

VARIATION SPATIO-TEMPORELLE DANS LA RÉGULATION DU PROFIL
OXYDATIF CHEZ UN RONGEUR EN MILIEU NATUREL

par

Vincent Lemieux

mémoire présenté au Département de biologie en vue
de l'obtention de grade de maître ès sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, janvier 2019

Le 26 janvier 2019

*le jury a accepté le mémoire de Monsieur Vincent Lemieux
dans sa version finale*

Membres du jury

Professeur Dany Garant
Directeur de recherche
Département de biologie

Professeur Patrick Bergeron
Codirecteur de recherche
Département de biologie, Université Bishops

Professeure Fanie Pelletier
Évaluatrice interne
Département de biologie

Professeur Marco Festa-Bianchet
Président rapporteur
Département de biologie

SOMMAIRE

La dynamique de compromis d'allocation des ressources peut changer en fonction des contextes écologiques et environnementaux, ce qui peut affecter l'expression des traits d'histoire de vie ainsi que le succès reproducteur. Ces compromis sont généralement étudiés au niveau énergétique, cependant l'importance potentielle des compromis physiologiques est de plus en plus reconnue, comme ceux liés à la régulation du stress oxydatif. Ce dernier représente le déséquilibre entre la production d'espèces réactives instables et les mécanismes de protection cellulaire. Toutefois, peu d'études ont tenté de cibler les facteurs responsables de ses variations en milieu naturel. Dans ce contexte, mon projet de recherche vise à effectuer un suivi temporel du profil oxydatif d'une population de tamias rayé (*Tamias striatus*) en milieu naturel. J'ai observé une diminution de la protection antioxydante couplée à une hausse des dommages oxydatifs au cours de la période d'étude, ainsi que des niveaux d'antioxydants différents entre les sites d'étude. De plus, au printemps, les niveaux de dommages oxydatifs étaient plus élevés chez les femelles ainsi que chez les individus avec une plus grande masse corporelle. Finalement, les mâles avaient des niveaux d'antioxydants plus élevés durant l'ensemble de la période d'étude. Ces résultats suggèrent que des changements dans les contextes écologiques, physiologiques et environnementaux peuvent influencer la dynamique de compromis d'allocation des ressources, ce qui semble affecter la régulation du stress oxydatif. Ils illustrent également l'importance d'effectuer un suivi temporel pour cibler l'ensemble des causes de la variation de traits physiologiques comme la régulation du stress oxydatif.

Mots-clés : Compromis d'allocation, Dommages oxydatifs, Antioxydants, Disponibilité de nourriture, Fluctuations saisonnières, Rongeurs

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mes deux directeurs Patrick Bergeron et Dany Garant pour leur confiance et support inégalés. Par vos conseils, votre encadrement de qualité et votre efficacité, vous avez propulsé le projet vers l'avant et avez contribué grandement à mon apprentissage professionnel. Je remercie aussi Denis Réale, pour sa contribution au projet et ses commentaires pertinents sur mes travaux. Merci également aux membres de mon comité de conseillers, Fanie Pelletier et Marco Festa-Bianchet, pour leurs idées et conseils émis lors de nos rencontres. Merci au Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada et aux Fonds de recherche nature et technologie du Québec pour le financement du projet. Merci au Centre de la science de la biodiversité du Québec et au programme de valorisation des travaux étudiants de l'université de Sherbrooke pour leur soutien financier lors de ma participation à différents congrès.

Ce projet de recherche n'aurait pas pu voir le jour sans la contribution de nombreuses autres personnes et organismes. Merci aux départements de chimie et de biologie de l'Université Bishop's pour leur support logistique. Merci à la Réserve naturelle des Montagnes-Vertes de nous avoir donné l'accès à leur territoire depuis 2011. Merci également aux nombreux étudiants gradués et assistants de terrain invétérés ayant contribué au suivi à long terme, en particulier à l'équipe 2017 qui s'est investie sans limites dans la collecte de données spécifiques à mon projet. Je tiens également à remercier Carolyne et Philippine mes collègues de bureau et amies qui ont su maintenir une ambiance légère et dynamique, ainsi qu'Audrey Bourret pour sa compagnie et son habileté remarquable à répondre à mes nombreux questionnements. Finalement, un remerciement spécial à Camille Pelletier-Guittier, ma copine, qui m'a fait aller de l'avant durant l'ensemble de mes études grâce à ses encouragements et son support.

TABLE DES MATIÈRES

SOMMAIRE	v
REMERCIEMENTS	vi
TABLE DES MATIÈRES	vii
LISTE DES TABLEAUX.....	x
LISTE DES FIGURES	xi
CHAPITRE 1: INTRODUCTION GÉNÉRALE.....	1
1.1 Le stress oxydatif.....	3
1.1.1 Description générale.....	3
1.1.2 Moyens de protection : antioxydants.....	4
1.1.3 Moyens de protection : autres mécanismes	6
1.1.4 Mesurer le stress oxydatif.....	7
1.2 Relations avec les traits d’histoire de vie	9
1.3 Variations dans les profils oxydatifs	10
1.3.1 Dépense énergétique et métabolisme	11
1.3.2 Croissance et reproduction	12
1.3.3 Quête alimentaire et hétérogénéité environnementale	14
1.3.4 Parasitisme et réponse immunitaire.....	15
1.3.5 Plasticité	16
1.4 Objectifs	19
1.5 Espèce modèle : le <i>Tamia rayé</i>	20
1.5.1 Description générale.....	20
1.5.2 Dynamique de poisson.....	21
1.5.3 Reproduction	21
1.5.4 Parasitisme.....	22
1.5.5 Torpeur	22
1.6 Hypothèses et prédictions.....	23

CHAPITRE 2: SPATIO-TEMPORAL VARIATIONS OF OXIDATIVE STRESS REGULATION IN A SMALL MAMMAL	24
2.1 Summary.....	25
2.2 Introduction	26
2.3 Materials and methods.....	29
2.3.1 Study site and data collection.....	29
2.3.2 Blood collection	30
2.3.3 Oxidative stress markers measurements.....	31
2.3.3.1 Oxidative damages	31
2.3.3.2 Antioxidant protection.....	32
2.3.3.2.1 The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay.....	32
2.3.3.2.2 Hypochlorous acid shock capacity (HASC) assay.....	32
2.4 Statistical analyses.....	33
2.5 Results	34
2.5.1 Relationships between markers	34
2.5.2 Individual and environmental determinants at the population level	34
2.5.2.1 MDA.....	34
2.5.2.2 FRAP	36
2.5.2.3 HASC.....	37
2.5 Discussion	40
2.5.3 Population-level temporal variation	41
2.5.4 Spatial variation in antioxidant capacity	42
2.5.5 Time-dependent mass effect on oxidative damages.....	43
2.5.6 Sex difference in oxidative profiles.....	43
2.6 Conclusion.....	44
2.7 Authors contributions	45
2.8 Acknowledgements	45
2.9 References	46
2.10 Supplementary material	54

CHAPITRE 3: DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION.....	61
3.1 Retour sur les objectifs	61
3.2 Retour sur les résultats.....	61
3.3 Limitations du projet et perspectives futures.....	64
3.4 Conclusion.....	68
ANNEXE A: DEVELOPMENT OF SMALL BLOOD VOLUME ASSAYS FOR THE MEASUREMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN MAMMALS	69
A.2 Introduction	71
A.2.1 Oxydative damages.....	72
A.2.1.1 Malondialdehyde (MDA).....	72
A.2.2 Antioxidant protection.....	73
A.2.2.1 Ferric reducing/antioxidant power (FRAP)	73
A.2.2.2 Hypochlorous acid shock capacity assay (HASC).....	74
A.3 Materials and methods.....	75
A.3.1 Study population and sample collection	75
A.3.2 MDA analysis by HPLC	76
A.3.2.1 MDA Reagents and system settings.....	76
A.3.2.2 MDA analysis for 20 µL of plasma	77
A.3.3 FRAP and HASC analyses by spectrophotometry	78
A.3.3.1 System settings.....	78
A.3.3.2 Uric Acid Independent FRAP analysis for 5 µL of plasma	78
A.3.3.3 HASC analysis for 1 µL of plasma	79
A.4 Statistical analyses.....	80
A.5 Results	80
A.6 Discussion	84
A.7 Acknowledgments	87
A.8 References	87
BIBLIOGRAPHIE	93

LISTE DES TABLEAUX

Table 1.	Final model of determinants of population malondialdehyde levels (MDA, oxidative damages).	35
Table 2.	Final model of determinants of population ferric reducing antioxidant power values (FRAP, total antioxidant capacity).	36
Table 3.	Final model of determinants of population hypochlorous acid shock capacity values (HASC, total antioxidant capacity).	37
Table S1.	Summary of the 2017 sample sizes.	54
Table S2.	Full model of determinants of population malondialdehyde levels (MDA, oxidative damages).	55
Table S3.	Full model of determinants of population ferric reducing antioxidant power values (FRAP, total antioxidant capacity).	56
Table S4.	Full model of determinants of population hypochlorous acid shock capacity values (HASC, total antioxidant capacity).	57
Table S5.	Random regression analyses of the effect of the Julian day on markers values (malondialdehyde levels, MDA; ferric reducing antioxidant power, FRAP; hypochlorous acid shock capacity, HASC).	58
Table S6.	Sites' edible spring plant density obtained from a linear model.	58
Table S7.	Full model of determinants of 2017 spring mass catch-up growth.	59

LISTE DES FIGURES

Figure 1.	Population-level values of oxidative stress markers at each 2017 sampling periods (with 95% upper and lower confidence intervals). ...	38
Figure 2.	Effect of mass on malondialdehyde levels (MDA, oxidative damages) in an eastern chipmunk population for each 2017 sampling period (May: n = 71, June: n = 73, August: n = 39 plasma samples).	39
Figure 3.	Total antioxidant capacity differences among sites in an eastern chipmunk population, in 2017, with upper and lower 95% confidence interval (error bars).	40
Figure S1.	Among sites differences in microhabitat edible spring plant density (Site 1: n = 58, Site 2: n = 33, Site 3: n = 11).	60
Figure A1.	(a) HPLC chromatogram of 5 μ M MDA standard, (b) HPLC chromatogram of plasma sample from an eastern chipmunk showing separation of interfering substances and MDA.	81
Figure A2.	Distribution of MDA concentrations found in a population of wild eastern chipmunks (<i>Tamias striatus</i>).	82
Figure A3.	Distribution of FRAP assay values found in a population of wild eastern chipmunks (<i>Tamias striatus</i>).	83
Figure A4.	Distribution of hypochlorous acid shock capacities for 1 μ L plasma found in a population of wild eastern chipmunks (<i>Tamias striatus</i>). ...	84

CHAPITRE 1

INTRODUCTION GÉNÉRALE

La théorie de l'évolution par sélection naturelle prédit que l'expression d'un trait héritable favorable au succès reproducteur et à la survie devrait être transmise aux générations futures et augmenter en fréquence (Fisher, 1930). Par exemple, produire une plus grande portée devrait favoriser la dispersion des gènes des parents dans une population et mener à une augmentation de la taille de portée dans les générations subséquentes. Cependant, il est difficile d'observer la maximisation de l'expression des traits liés au succès reproducteur et à la survie en nature, suggérant que des mécanismes imposent des limites (Stearns, 1992). La théorie de l'évolution des traits d'histoire de vie avance que ceux-ci seraient en grande partie médiés par des compromis d'allocation des ressources. Selon cette dernière, une certaine quantité de ressources ayant été investie dans un trait ne peut être investie dans les autres traits au sein d'un même individu (Stearns, 1989). Lorsque les ressources sont limitées, il en résulte alors des compromis pour l'expression de différents traits en compétition, dont l'issue peut influencer l'aptitude phénotypique et donc potentiellement être soumise à la sélection (Stearns, 1992). Ce faisant, les compromis d'allocation occupent une place centrale dans l'évolution des traits d'histoire de vie et semblent avoir modulé la coévolution d'une multitude de traits, autant physiologiques que morphologiques et comportementaux, chez les différentes espèces (Stearns, 1992).

