woodgate, J. L., Mariette, M. M., Bennett, A. T. D., Griffith, S. C. & Buchanan, K. L. (2012). Male song structure predicts reproductive success in a wild zebra finch population. *Animal Behaviour* **83**, 773-781.

Wright, A. J., Soto, N. A., Baldwin, N. A., Bateson, M., Beale, C. M., Clark, C., Deak, T., Edwards, E. F., Fernandez, A., Godinho, A. et al. (2007). Anthropogenic Noise as a Stressor in Animals: A Multidisciplinary Perspective. *International Journal of Comparative Psychology* **20**, 250-273.

Wu, G. M., Boivin, G., Brodeur, J., Giraldeau, L. A. & Outreman, Y. (2010). Altruistic defence behaviours in aphids. *Bmc Evolutionary Biology* **10**, 10.

Yaffe, C. D. (1954). A study of industrial noise and hearing loss in a controlled population - a preliminary report. *Public Health Reports* **69**, 815-817.

Zahavi, A. (1975). Mate selection - selection for a handicap. *Journal of Theoretical Biology* **53**, 205-214.

Zhang, S. P., Lei, F. M., Liu, S. L., Li, D. M., Chen, C. & Wang, P. Z. (2011). Variation in baseline corticosterone levels of Tree Sparrow (*Passer montanus*) populations along an urban gradient in Beijing, China. *Journal of Ornithology* **152**, 801-806.

Zheng, K. C. & Ariizumi, M. (2007). Modulations of immune functions and oxidative status induced by noise stress. *Journal of Occupational Health* **49**, 32-38.