Les compromis ne semblent pas statiques et sont sujets à des variations au cours de la vie d'un individu. Par exemple, une plus grande disponibilité de nourriture devrait faciliter un investissement simultané dans des traits normalement en compétition pour des ressources énergétiques (Zera et Harshman, 2001). À l'inverse, une disponibilité réduite peut contraindre le maintien de l'investissement dans les traits les plus importants, comme le succès reproducteur actuel ou la survie, au détriment des autres (Erikstad *et al.*, 1998;

Kaitala, 1991). De plus, le gain d'aptitude phénotypique suite à l'investissement dans un trait peut changer dans le temps, rendant avantageuse la capacité de moduler l'allocation selon le contexte écologique (Hirshfield et Tinkle, 1975; Zera et Harshman, 2001). De telles modulations peuvent survenir au cours de la vie d'un individu, par exemple lors de l'augmentation de l'effort reproducteur avec le développement (Hirshfield et Tinkle, 1975), ou se produire à plus fine échelle temporelle, comme lors de l'activation du système immunitaire suite à une infection (Bonneaud *et al.*, 2003; Lochmiller et Deerenberg, 2000). Dans l'optique de comprendre l'impact des compromis dans l'expression des traits d'histoire de vie, il apparaît donc primordial de considérer les contextes écologiques et physiologiques des organismes à l'étude.

L'étude des compromis d'allocation est habituellement centrée autour des compromis énergétiques, cependant il a été récemment suggéré que les organismes pourraient également faire face à des compromis de nature physiologique, comme ceux entourant la régulation du stress oxydatif (Catoni *et al.*, 2008; Monaghan *et al.*, 2009). En effet, l'utilisation accrue de la machinerie métabolique pourrait entraîner la production de molécules instables pouvant oxyder et altérer différentes composantes cellulaires et dégrader la condition physique des individus, à moins d'un investissement dans différents mécanismes de protection et de réparation (Halliwell et Gutteridge, 2015). Étant potentiellement impliqué dans l'expression de plusieurs traits d'histoire de vie, comme la croissance, la reproduction et la longévité (Alonso-Álvarez *et al.*, 2016; Costantini et Møller, 2009; Finkel et Holbrook, 2000), le stress oxydatif intéresse de plus en plus les écophysiologistes, car il pourrait représenter un mécanisme physiologique par lequel les compromis d'allocation actuels peuvent avoir une répercussion sur le succès futur des organismes (Costantini, 2014; Isaksson *et al.*, 2011). Toutefois, notre compréhension de l'effet de l'expression de différents traits sur sa régulation est encore fragmentaire, surtout en milieu naturel.

C'est donc dans l'optique de mieux comprendre les facteurs pouvant causer de la variation dans la régulation du stress oxydatif que ce projet a été réalisé. Plus précisément, il vise à identifier les facteurs individuels et environnementaux responsables de variations dans la régulation du stress oxydatif dans une population de *Tamias rayés* (*Tamias striatus*) en milieu naturel. Dans ce chapitre, les mécanismes physiologiques principaux impliqués dans la génération et le contrôle des dommages oxydatifs, puis les principaux enjeux liés à la mesure du stress oxydatif seront décrits. Le rôle potentiel du stress oxydatif dans la dynamique des compromis d'histoire de vie sera ensuite abordé, suivi par un survol des principaux facteurs individuels et environnementaux pouvant influencer sa régulation, ce qui mènera aux objectifs de recherche et à la description de l'espèce à l'étude.

1.1 Le stress oxydatif

Description générale

Le stress oxydatif résulte de l'accumulation de dommages oxydatifs menant à la dégradation de différentes composantes cellulaires, causés par une grande variété de molécules instables nommées « espèces réactives de l'oxygène » ou « espèces réactives » (Costantini, 2014; Halliwell et Gutteridge, 2015). Bien qu'elles puissent être générées par plusieurs voies métaboliques, une grande partie des espèces réactives est issue d'un sous-produit de la respiration cellulaire (Halliwell et Gutteridge, 2015). En effet, lors de la circulation des électrons dans la chaîne de transport mitochondriale, il arrive que ceux-ci se lient prématurément à une molécule de dioxygène et forment l'anion superoxyde, un radical libre qui pourra réagir avec diverses molécules pour former différentes espèces réactives (Halliwell et Gutteridge, 2015). Ces dernières ont le potentiel d'oxyder et d'altérer de multiples molécules importantes, dont les protéines, les lipides et l'ADN (Halliwell et Gutteridge, 2015). Il est toutefois important de noter que les espèces réactives sont essentielles au bon fonctionnement de la cellule, étant impliquées dans de nombreux processus régulateurs incluant notamment le signalisation cellulaire et la régulation de

plusieurs gènes (revus dans Alfadda et Sallam, 2012 et Ayala, Muñoz et Argüelles, 2014). De ce fait, les niveaux des espèces réactives sont maintenus à l'intérieur d'un intervalle basal physiologique, ce qui implique qu'un niveau de dommage basal a toujours lieu, sans représenter un stress pour la cellule (Halliwell et Gutteridge, 2015; Hancock *et al.*, 2001). Toutefois, l'expression de traits ou fonctions métaboliquement demandant, comme la reproduction (Blount *et al.*, 2016), la croissance (Smith *et al.*, 2016) ou la réponse immunitaire (Costantini et Møller, 2009), peuvent augmenter le métabolisme énergétique et potentiellement la production indirecte d'espèces réactives. On parle alors de stress oxydatif lorsque la production des espèces réactives surpasse la capacité de neutralisation des différents mécanismes de protection (Halliwell et Gutteridge, 2015). La persistance de ce déséquilibre peut entraîner une accumulation des dommages oxydatifs sur diverses molécules importantes et nuire à l'intégrité de la cellule (Dröge, 2002). À plus large échelle, cela pourrait détériorer la condition des individus (Halliwell et Gutteridge, 2015) et affecter le succès reproducteur, ainsi que la survie (Costantini, 2014).

Moyens de protection : antioxydants

De nombreux mécanismes peuvent intervenir afin de réguler la production des espèces réactives et prévenir l'altération de molécules vitales, un des plus importants étant la protection antioxydante (Halliwell et Gutteridge, 2015). Les antioxydants catalysent la réaction des espèces réactives sur eux-mêmes ou sur une molécule tierce, évitant ainsi l'oxydation d'une composante plus importante de la cellule (Costantini, 2014; Halliwell et Gutteridge, 2015). Ils sont généralement séparés en deux groupes, ceux générés par la machinerie cellulaire (endogènes : e.g. enzymes) ou ceux acquis par la diète (diététiques : e.g. vitamines), en raison de leurs différentes implications dans la régulation du stress oxydatif (Halliwell et Gutteridge, 2015). Les antioxydants endogènes ont une expression réglable qui permet de s'adapter continuellement au statut physiologique de la cellule, toutefois, leur production pourrait présenter des coûts en énergie et en macronutriments (Costantini, 2014; Halliwell et Gutteridge, 2015). Ce n'est généralement pas le cas des antioxydants obtenus par la diète, cependant leur apport dépend de l'abondance de

nourriture et de sa teneur en antioxydants (Costantini, 2014). Leur importance dans le contrôle du stress oxydatif a été remise en question, puisque plusieurs études ont trouvé des effets mitigés d'une supplémentation en antioxydants sur la régulation des dommages oxydatifs et la longévité (Costantini et Møller, 2008; de Ayala *et al.*, 2006; Giraudeau *et al.*, 2013; Selman *et al.*, 2006; Vaanholt *et al.*, 2016). Toutefois, des failles dans la conception expérimentale pourraient en être la cause (Selman *et al.*, 2012). D'une part, le potentiel d'un antioxydant à neutraliser les espèces réactives peut dépendre d'interactions avec d'autres antioxydants (Catoni *et al.*, 2008; Orledge *et al.*, 2012). Ainsi, les études supplémentant un seul antioxydant pourraient ne pas être en mesure de capturer leur plein effet (Selman *et al.*, 2012). De plus, la nature de ces interactions peut changer lorsqu'ils sont supplémentés en grande quantité dans l'organisme (Catoni *et al.*, 2008). Par exemple, les caroténoïdes et l' α -tocophérol (vitamine E) peuvent entrer en compétition lors de l'absorption intestinale à fortes concentrations. La surreprésentation de l'un dans la diète peut donc réduire les niveaux du second dans l'organisme et nuire à la régulation du stress oxydatif (Catoni *et al.*, 2008; Giraudeau *et al.*, 2013). D'autre part, la contribution des antioxydants alimentaires sur la régulation du profil oxydatif pourrait n'être détectable qu'en situation de compromis d'allocation, là où le coût de production des antioxydants endogènes pourrait être plus pénalisant (Selman *et al.*, 2012). Cela rendrait les études procurant de la nourriture *ad libitum* inaptées à capturer les effets de la disponibilité variable d'antioxydants alimentaires sur la physiologie, vu la possibilité de compenser facilement par la production d'antioxydants endogènes (Costantini, 2010, 2014; Metcalfe et Monaghan, 2013). Des études en milieu naturel sont en mesure de capturer des effets de la disponibilité des antioxydants alimentaires sur l'expression de différents traits (Badás *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2010). Cela suggère que le coût oxydatif de l'allocation des ressources dans certains traits pourrait être plus élevé dans un contexte de ressources limitées.

Moyens de protection : autres mécanismes

Outre les antioxydants, la cellule possède de nombreux autres mécanismes de défense actifs ou passifs qui peuvent prévenir l'accumulation de dommages oxydatifs (revus dans Pamplona et Costantini, 2011), comme les protéines de découplage. Insérées dans la membrane interne de la mitochondrie, elles peuvent limiter la production d'espèces réactives en altérant le gradient de H^+ de part et d'autre de la membrane, ce qui augmente la consommation d'oxygène mitochondriale. Cela diminue la disponibilité du dioxygène et donc son taux de transformation en anion superoxyde, une espèce réactive commune issue du métabolisme énergétique (Brand, 2000; Speakman et Garratt, 2014). Leur action semble contribuer grandement au contrôle du stress oxydatif (Salin *et al.*, 2015) et pourrait augmenter la longévité (Brand, 2000; Speakman *et al.*, 2004).

De plus, des molécules autres que les antioxydants sont en mesure de mitiger les impacts des espèces réactives sur les tissus cellulaires, comme les amortisseurs. Ces derniers représentent une grande variété de molécules passives et leur oxydation n'a pas, ou peu, de répercussions sur l'intégrité de la cellule. Ils préviennent donc les dommages oxydatifs en se faisant oxyder à la place des composantes cellulaires plus importantes (Costantini, 2010; Dröge, 2002). Les amortisseurs ne sont pas considérés comme des antioxydants puisqu'ils ont une affinité modérée avec les espèces réactives et que leur régulation est indépendante du niveau d'oxydation de la cellule (Costantini, 2014). Cependant ils pourraient tout de même représenter une portion importante de la protection contre les dommages oxydatifs à cause de leur renouvellement rapide et leur abondance dans la cellule (Costantini, 2014; Pamplona et Costantini, 2011). Les amortisseurs comprennent notamment des protéines comme l'albumine (Roche *et al.*, 2008), des acides aminés (Elias *et al.*, 2005), des nucléotides (Richter et Fischer, 2006) ainsi que des déchets métaboliques comme l'acide urique (Skrip et Mcwilliams, 2016).

La composition de la cellule en elle-même peut aussi influencer sa vulnérabilité à l'oxydation par les espèces réactives. Cette dernière aurait évolué pour être résistante au stress oxydatif, puisque les macromolécules les plus vulnérables à l'oxydation sont souvent les moins abondantes (Barja, 2014; Hulbert *et al.*, 2006; Pamplona et Barja, 2007). Cela semble notamment être le cas pour les acides gras insaturés (Bielski *et al.*, 1983), le nucléotide guanine (Bjelland et Seeberg, 2003; Kovacic et Wakelin, 2001) et l'acide aminé méthionine (Barja, 2014) qui sont plus sensibles à l'oxydation.

Finalement, malgré la contribution de l'ensemble des mécanismes de protection, les espèces réactives oxydent et altèrent inévitablement des composantes cellulaires. Certains de ces dommages sont irréversibles et mènent à la dégradation de la molécule touchée (Halliwell et Gutteridge, 2015). Toutefois, la cellule est dotée de plusieurs mécanismes de réparation. Par exemple, des acides nucléiques oxydés peuvent être réparés avec plusieurs mécanismes généraux de dommages à l'ADN (revu dans Bjelland et Seeberg, 2003) et certaines enzymes permettent de réduire certains acides aminés oxydés dans les protéines, comme la méthionine et la cystéine (revues dans Friguet, 2006).

Mesurer le stress oxydatif

Malgré le consensus par rapport à la définition présentée, la notion de stress oxydatif demeure conceptuelle, puisqu'aucune métrique ne permet de le quantifier directement (Costantini, 2014; Skrip et McWilliams, 2016). En effet, la production et la neutralisation des espèces réactives, ainsi que la réparation des dommages, impliquent plusieurs voies métaboliques qui ne peuvent être capturées par un seul biomarqueur. Ce faisant, l'information pouvant être extraite d'un seul marqueur est généralement limitée et peut mener vers des erreurs d'interprétation. Par exemple, comme souligné par Costantini et Verhulst (2009), un niveau d'antioxydants plus élevé peut ne pas refléter une meilleure protection contre le stress oxydatif dans le cas où la production d'espèces réactives est aussi augmentée. Il est donc de plus en plus courant d'effectuer des analyses comparatives de

plusieurs biomarqueurs qui représentent autant que possible les différentes voies métaboliques impliquées dans la régulation du stress oxydatif. Puisque cela représente une mesure indirecte, plusieurs auteurs réfèrent au statut, à la balance ou au profil oxydatif (Costantini, 2018; de Boer *et al.*, 2017; Herborn *et al.*, 2011; Parolini *et al.*, 2018; Vaugoyeau *et al.*, 2015). Parmi les différents biomarqueurs utilisés, les plus étudiés sont probablement ceux reliés à la protection antioxydante et les dommages oxydatifs résultants (revus dans Beaulieu et Costantini, 2014). Dans l'optique de décrire simultanément la contribution de l'ensemble des voies métaboliques sur la régulation du stress oxydatif, les biomarqueurs estimant des indices d'oxydation généraux sont généralement privilégiés aux marqueurs plus spécifiques, surtout au niveau de la mesure des antioxydants (e.g.: capacité antioxydante totale, Beaulieu et Costantini, 2014). Toutefois, malgré la vue d'ensemble générée par ces marqueurs, leur interprétation peut être complexifiée par les différentes significations biologiques des multiples voies contribuant à leur valeur. Par exemple, l'expression élevée d'antioxydants endogènes pourrait refléter une augmentation de la production d'espèces réactives suivant un stress physiologique. À l'inverse, des niveaux élevés d'antioxydants diététiques pourraient représenter une altération moindre des antioxydants par les espèces réactives ou un apport élevé de l'environnement, ce qui reflèterait de bonnes conditions (Costantini, 2014).

Ainsi, bien qu'une grande diversité de biomarqueurs soit utilisée, aucun marqueur n'est considéré comme la « norme d'or » puisqu'il est pour le moment difficile de comparer la pertinence biologique de chacune des voies métaboliques mesurées (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017; Halliwell et Gutteridge, 2015; Selman *et al.*, 2012). De plus, la mesure de chacun des biomarqueurs peut être biaisée de différentes façons, notamment par certaines molécules connexes dont la production est indépendante de la régulation du stress oxydatif ou un manque de spécificité des essais biochimiques (Halliwell et Gutteridge, 2015). En plus du choix de marqueur, le choix de tissus à analyser peut potentiellement véhiculer des informations différentes sur le profil oxydatif, car leur activité métabolique et leur composition peuvent influencer leur susceptibilité à l'oxydation (Hulbert *et al.*, 2007). Dans un contexte de suivi en milieu naturel, le tissu sanguin est généralement utilisé afin

d'éviter un échantillonnage trop invasif (Beaulieu et Costantini, 2014; Selman *et al.*, 2012; Speakman *et al.*, 2015). Ce dernier reflèterait le profil oxydatif à court terme, tandis que l'analyse d'autres tissus comme le foie ou le cerveau donnerait plutôt des indices sur le profil oxydatif à plus long terme (Monaghan *et al.*, 2009; Selman *et al.*, 2012). Le tissu sanguin semble néanmoins représentatif du profil oxydatif général de l'organisme, étant souvent corrélé au niveau des autres tissus pour la majorité des marqueurs (Costantini, 2018; Margaritelis *et al.*, 2015; Veskoukis *et al.*, 2009), bien que certaines études rapportent des différences marquées (Garratt *et al.*, 2012; Oldakowski et Taylor, 2018; Xu *et al.*, 2014).

1.2 Relations avec les traits d'histoire de vie

Comme mentionné précédemment, le stress oxydatif est de plus en plus étudié, car il apparaît comme un mécanisme proximal pouvant potentiellement moduler le compromis entre le succès reproducteur actuel et futur (Costantini, 2014). En effet, puisque des dommages oxydatifs peuvent survenir à plusieurs endroits, incluant l'ADN, le stress oxydatif pourrait être un moteur de la sénescence et affecter la longévité (Finkel et Holbrook, 2000). Dans un contexte de compromis d'allocation des ressources, l'expression de différents traits d'histoire de vie ou fonctions physiologiques pourrait favoriser l'accumulation de dommages oxydatifs par le biais de deux mécanismes potentiels généralement acceptés (Costantini, 2014; Isaksson *et al.*, 2011; Monaghan *et al.*, 2009), bien que critiqués (Speakman et Garratt, 2014; Speakman et Selman, 2011). D'une part, l'expression de plusieurs voies métaboliques impliquées dans la régulation du stress oxydatif, incluant notamment la production d'antioxydants endogènes, pourrait présenter des coûts en ressources énergétiques ou en macronutriments. Ce faisant, l'allocation de ressources dans un trait bénéfique au succès reproducteur actuel au détriment de la protection antioxydante pourrait avoir des conséquences sur la survie future. D'autre part, l'expression de traits coûteux en énergie pourrait augmenter indirectement la production d'espèces réactives qui sont étroitement liées au métabolisme énergétique. Cela pourrait

favoriser l'accumulation de dommages oxydatifs, à moins d'un investissement accru dans les mécanismes de protection. Ainsi, en plus des coûts énergétiques directs, les différentes stratégies individuelles dans l'expression de traits reliés au métabolisme pourraient s'accompagner de coûts oxydatifs indirects ayant le potentiel d'affecter le succès reproducteur futur.

Cependant, des résultats empiriques contrastés suggèrent que les mécanismes par lesquels le stress oxydatif a des répercussions sur la longévité pourraient être plus complexes qu'initialement appréhendés (Speakman et Selman, 2011). Un exemple frappant se manifeste lors de la comparaison de deux études ayant évalué la relation entre les niveaux d'antioxydants constitutifs et les différentes trajectoires de développement chez respectivement 95 et 125 espèces aviaires (Cohen *et al.*, 2008; Galván *et al.*, 2012). Cohen *et al.* (2008) ont rapporté que les espèces au développement rapide et à longévité réduite présentaient généralement des niveaux d'antioxydants plus élevés, tandis que Galván *et al.* (2012) ont observé cette tendance chez les espèces longévives. Néanmoins, à l'échelle interindividuelle, plusieurs études rapportent des corrélations négatives entre les niveaux de stress oxydatif et la longévité ou la survie (Beaulieu *et al.*, 2015; Costantini et Dell'Omo, 2015; Losdat *et al.*, 2012; Niveditha *et al.*, 2017). Cela suggère un effet négatif du stress oxydatif sur le succès reproducteur futur, même si les mécanismes physiologiques impliqués sont pour l'instant mal compris.

1.3 Variations dans les profils oxydatifs

Puisque le taux de production des espèces réactives et l'expression des mécanismes de régulation peuvent être influencés par l'expression de différents traits ou fonctions physiologiques, les profils oxydatifs sont susceptibles de varier constamment en réponse à différents contextes physiologiques, écologiques et environnementaux (Costantini, 2014). Cependant, il est encore difficile d'identifier les causes de la variation inter et intraspécifique dans les profils oxydatifs en milieu naturel et de quantifier leurs effets

relatifs (Metcalfé et Alonso-Álvarez, 2010; Speakman *et al.*, 2015; Speakman et Garratt, 2014). Pourtant, cela apparaît essentiel afin de situer l'importance de ce trait dans des contextes écologiques et évolutifs. La compréhension actuelle de la manière par laquelle différents facteurs intrinsèques et extrinsèques peuvent influencer la régulation du stress oxydatif sera survolée dans les sections subséquentes.

Dépense énergétique et métabolisme

Un premier facteur susceptible d'influencer la génération des espèces réactives qui illustre bien notre compréhension fragmentaire du stress oxydatif est la dépense énergétique (Costantini, 2014). Jusqu'à récemment, il était généralement accepté qu'une hausse de la dépense énergétique ou du métabolisme augmentait la production d'espèces réactives par l'activité accrue des mitochondries (Alonso-Álvarez *et al.*, 2007; Nussey *et al.*, 2009; Réale *et al.*, 2010). Cependant, bien que la relation entre la dépense énergétique et le stress oxydatif puisse être directe à très fine échelle temporelle, elle semble se complexifier à plus long terme (Costantini *et al.*, 2013; Larcombe *et al.*, 2010; McInerney *et al.*, 2017; Speakman et Garratt, 2014). En effet, comme décrit précédemment, plusieurs mécanismes physiologiques peuvent limiter la production des espèces réactives et l'accumulation de dommages (Powers et Jackson, 2008; Speakman et Garratt, 2014). C'est le cas des défenses antioxydantes et des protéines de découplage dont l'expression constitutive peut augmenter en réponse à un entraînement physique répété ou à une hausse du métabolisme basal, limitant ainsi les effets oxydants d'une forte dépense énergétique (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008; Larcombe *et al.*, 2010; Speakman et Garratt, 2014). En effet, certaines études rapportent des effets bénéfiques d'un métabolisme élevé, comme une longévité accrue (Speakman *et al.*, 2004) ou une diminution du stress oxydatif (Salin *et al.*, 2015). Certaines adaptations comportementales, comme le maintien d'une cadence modérée (Monaghan *et al.*, 2009; Selman *et al.*, 2002; Vaanholt *et al.*, 2008) ou la réduction de la dépense énergétique lors d'une autre activité (Deenberg *et al.*, 1998), auraient aussi le potentiel de diminuer les coûts oxydatifs d'une dépense énergétique. Néanmoins, de telles adaptations physiologiques et comportementales pourraient ne pas permettre de prévenir le stress

oxydatif lors de périodes particulièrement exigeantes énergétiquement et physiologiquement (Costantini, 2014; Monaghan *et al.*, 2009).

Croissance et reproduction

Il a été récemment suggéré que la génération d'espèces réactives serait davantage corrélée à la synthèse de tissus, plutôt qu'au métabolisme (Amunugama *et al.*, 2016). Ainsi, une période physiologiquement exigeante comme la croissance (Jørgensen, 1988; Vézina *et al.*, 2009) est susceptible de générer des dommages oxydatifs et d'épuiser la protection antioxydante. Cette relation a d'ailleurs été rapportée plusieurs fois en milieu naturel (Alonso-Álvarez *et al.*, 2007; De Block et Stoks, 2008; Hermes-Lima *et al.*, 2012; Nussey *et al.*, 2009). De plus, l'altération expérimentale du profil oxydatif en faveur des espèces réactives semble réduire le taux de croissance, tandis que les individus présentant une croissance plus rapide ont généralement plus de dommages oxydatifs (Smith *et al.*, 2016). Cela suggère la présence d'un compromis d'allocation des ressources entre la croissance et la maintenance somatique (Smith *et al.*, 2016). Cette hypothèse est supportée par plusieurs observations d'une augmentation du taux de croissance lors d'une supplémentation en antioxydants alimentaires (Cucco *et al.*, 2006; de Ayala *et al.*, 2006; Matrková et Remeš, 2014). L'allocation des antioxydants par les juvéniles a été peu documentée, toutefois leur disponibilité semble favoriser un taux de croissance plus rapide plutôt qu'une réduction des dommages oxydatifs. En effet, chez le Goéland leucopnée (*Larus michahellis*) et le Carouge à épauettes (*Agelaius phoeniceus*), une supplémentation en antioxydants a entraîné une augmentation du taux de croissance sans modifier les niveaux de dommages oxydatifs (Parolini *et al.*, 2018), excepté pour une diminution chez les oisillons éclos plus tard dans la couvée (Hall *et al.*, 2010). De plus, chez des Bar communs (*Dicentrarchus labrax*) juvéniles expérimentalement soumis à une croissance compensatoire, une supplémentation en antioxydants a entraîné une augmentation du taux de croissance, ainsi qu'une augmentation des dommages oxydatifs en parallèle (Costantini *et al.*, 2018). Ces résultats appuient l'hypothèse selon laquelle le taux de croissance serait limité par le stress oxydatif, mais suggèrent également que, dans certains contextes, un

meilleur gain d'aptitude phénotypique peut être atteint avec l'investissement dans d'autres traits plutôt que dans sa régulation. En effet, la probabilité de survie à court terme des juvéniles peut être fortement influencée par leur masse (Ronget *et al.*, 2018), tandis que les effets délétères de l'accumulation de dommages oxydatifs pourraient ne se manifester qu'à plus long terme (Costantini, 2014; Finkel et Holbrook, 2000). Plus d'études expérimentales et corrélationnelles seront toutefois nécessaires afin de détailler clairement les effets de l'investissement dans la régulation du stress oxydatif sur le succès reproducteur (Speakman *et al.*, 2015).

Outre la croissance, la reproduction représente également une période physiologiquement exigeante (Hammond, 1997) susceptible de générer des dommages oxydatifs (Blount *et al.*, 2016). Toutefois, la relation entre reproduction et stress oxydatif semble complexe (Alonso-Álvarez *et al.*, 2016; Speakman et Garratt, 2014), puisque certaines études ont observé un effet nul ou même potentiellement bénéfique de la reproduction sur les profils oxydatifs (Costantini *et al.*, 2014; Ołdakowski *et al.*, 2015; Zhao *et al.*, 2015). Plusieurs hypothèses ont été récemment émises pour expliquer cette hétérogénéité dans les résultats empiriques, bien que peu de données empiriques soient disponibles pour les appuyer (Alonso-Álvarez *et al.*, 2016). Premièrement, les femelles pourraient moduler certains aspects de la reproduction, par exemple la masse à la naissance des juvéniles (Aloise King *et al.*, 2013) ou la date de reproduction (Costantini *et al.*, 2016), afin de minimiser les répercussions sur la balance oxydative. Deuxièmement, les dommages oxydatifs générés durant la reproduction pourraient stimuler une réponse hormétique améliorant la résistance à ce stress lors de reproductions subséquentes (Alonso-Álvarez *et al.*, 2016; Costantini, 2014; Romero-Haro *et al.*, 2016). Troisièmement, l'observation d'une baisse du stress oxydatif chez les individus prêts à se reproduire, mais n'ayant pas eu l'occasion de le faire, suggère que l'entrée en reproduction s'accompagne de changements physiologiques axés vers la protection du profil oxydatif (Blount *et al.*, 2016). Néanmoins, le stress oxydatif augmente généralement avec l'effort reproducteur (Bergeron *et al.*, 2011a; Blount *et al.*, 2016; García-de Blas *et al.*, 2016) et semble avoir le potentiel de le contraindre, du moins

dans certains systèmes d'étude (Carbeck *et al.*, 2018; Costantini *et al.*, 2016; Montoya *et al.*, 2016; Stier *et al.*, 2012).

Quête alimentaire et hétérogénéité environnementale

Plusieurs facteurs environnementaux semblent aussi influencer les profils oxydatifs (Fletcher *et al.*, 2013; Stier *et al.*, 2014), ce qui a amené plusieurs auteurs à soupçonner un rôle de l'hétérogénéité environnementale dans la variation intraspécifique des profils oxydatifs (Costantini, 2014; Pamplona et Costantini, 2011). Bien que peu d'informations permettent de dire si les antioxydants diététiques sont limitants en milieu naturel (Isaksson *et al.*, 2011), des apports différentiels en antioxydants alimentaires pourraient expliquer un tel effet de l'environnement. En effet, un apport élevé en antioxydants semble réduire le coût oxydatif de différents processus physiologiques, comme la croissance (Giordano *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2010; Parolini *et al.*, 2018) et la reproduction (Costantini *et al.*, 2016; Fletcher *et al.*, 2013), possiblement par une diminution de la nécessité d'investir dans l'expression de défenses antioxydantes endogènes potentiellement coûteuses (Costantini, 2014; Ruuskanen *et al.*, 2017; Selman *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2006). Dans cette optique, il a été montré que les sources principales de nourriture ainsi que des fluctuations temporelles dans les sources d'alimentation pouvaient influencer les taux sanguins de certains antioxydants (Cohen *et al.*, 2009).

Outre l'apport en antioxydants diététique, la disponibilité de nourriture pourrait également influencer le profil oxydatif par d'autres mécanismes (Costantini *et al.*, 2018; Feoli *et al.*, 2006; Fletcher *et al.*, 2013). D'une part, un apport élevé en nourriture pourrait faciliter la production simultanée d'enzymes antioxydantes et des autres protéines, qui autrement pourraient être en compétition pour les mêmes macronutriments (Lee *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Les types de macronutriments consommés pourraient également influencer la composition de la cellule et ainsi sa susceptibilité aux dommages oxydatifs (Alan et McWilliams, 2013; Hulbert *et al.*, 2007; Pamplona et Barja, 2007). D'autre part, l'effort

physique accru associé à la recherche de nourriture dans les environnements pauvres ou dans des périodes de faible abondance peut augmenter fortement la dépense énergétique associée à la quête alimentaire et pourrait potentiellement augmenter la génération d'espèces réactives (van de Crommenacker *et al.*, 2011; Wiersma *et al.*, 2005). Il a ainsi été montré que la disponibilité de nourriture pouvait contraindre l'expression de traits comme la croissance ou l'effort reproducteur, possiblement en partie à cause de la nécessité de réguler le profil oxydatif (Costantini *et al.*, 2016; Giordano *et al.*, 2015; Hoy *et al.*, 2016; Messina *et al.*, 2017; Ruuskanen *et al.*, 2017). L'hétérogénéité spatiale dans d'autres facteurs, comme le risque de prédation (Thomson *et al.*, 2010) ou la prévalence parasitaire (Arriero *et al.*, 2008) peuvent aussi induire un stress physiologique variable chez les individus, ce qui pourrait entraîner une augmentation des dommages oxydatifs (Costantini, 2008; Pamplona et Costantini, 2011).

Parasitisme et réponse immunitaire

En ce qui concerne les infections parasitaires, elles peuvent causer du stress oxydatif par le biais de la réponse immunitaire (Costantini et Møller, 2009; Hasselquist et Nilsson, 2012). En effet, les cellules immunitaires activées produisent des espèces réactives qui endommagent les pathogènes (Sorci et Faivre, 2009; Swindle et Metcalfe, 2007), incluant les parasites macroscopiques (Lello et de Rosis, 2003). Cependant, les espèces réactives n'ont aucune spécificité et affectent aussi les cellules de l'hôte (Sorci et Faivre, 2009). Une augmentation compensatoire des défenses antioxydantes de l'hôte peut être observée en parallèle, mais elle n'est pas toujours suffisante pour prévenir l'augmentation des dommages oxydatifs (Mougeot *et al.*, 2009). L'hypothèse du coût oxydatif de la réponse immune est supportée par le fait que le profil oxydatif semble contraindre l'ampleur de la réponse immunitaire de l'hôte suite à une infection (Cram *et al.*, 2015; Tobler *et al.*, 2011).

L'infection parasitaire présente également un coût énergétique. En effet, en plus du coût énergétique de l'activation de la réponse immunitaire, pouvant représenter environ 5 à 15% du métabolisme basal (Halliwell, 2006; Hasselquist et Nilsson, 2012), l'hôte doit compenser pour les besoins énergétiques du parasite (Costantini, 2014). La relation entre la dépense énergétique et le stress oxydatif n'est pas directe, toutefois ce besoin énergétique accru pourrait augmenter la production d'espèces réactives ou contraindre l'investissement de ressources dans les mécanismes de protection. Des dommages oxydatifs pourraient en résulter, surtout si les défenses antioxydantes sont déjà saturées par les espèces réactives issues des cellules immunitaires (Costantini *et al.*, 2014). Les infections immunitaires semblent donc avoir le potentiel de causer indirectement du stress oxydatif chez l'hôte par le biais de deux différents mécanismes.

Plasticité

Étant médiée par de nombreuses voies métaboliques modulables au niveau génique (Halliwell et Gutteridge, 2015), la régulation du stress oxydatif a le potentiel de fluctuer fortement à très fine échelle temporelle en fonction des contextes physiologiques et environnementaux (Costantini, 2014). Par exemple, la réponse au stress hormonal pourrait induire la relocalisation d'antioxydants en seulement quelques minutes (Costantini *et al.*, 2012a), la torpeur peut induire l'expression d'enzymes antioxydantes en quelques heures (Buzadžić *et al.*, 1997) et l'immunostimulation peut causer une augmentation des dommages oxydatifs en moins de 24 heures (Costantini et Dell'Omo, 2006a). Des variations ont également été observées à l'échelle intra (revues dans Chainy *et al.*, 2016) et interannuelle (Christensen *et al.*, 2015). Bien qu'il soit présentement difficile de départager les composantes génétiques et environnementales derrière cette variation, l'ensemble des études ayant estimé l'héritabilité de différents paramètres du stress oxydatif suggère qu'elle serait faible à modérée, bien qu'extrêmement variable (nulle à environ 0.7 selon les marqueurs, Costantini et Dell'Omo, 2006b; Kahar *et al.*, 2016; López-Arrabé *et al.*, 2016; Losdat *et al.*, 2014; Norte *et al.*, 2009; Olsson *et al.*, 2008; Sin-Yeon *et al.*, 2010, 2011). Ce faisant, la variabilité observée serait principalement induite par des changements

dans les contextes écologiques, physiologiques et environnementaux. Les réponses à différents facteurs peuvent cependant varier selon l'espèce, possiblement parce que celles-ci auraient développé différentes stratégies de régulation du stress oxydatif au cours de leur histoire évolutive (Berglund *et al.*, 2014; Cohen *et al.*, 2009; Gorbi *et al.*, 2005). Il est donc pour l'instant difficile d'identifier des patrons généraux, d'autant plus que peu d'études ont réalisé un suivi temporel de la régulation du stress oxydatif en milieu naturel (Chainy *et al.*, 2016). Néanmoins, les résultats disponibles semblent suggérer que les périodes physiologiquement exigeantes ainsi que les périodes de faible abondance de nourriture peuvent causer des fluctuations temporelles dans la régulation du stress oxydatif chez plusieurs espèces. Par exemple, la production d'espèces réactives et des enzymes antioxydantes peut augmenter de manière tissu-dépendante avec les fluctuations saisonnières en température chez les hétérothermes (Hermes-Lima *et al.*, 2012; Samanta et Paital, 2016) et avec la thermogénèse chez les homéothermes (Vucetic *et al.*, 2013). De plus, l'entrée en torpeur semble stimuler l'expression des défenses antioxydantes endogènes en comparaison avec la période active, possiblement pour prévenir une hausse de dommages oxydatifs lors de la réoxygénation et de la réactivation du métabolisme (Blagojevic *et al.*, 2011; Buzadžić *et al.*, 1990). Chez l'hirondelle rustique (*Hirundo rustica*), une hausse de l'expression des défenses antioxydantes endogènes avant la migration suggère une capacité d'anticipation du défi métabolique et oxydatif qu'elle représente (Raja-aho *et al.*, 2012). Chez une espèce d'écrevisses (*Parastacus brasiliensis promatensis*), un pic annuel de dommages oxydatifs a été observé au printemps, ce qui coïncide avec la période de reproduction (Pinheiro et Oliveira, 2016). De plus, des variations temporelles dans l'abondance et la disponibilité de types de nourriture peuvent modifier les apports en antioxydants diététiques et résulter en des niveaux des dommages oxydatifs et d'antioxydants variables (Bilham *et al.*, 2018; Cohen *et al.*, 2009; van de Crommenacker *et al.*, 2011).

Dans un autre ordre d'idées, les conditions environnementales en début de vie pourraient influencer la régulation du stress oxydatif à l'âge adulte, possiblement par un mécanisme hormétique (Costantini *et al.*, 2010b). En effet, l'hormèse de conditionnement avance que,

dans certains contextes, une exposition à des niveaux modérés d'agent stressant pourrait favoriser l'expression de mécanismes de protection résultant en une résistance accrue lors d'une exposition ultérieure (Calabrese *et al.*, 2007; Costantini *et al.*, 2010a). Ce principe a été brièvement abordé précédemment par le biais de l'entraînement physique qui peut entraîner une expression accrue des défenses antioxydantes (Gomez-Cabrera *et al.*, 2008). Par exemple, des réponses hormétiques de la résistance au stress oxydatif ont déjà été observées suite à l'exposition à des conditions anoxiques ou un stress thermique (Costantini *et al.*, 2012a; López-Martínez et Hahn, 2012). Ce faisant, dans certains contextes, des conditions stressantes durant le développement comme une réduction dans la disponibilité de nourriture pourraient avoir un effet positif sur la survie à l'âge adulte (Marasco *et al.*, 2015; Marshall *et al.*, 2017), possiblement en partie à cause d'une résistance accrue au stress oxydatif (Costantini, 2014). Les études hormétiques en milieu naturel sont rares, toutefois l'abondance de nourriture durant le développement semble favoriser la résistance aux dommages oxydatifs chez les oiseaux, à l'âge adulte (Noguera *et al.*, 2011; Romero-Haro *et al.*, 2016). Par contre, une inhibition d'un antioxydant endogène durant le développement semble favoriser l'expression d'un signal sexuel ainsi qu'une plus grande taille corporelle, des traits pouvant être reliés au succès reproducteur à court terme (Romero-Haro et Alonso-Álvarez, 2015). Plus d'études seront requises pour détailler les possibles effets hormétiques des conditions de développement sur la résistance au stress oxydatif. Néanmoins, ces travaux, jumelés avec ceux portant sur la plasticité, semblent indiquer un fort potentiel d'expression de différences interindividuelles et temporelles dans sa régulation.

1.4 Objectifs

Ce projet de maîtrise vise à identifier les principaux facteurs individuels et environnementaux responsables des variations intra et interindividuelles dans les profils oxydatifs du *Tamias rayé* (*Tamias striatus*) au cours de l'été. Plus spécifiquement, mes objectifs sont de 1) évaluer la stabilité temporelle et spatiale de biomarqueurs du stress oxydatif dans la population à l'étude; 2) Identifier les déterminants individuels et environnementaux responsables de la fluctuation de ces biomarqueurs au cours de l'été au niveau populationnel; et 3) de vérifier l'homogénéité des normes de réactions intra-individuelles au cours de l'été. De ce projet est née une collaboration visant à développer des biomarqueurs du stress oxydatif optimisés pour des petits volumes sanguins (Langille *et al.*, 2018). Brièvement, les objectifs de cette collaboration étaient de 1) développer une méthodologie interne pour l'analyse des biomarqueurs; 2) évaluer la répétabilité méthodologique des tests développés; et 3) étudier les corrélations entre les marqueurs utilisés au sein d'un même échantillon.

Globalement, les résultats obtenus permettront de pallier au manque actuel de connaissances sur les moyens par lesquels des fluctuations dans les contextes écologiques, physiologiques et environnementaux peuvent influencer la régulation du stress oxydatif en milieu naturel. Ce projet contribuera donc à situer le rôle et l'importance du stress oxydatif dans la manière par laquelle les compromis physiologiques peuvent médier l'expression des traits d'histoire de vie. Ainsi, il constituera une base solide sur laquelle les études futures pourront s'appuyer afin de cibler son potentiel évolutif ou comprendre les impacts de variations dans sa régulation sur l'aptitude phénotypique.

1.5 Espèce modèle : le *Tamia rayé*

Description générale

Le *Tamia rayé* est un sciuridé granivore vivant dans les forêts de feuillus de la côte Est américaine (Snyder, 1982). Sa masse adulte varie entre un peu moins de 80 grammes à plus de 125 grammes et son espérance de vie est d'en moyenne 1,3 ans, bien qu'elle puisse atteindre 8 ans (Snyder, 1982). Son aire de répartition s'étend de la côte Nord du Québec jusqu'à la Louisiane et de la côte Est américaine jusqu'au lac Manitoba (Snyder, 1982). Dans la région étudiée, se situant au sud du Québec à proximité de la municipalité de Mansonville (canton de Potton), son alimentation se compose principalement de fânes de hêtres à grandes feuilles (*Fagus grandifolia*), de samares d'érables à sucre (*Acer saccharum*) et d'érables rouges (*Acer rubrum*), de tubes de Claytonie de Caroline (*Claytonia caroliniana*) et de bulbes d'Érythrone d'Amérique (*Erythronium americanum*) (Landry-Cuerrier *et al.*, 2008). Il transporte les graines dans ses bajoues et les entrepose dans son terrier afin de se constituer une réserve pour l'hiver (Elliott, 1978). Toutefois, le tamia est opportuniste et peut aussi se nourrir de fruits (cerises, fraises) d'invertébrés (escargots, limaces, chenilles) et de champignons lors de périodes de faible abondance de nourriture (Careau *et al.*, 2013; Elliott, 1978; Humphries *et al.*, 2002). La superficie du domaine vital du tamia varie en moyenne entre 0,2 et 0,4 hectare (Elliott, 1978; Snyder, 1982), bien que des zones éloignées particulièrement abondantes en nourriture peuvent être exploitées (Landry-Cuerrier *et al.*, 2008; Snyder, 1982). Vers le milieu de l'été, une baisse notable de l'activité est souvent observée, représentant possiblement une attente entre l'épuisement de la nourriture estivale et la paisson automnale (Elliott, 1978; LaZerte et Kramer, 2016). Ainsi, à moins d'une faible production de fânes (Munro *et al.*, 2008), l'activité reprend généralement en septembre (Elliott, 1978; LaZerte et Kramer, 2016).

Dynamique de paisson

La dynamique des populations de tamias est fortement influencée par la variabilité interannuelle dans la production de fânes des hêtres à grandes feuilles et des érables (Bergeron *et al.*, 2011b). La dynamique de paisson (*'mast'*) semble induite par des facteurs climatiques (Cleavitt et Fahey, 2017) et est relativement cyclique dans l'aire d'étude, se produisant en moyenne aux deux ans (Bergeron *et al.*, 2011b). Les tamias semblent être en mesure d'anticiper la productivité annuelle des hêtres et ajustent leur effort reproducteur en conséquence. Lors d'une année de paisson, les tamias se reproduisent en juin, ce qui synchronise l'émergence des juvéniles avec le pic d'abondance de fânes de hêtres au sol en septembre. Ils se reproduisent aussi au printemps suivant, puisque la nourriture est encore abondante (Bergeron *et al.*, 2011b). Par contre, durant les années peu productives, ils peuvent suspendre leur activité hors du terrier pour une période allant jusqu'à 9 ou 11 mois (Munro *et al.*, 2008), sans reproduction (Bergeron *et al.*, 2011b). Une telle variation interannuelle, autant dans l'abondance de nourriture que dans les opportunités de reproduction, semble favoriser le maintien d'une forte variabilité dans différents traits physiologiques (Careau *et al.*, 2013; Dammhahn *et al.*, 2017) et comportementaux (Bergeron *et al.*, 2013; Montiglio *et al.*, 2014; St-Hilaire *et al.*, 2017).

Reproduction

Le tamia rayé a un système de promiscuité sexuelle, ce qui peut engendrer des paternités multiples au sein d'une même portée (Bergeron, *et al.*, 2011c; Elliott, 1978). La reproduction est physiologiquement exigeante, étant associée à des changements comportementaux (Elliott, 1978), à une augmentation de la dépense énergétique journalière (Bergeron *et al.*, 2011a) et à une hausse du métabolisme au repos (Careau *et al.*, 2012b). Une taille de portée accrue semble aussi générer un stress oxydatif plus important chez les femelles, bien que la taille de l'effet soit relativement faible (Bergeron *et al.*, 2011a).

Parasitisme

Les tamias rayés peuvent être infectés par des larves de mouches cutérébrides (Catts, 1982), de juillet ou août à octobre (McKinney et Christian, 1970; Snyder, 1982). Les larves croissent durant 4 à 10 semaines avant de sortir de l'hôte pour se métamorphoser au sol (Catts, 1982). Ces infections parasitaires ont des impacts sur sa physiologie, augmentant le métabolisme basal (RMR) des juvéniles de 7,6% (Careau *et al.*, 2010) lors des années de paison. Un tel effet semble également présent chez les adultes, bien qu'il n'ait été détecté que dans les années de faible productivité (Careau *et al.*, 2012a). Une infection cause aussi une baisse du taux métabolique maximal (VO_2 max) de 22% (Careau *et al.*, 2012a), ce qui pourrait augmenter les impacts physiologiques d'activités physiquement ou physiologiquement exigeantes.

Torpeur

Les tamias expriment des patrons de torpeur à partir d'octobre jusqu'au printemps afin de diminuer leur dépense énergétique durant l'hiver (Snyder, 1982). Ces derniers ne font pas de réserve de graisse et dépendent presque exclusivement de la taille de leur réserve de nourriture pour leur survie (Humphries *et al.*, 2002; Landry-Cuerrier *et al.*, 2008; Munro *et al.*, 2005). Cette dernière semble influencer fortement les patrons de torpeur, bien que leur durée et leur profondeur soient répétables au sein d'un individu (Dammhahn *et al.*, 2017). En effet, ceux-ci semblent plus prononcés lorsque la taille de la réserve de nourriture est réduite (Landry-Cuerrier *et al.*, 2008). Ils le sont également lorsque la composition de la réserve de nourriture lipidique est plus riche en acides gras polyinsaturés, possiblement pour prévenir les dommages oxydatifs (Munro *et al.*, 2005). En effet, les acides gras insaturés sont plus facilement oxydés (Hulbert *et al.*, 2007). Les mâles cessent la torpeur avant les femelles et passent quelques jours en normothermie avant l'émergence, possiblement pour permettre la recrudescence des testicules et permettre une capacité reproductive maximale à l'été subséquent (Munro *et al.*, 2005).

1.6 Hypothèses et prédictions

Je m'attends à ce que les niveaux de marqueurs du profil oxydatif utilisés varient dans le temps au niveau populationnel, selon les fluctuations dans la dynamique de compromis d'allocation des ressources chez le tamia. Ainsi, l'expression de traits exigeants aux niveaux physiologique et énergétique, comme le gain de masse à la sortie de la torpeur, la lactation ou l'activation de la réponse immunitaire devraient détourner les ressources allouées à la régulation du stress oxydatif, résultant en un épuisement de la défense antioxydante et une augmentation des niveaux de dommages. Cet effet pourrait être amplifié par une forte dépense énergétique en raison du lien indirect entre le métabolisme et la production des espèces réactives (Halliwell et Gutteridge, 2015). La dynamique de compromis devrait également être influencée par des fluctuations temporelles dans l'abondance de nourriture qui peuvent être prononcées dans l'environnement du tamia en raison des *mast* (Bergeron *et al.*, 2011b). Par exemple, une période de faible abondance de nourriture devrait résulter en un apport réduit d'antioxydants diététiques. De plus, une faible disponibilité de ressources alimentaires pourrait contraindre l'investissement simultané entre l'expression de mécanismes de régulation du stress oxydatif et l'ensemble des autres traits, entraînant une diminution des niveaux d'antioxydants et une hausse des dommages.

Au niveau individuel, de la plasticité dans la régulation du stress oxydatif pourrait rendre possible l'observation de différences dans les normes de réaction au cours de l'été pour chacun des marqueurs. De telles variations pourraient refléter des différences dans les stratégies d'allocation entre les individus ou dans la capacité d'acquisition des ressources.

CHAPITRE 2

SPATIO-TEMPORAL VARIATIONS OF OXIDATIVE STRESS REGULATION IN A SMALL MAMMAL

Auteurs : Vincent Lemieux, Patrick Bergeron, Denis Réale et Dany Garant

L'information sur la stabilité de la régulation du stress oxydatif est limitée en milieu naturel et doit être approfondie afin de cibler les implications de ce mécanisme physiologique dans les processus écoévolutifs. Dans cette étude, nous avons fait un suivi temporel des profils oxydatifs à l'aide d'échantillonnages répétés au cours de la période active d'une population naturelle de tamias rayés (*Tamias striatus*). Les objectifs principaux de cet article étaient d'identifier les déterminants individuels et environnementaux responsables de variations dans les niveaux de dommages oxydatifs et de protection antioxydante.

Pour cet article, mes principales contributions comprenaient la collecte de données, les analyses physiologiques en laboratoire, les analyses statistiques ainsi que la rédaction d'une première version. Dany Garant et Patrick Bergeron ont supervisé l'ensemble du projet et ont contribué à la version finale. Denis Réale a apporté des commentaires et suggestions lors des versions antérieures. Ce manuscrit sera soumis à *Functional Ecology* à des fins de publication.

2.1 Summary

1. Life-history allocation trade-offs dynamic can change over time and space according to the ecological and demographical context. Fluctuations in food availability can affect physiological trade-offs like oxidative stress regulation, reflecting the balance between oxidative damages and antioxidant capacity.
2. Oxidative stress costs on fitness were previously reported but few studies monitored its spatio-temporal stability in natural settings, which would allow understanding its importance in ecological and evolutionary processes.
3. Here, we monitored individual oxidative profiles in a wild eastern chipmunk (*Tamias striatus*) population across the summer active period and over three study sites. Oxidative damages (MDA: Malondialdehyde levels) and non-enzymatic antioxidant levels (FRAP: Ferric reducing antioxidant power and HASC: Hypochlorous acid shock capacity) were quantified across time and space using assays optimized for small blood volumes.
4. Our results showed a temporal increase in oxidative damages mirrored by a decrease in FRAP throughout the season. We also found different antioxidant levels among our three study sites for both markers. Our results also revealed effects of sex and body mass on oxidative profiles. Early in the active season, females and chipmunks with a greater body mass had higher oxidative damages. Males had higher HASC levels than females throughout the summer.
5. This study shows that oxidative stress regulation is a dynamic process that requires a detailed spatial and temporal monitoring to yield a complete picture of possible trade-offs between oxidative damages and antioxidant capacity.

Keywords: Allocation trade-offs, Antioxidants, Food availability, Oxidative damages, Seasonal fluctuations, Rodents.

2.2 Introduction

Most resources are limited in natural environments, which makes it difficult for living organisms to invest maximally in every adaptive trait. Different resources allocation trade-offs among traits and their relationship with fitness are thus a central theme in life-history evolutionary theories (Stearns, 1992; van Noordwijk and de Jong, 1986). At the core of this trade-off dynamic is the potential for an individual to differentially acquire and allocate energy to self-maintenance and reproduction (van Noordwijk and de Jong, 1986; Zera and Harshman, 2001). Recently, studies in eco-physiology highlighted that such trade-offs can occur at the physiological level, regarding for example oxidative stress regulation (Birnie-Gauvin *et al.*, 2017; Costantini, 2014; Monaghan and Costantini, 2014). The expression of energetically demanding physiological processes and traits can lead to increased aerobic energetic metabolism, which generates reactive species as by-products. Although required for vital cell functions (reviewed in Alfadda and Sallam, 2012; Ayala, Muñoz, and Argüelles, 2014), reactive species can cause oxidative damages by altering various cellular components such as DNA, proteins and lipids (Costantini, 2014; Halliwell and Gutteridge, 2015). A prolonged imbalance between reactive species production and cellular defense mechanisms in favour of the former could impact long term fitness by reducing survival through accelerated ageing (Finkel and Holbrook, 2000). Oxidative costs of trait expression can be mitigated through various mechanisms, such as increased food intake, reduced reproductive output or increased protein uncoupling (Aloise King *et al.*, 2013; Salin *et al.*, 2015; Stier *et al.*, 2012). However, several studies showed that physiologically demanding periods may nevertheless induce elevated oxidative damages (Blount *et al.*, 2016; Costantini and Møller, 2009; Smith *et al.*, 2016), which can in turn constraint and shape life history trait expression (Cram *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2016; Stier *et al.*, 2012).

Oxidative damage prevention is mostly mediated by a wide array of exogenous (e.g. vitamins) and endogenous (e.g. enzymes) antioxidant molecules that neutralize reactive species before they can oxidize cellular components (Halliwell and Gutteridge, 2015). While exogenous antioxidant are generally acquired through diet (Pamplona and

Costantini, 2011), endogenous antioxidant are synthesised by the cellular machinery according to the cell's oxidative status (Halliwell and Gutteridge, 2015). Their synthesis could however present costs, possibly requiring energy (Costantini, 2014; Pamplona and Costantini, 2011) and leading to a decreased availability of macronutrients for other proteins synthesis (Lee *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). As such, higher antioxidant availability can favor expression of potentially costly life history traits that could otherwise be constrained by oxidative stress levels (Catoni *et al.*, 2008), such as growth rates (de Ayala *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2010; Parolini *et al.*, 2018), breeding behaviour (Carbeck *et al.*, 2018; Messina *et al.*, 2017) and reproductive output (Costantini *et al.*, 2016). Thus, antioxidant protection could also be subjected to allocation trade-offs, representing another mechanism by which oxidative stress can impact trait expression (Costantini, 2014).

Temporal shifts in trait expression, such as seasonal reproduction events or activation of the immune response can divert resources from traits related to fitness including oxidative stress regulation (Costantini and Møller, 2009; Smith *et al.*, 2016). Environment quality can also vary in both temporal and spatial scales, and higher food availability generally allows elevated simultaneous investment in competing traits (Zera and Harshman, 2001). Inversely, lower food availability can constraint the resource flow (Hentschel, 1999) and even shift allocation rates toward immediate survival (Ballinger, 1977). As such, oxidative stress levels have been shown to decrease with food availability at both spatial and temporal scales, most likely due to shifts in allocation rates (Costantini *et al.*, 2018, 2009; Fletcher *et al.*, 2013; van de Crommenacker *et al.*, 2011). Moreover, although the relative contribution of dietary antioxidants to the overall antioxidant potential is for the most part unknown (Beaulieu and Schaefer, 2013; Catoni *et al.*, 2008; Costantini and Møller, 2008; Smith *et al.*, 2016), the expression of oxidative stress regulation mechanisms could vary according to changes in feeding sources within a year (Catoni *et al.*, 2008; Cohen *et al.*, 2009). Changes in environmental quality combined with temporal shifts in physiological demand are therefore likely to have repercussions on oxidative stress levels and its regulation mechanisms like antioxidant protection (Costantini, 2014), as they do for energy allocation (Hoy *et al.*, 2016; Perrin and Sibly, 1993).

Despite being increasingly studied, little is known about the factors responsible for oxidative stress variation in natural environments (Beaulieu and Costantini, 2014; Chainy *et al.*, 2016). Quantitative genetic studies showed that oxidative stress markers are heritable, but have a high environmental variance, probably because oxidative stress regulation is tightly linked to the ecological and physiological context of living species (Kahar *et al.*, 2016; Losdat *et al.*, 2014; Norte *et al.*, 2009). Indeed, several physiological adaptations have evolved to allow organisms to express life-history traits while coping with fluctuations in environment quality. In small mammals for example, torpor is a typical response to periods of poor resource availability, which allow organisms to lower their body temperature for several days and minimize energy expenditure (Humphries *et al.*, 2003). However, torpor induces many morphological and physiological changes, including weight loss (Levesque and Tattersall, 2010; Michener, 1998) and tissue atrophy (Wickler *et al.*, 1991). Fluctuations in oxygen levels during arousal cycles can also cause oxidative stress, which can be countered by increased endogenous antioxidant levels (Niu *et al.* 2018; Okamoto *et al.* 2006; Orr *et al.* 2009; Vucetic *et al.* 2013, but see Page *et al.* 2009). At torpor emergence, organisms must restore their depleted body tissues and reserves and, in some cases, initiate reproduction (Michener, 1998; Siutz *et al.*, 2016), at which time they could rely mostly on environmental dietary antioxidant to regulate oxidative stress. Yet, such physiological trade-offs between trait expression and oxidative stress regulation have rarely been monitored in natural settings.

Here we monitored the oxidative profiles of an eastern chipmunk (*Tamias striatus*) population throughout their active season in 2017. We repeatedly sampled marked individuals after the emergence from torpor, in the middle of summer and during lactation, to assess the variations in oxidative stress components on three study sites. We simultaneously assayed total antioxidant capacity and oxidative damages, allowing us to monitor fluctuations in antioxidant protection and the overall impact on tissue degradation, providing a more complete understanding of the oxidative stress regulation (Costantini and Verhulst, 2009). Eastern chipmunks are ground dwelling solitary rodents that hoard seeds from masting trees in their burrows (Snyder 1982). The large annual fluctuation in beech

seed production in the fall affects both above-ground activity and reproduction events in this species (Bergeron *et al.*, 2011b; Munro *et al.*, 2008). Chipmunks reproduce the summer preceding a beech masting event and the following spring to synchronize juvenile emergence with seed availability (Bergeron *et al.*, 2011b). Non-mast years are characterized by extreme suppression of above-ground activity (Munro *et al.*, 2008). On the Northern part of their distribution, chipmunks spend the winter in torpor and rely on food reserves, whose quality and size can affect torpor pattern duration and intensity (Landry-Cuerrier *et al.*, 2008; Munro *et al.*, 2005). Following life history theory, we predict that trade-offs between oxidative stress regulation and the expression of physiologically demanding traits can shift according to individual traits and environmental factors. For instance, tissue regeneration following torpor emergence could lead to an indirect increase in reactive species production, which should result in elevated oxidative damages and depleted antioxidant levels. Similarly, an increased energy expenditure during lactation late in the summer should favor oxidative stress through the same mechanism. This dynamic could be affected by changes in food availability, which should be linked to energy and dietary antioxidant acquisition. Therefore, increased food availability could increase the total amount of resources to distribute between competing traits, including oxidative stress regulation, and an increased dietary antioxidant intake should allow to reduce the synthesis of potentially costly endogenous antioxidants.

2.3 Materials and methods

Study site and data collection

This study took place in 2017 and is part of a long-term monitoring of wild eastern chipmunks that started in 2005 in Southern Québec (Canada). While 2016 was a non-mast year, the field season in 2017 was characterized by a beech mast and thus chipmunks reproduced in the summer so that the juveniles benefited from the fall mast at the emergence from the maternal burrow. Therefore, the population consisted of adults at the

time of the study. Chipmunks were monitored at three sites (6.8 ha, 6.8 ha and 3.2 ha), where dominant seed producing trees species are the American beech (*Fagus grandifolia*), the sugar maple (*Acer saccharum*) and the red maple (*A. rubrum*). Although chipmunks mostly target seeds, they also feed on herbaceous bulbs such as trout lily (*Erythronium americanum*) and spring beauty (*Claytonia caroliniana*). They also have been observed to eat fruits (black cherries, strawberries), invertebrates (snails, slugs, caterpillars) and mushrooms during periods of low food abundance (Careau *et al.*, 2013; Elliott, 1978; Humphries *et al.*, 2002).

Individuals were monitored through mark and recapture using Longworth traps (Longworth Scientific Instruments, Abingdon, UK). Sites were systematically trapped once a week from May to August, from 0800 to dusk and traps were checked every 2 h. Every individual was sexed at the first capture and marked with a unique alphanumeric ear tag. Body mass and parasite count were assessed at each capture. The minimal known age of every new individual was determined following Careau *et al.* (2010); new adults were considered to be 1 year old at the year of first capture.

Blood collection

We collected blood for oxidative stress analyses during three sampling periods, at the end of May (spring), June (summer) and August (late summer) 2017. Sampling periods lasted from 8 to 14 days and the three sites were trapped systematically to get a blood sample of every active individual. Following Bergeron *et al.* (2011a), the blood was collected in up to four 70 μ L heparinized glass capillary tubes after clipping a toenail. Blood capillaries were kept at 4°C right after collection for no longer than 6 hours. Then, they were centrifuged at 14 800g for 6 minutes and plasma was stored at -15°C before being transferred to -80°C, within 6 days. This procedure was used for all three sampling periods. Samples were assayed 4 to 7 months after the first blood sampling period. Animals were captured and handled in compliance with the Canadian Council on Animal Care (#A2016-

01 - Bishop's University) and the Ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec (#2017-05- 01-102-05-S-F). We collected 204 plasma samples on 96 individuals. Sample sizes for each period, sites, sex and age group are available in Table S1.

Oxidative stress markers measurements

Plasma oxidative damages and antioxidant levels were assayed following Langille *et al.*'s (2018) methods (see Annex 1), which are optimised for small blood volumes. We thus only provide a brief overview of these assays.

2.3.1.1 Oxidative damages

Oxidative damages were estimated with plasma total malondialdehyde (MDA, $\mu\text{mol L}^{-1}$), a widely used lipid peroxidation biomarker (Beaulieu and Costantini, 2014), which we assayed using a high-performance liquid chromatography (HPLC). We added 2.5 μL of butylated hydroxytoluene (0.1M) in anhydrous ethanol and 5 μL of NaOH (2.0 M) to a 20 μL aliquot of plasma or standard (1,1,3,3-tetraethoxypropane). After a 30 min incubation in a shaking dry block set at 60°C, 50 μL of aqueous trichloroacetic acid (15% V/V) was added. The samples were placed in an ice bath for 5 min, spun 10 min at 14000g and 4°C. To the supernatant, (50 μL) 25 μL of 2-thiobarbituric acid (0.375% w/v) in HCl (0.25M) was added, followed by a 60 min heating at 100°C for 60 min in a dry bath incubator. Samples were then cooled on ice and centrifuged 5 min at 14 000g and 4°C, before HPLC analysis. We assayed all blood samples in duplicate when the plasma volume was sufficient (n = 63 sampled once, and 89 sampled in duplicate). Samples already assayed in duplicate with leftover plasma (n = 30) were assayed a third time, allowing to account for both intra and inter assay variation.

2.3.1.2 Antioxidant protection

2.3.1.2.1 *The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay*

The FRAP assay assesses total non-enzymatic antioxidant power (Benzie and Strain, 1996). Ferric to ferrous ion reduction by the plasma at low pH allows the colored ferrous-tripyridyltriazine complex to form, which can be quantified by spectrophotometry using mM FeSO₄ equivalent (Benzie and Strain, 1996). This assay has been criticized for being highly sensitive to uric acid levels (Benzie and Strain, 1996; Cohen *et al.*, 2009; Costantini, 2011), so here we used a uric acid independent FRAP assay. A 5 µL aliquot of plasma or standard (FeSO₄, see Langille *et al.* (2018)) was mixed 1:1 with ultrapure water-containing uricase (1.00 U/mL) and incubated 5 min at room temperature on a 2D shaker. Then, 200µL of FRAP reagent was added and absorbance was read at 593nm using an iMark Filter absorbance microplate reader (Bio-Rad Laboratories (Canada) Ltd., Mississauga, ON) after a 30 min incubation with shaking at room temperature. We assayed 26 samples once, 120 in duplicates and 20 in triplicates.

2.3.1.2.2 *Hypochlorous acid shock capacity (HASC) assay*

The HASC assay is based upon the widely used Diacron International's OXY-adsorbent test™ kit. It yields the total non-enzymatic antioxidant power, through the amount of HOCl (mmol) required to fully oxidize a plasma sample. A 1 µL aliquot of plasma and 100 µL of oxidant solution (hypochlorous acid) were added to 100 µL of ultrapure water, followed by a 10 minutes incubation at room temperature on a 2D shaker. After that, 20 µL of N, N-dimethyl-p-phenylenediamine (83 µL in 50 mL anhydrous ethanol) was quickly added and absorbance was read at 515 nm after a 60 seconds incubation with shaking using the iMark Filter absorbance microplate reader. We assayed 21 blood samples once, 71 in duplicate and 13 in triplicates.

2.4 Statistical analyses

We calculated repeatability with the R package rptR and estimated the variance components and confidence intervals from a linear mixed-effects models with plasma sample identity fitted as a random factor (Nakagawa and Schielzeth, 2010). Confidence intervals (CI) and standard errors were calculated from parametric bootstraps and permutations that created the distributions of likelihood ratios (set at 1000 times each). Over the whole summer, we found a repeatability of 0.65 for MDA (95% CI: 0.55-0.73), 0.91 for FRAP (95% CI: 0.88-0.93) and 0.64 for HASC (95% CI: 0.52-0.74)

We ran linear mixed effects models to assess the influence of individual and environmental variables on each marker using the R package lme4 (Bates *et al.*, 2014). We used likelihood ratio tests (LRT) to compare increasing structure of complexity with assay number, chipmunk identity and blood sample identity nested in chipmunk identity fitted as random terms. The full fixed effects model included environmental variables (sampling period and site), individual variables (sex, mass, minimal known age and parasitic load) and methodological variables (time spent in the trap before blood collection, blood collection duration, haemolysis, sample storage time at 4°C and -15°C). Additionally, for MDA, time spent in the HPLC queue was also included. All biologically relevant second-order interactions between environmental and individual states fixed effects were included in the models.

We tested for within sample correlations between markers by averaging replicates into one mean value for each marker. We removed hemolyzed samples (30 for MDA (15% of samples), 29 for FRAP (16%) and 16 for HASC (16%)) because population level analyses showed non-biological effect of haemolysis on MDA and FRAP. We then ran a linear mixed effects model for each possible marker pair (i.e. MDA-FRAP, FRAP-HASC and HASC-MDA), in which the first marker of the pair was the response variable and the second a dependent variable. Significant fixed effects and second order interactions from

the populational determinant analysis of each marker present in the models were included as covariates.

All analyses were performed using the software R 3.4.2. (R Core Development Team, 2016). The significance of the fixed effects was estimated with the package lmerTest (Kuznetsova *et al.*, 2017). Final models were determined by sequentially removing the least significant term from the model based on its P-value ($\alpha = 0.05$) and comparing with a LRT this new model to the previous one, repeatedly until all remaining variables were significant (Crawley, 2012).

2.5 Results

Relationships between markers

Multiple assays run on a same blood sample showed MDA was not significantly correlated with FRAP ($\beta = -1.373 \pm 1.547$, $p = 0.38$, $n = 142$), FRAP was not correlated with HASC ($\beta = 3.427 \pm 2.915$, $p = 0.23$, $n = 90$) and HASC was not correlated with MDA ($\beta = -0.00012 \pm 0.00019$, $p = 0.51$, $n = 93$).

Individual and environmental determinants at the population level

2.5.1.1 MDA

Overall, MDA levels in the population increased by 10% over the course of the summer (Fig. 1a). Our analysis also revealed a significant sex by sampling period interaction (Table 1, Fig. 1a). MDA levels in females were higher than in males in May and remained

relatively stable throughout the summer, whereas males' MDA levels was initially lower and increased over time (Fig. 1a). An interaction was also found between MDA and mass (Table 1), which was mainly due to a positive relationship between mass and MDA levels during the May sampling period only (Table 1, Fig. 2). Age and parasitic load were not significantly related to MDA. Haemolysis of blood was related to increased MDA levels (Table 1). Assay number, chipmunk and blood sample identities explained a significant part of the total variance in MDA levels (Table 1). The full model is presented in Table S2.

Table 1. Final model of determinants of population malondialdehyde levels (MDA, oxidative damages).

Components	Values	% of variance	LRT	P value
Chipmunk ID	0.66	14.0	37.50	<0.01
Blood sample	1.41	30.0	23.28	<0.01
Assay number	0.64	13.6	14.75	<0.01
Residual variance	1.99	42.3		
Variables	Coefficients	Std. Error	t value	P value
Intercept	0.91	2.98	0.30	0.76
Mass	0.01	0.03	2.59	0.01
Sex (male)	-1.92	0.57	3.60	<0.01
Sampling period (June)	8.32	4.13	2.01	0.47
Sampling period (August)	10.03	5.08	1.98	0.05
Haemolysis	0.99	0.42	2.39	0.02
Sampling period (June) x Sex (male)	1.76	0.67	2.62	0.01
Sampling period (August) x Sex (male)	2.27	0.76	3.00	<0.01
Sampling period (June) x Mass	-0.11	0.49	2.18	0.03
Sampling period (August) x Mass	-0.12	0.58	2.06	0.04

This linear mixed-model was simplified by a backward selection. Female was the reference sex and May was the reference sampling period. The model included 183 plasma samples from 92 chipmunks, all processed in 12 assay runs. LRT stands for likelihood ratio test.

2.5.1.2 FRAP

Populational FRAP levels decreased by 18% throughout the sampling periods (Table 2, Fig. 1b). FRAP levels were also significantly higher at site 2 than site 1, although they both did not significantly differ from site 3 (Table 2, Fig. 3a). Mass, age or parasitic load were not significantly related to FRAP levels. Haemolysis and storage at -15°C were related to increased and decreased FRAP values, respectively (Table 2). Assay number, chipmunk and blood sample identities explained a significant part of the total variance in MDA levels (Table 2). The full model is presented in Table S3.

Table 2. Final model of determinants of population ferric reducing antioxidant power values (FRAP, total antioxidant capacity).

Components	Values	% of variance	LRT	P value
Chipmunk ID	0.0018	9.8	46.48	<0.01
Blood sample	0.0088	48.5	190.53	<0.01
Assay run	0.0062	33.9	30.48	<0.01
Residual variance	0.0014	7.8		
Variables	Coefficients	Std. Error	t value	P value
Intercept	0.5638	0.0356	15.85	<0.01
Site (2)	0.0465	0.0212	2.19	0.03
Site (3)	0.0065	0.0233	0.28	0.78
Sampling period (June)	-0.0536	0.0194	2.76	<0.01
Sampling period (August)	-0.0992	0.0236	4.20	<0.01
Hours stored at -15C	-0.0009	0.0003	3.16	<0.01
Haemolysis	0.1134	0.0143	4.92	<0.01

This linear mixed-model was simplified by a backward selection. Site 1 was the reference site and May was the reference sampling period. The model included 166 plasma samples from 83 chipmunks, all processed in 8 assay runs. LRT stands for likelihood ratio test.

2.5.1.3 HASC

HASC values on site 2 were significantly higher than site 3, and marginally non-significantly higher than site 1 (Table 3, fig 3b). Males had higher HASC than females (Table 3). Age, mass, parasitic load and sampling period as well as chipmunk handling and plasma storage conditions were not related to HASC values. Chipmunk identity did not explain a significant part of the variance but was kept in the model because the nested blood sample identity was significant. Assay number also explained a significant part of the variance (Table 3). The full model is presented in Table S4.

Table 3. Final model of determinants of population hypochlorous acid shock capacity values (HASC, total antioxidant capacity).

Components	Values	% of variance	LRT	P value
Chipmunk ID	0	0.0	1.62	0.20
Blood sample	0.0000038	22.7	33.02	<0.01
Assay run	0.0000059	35.4	24.21	<0.01
Residual variance	0.0000070	41.9		
Variables	Coefficients	Std. Error	t value	P value
Intercept	0.08766	0.00132	66.52	<0.01
Site (2)	0.00137	0.00062	2.19	0.03
Site (3)	-0.00127	0.00074	1.73	0.09
Sex (male)	0.00169	0.00054	3.11	<0.01

This linear mixed-model was simplified by a backward selection. Site 1 was the reference site and females were the reference sex. The model included 105 plasma samples from 73 chipmunks, all processed in 4 assay runs. LRT stands for likelihood ratio test.

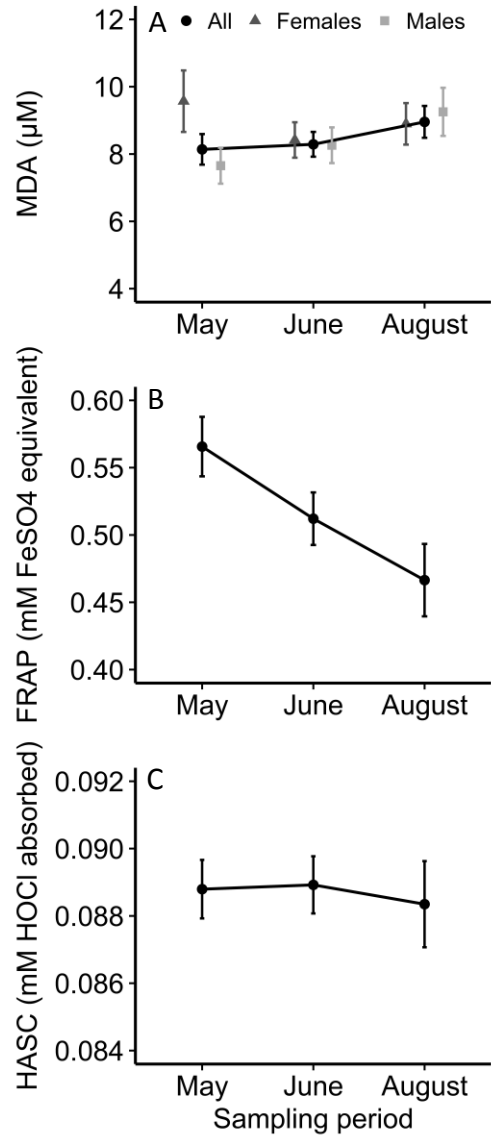


Figure 1. Population-level values of oxidative stress markers at each 2017 sampling periods (with 95% upper and lower confidence intervals). A) The predicted values for malondialdehyde levels (MDA, oxidative damages) were obtained from the final model presented in Table 1. The solid line represents the populational trend (n = 183 plasma samples from 92 eastern chipmunks). B) The predicted values for the ferric reducing antioxidant power (FRAP, total antioxidant capacity) were obtained from the final model presented in Table 2 (n = 166 plasma samples from 83 chipmunks). C) The predicted values for the hypochlorous acid shock capacity (HASC, total antioxidant capacity) were obtained from the final model presented in Table 3 (n = 105 plasma samples from 73 chipmunks).

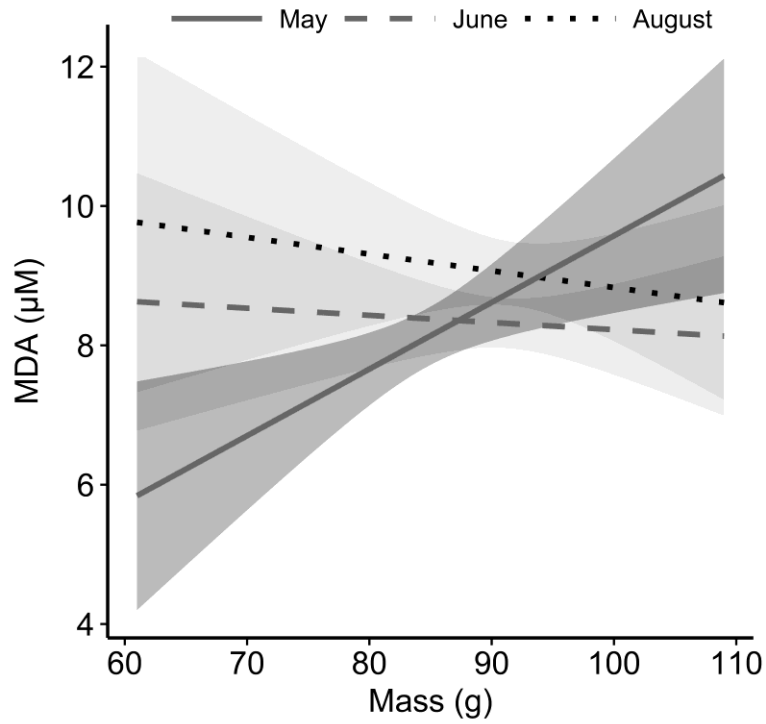


Figure 2. Effect of mass on malondialdehyde levels (MDA, oxidative damages) in an eastern chipmunk population for each 2017 sampling period (May: n = 71, June: n = 73, August: n = 39 plasma samples). The predicted values (lines) for MDA were obtained from the final model presented in Table 1. The grey areas represent the upper and lower 95% confidence intervals.

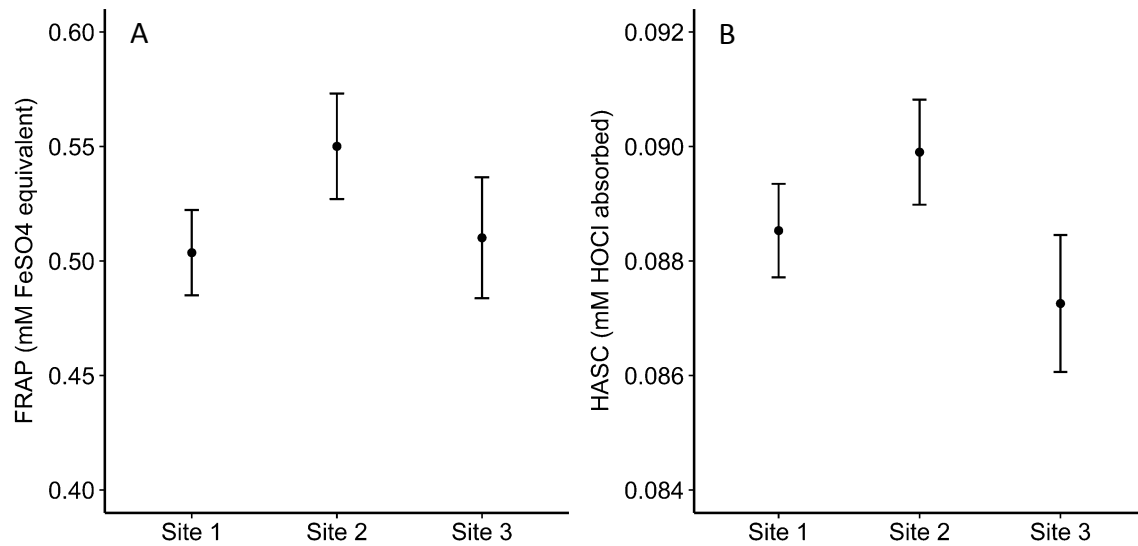


Figure 3. Total antioxidant capacity differences among sites in an eastern chipmunk population, in 2017, with upper and lower 95% confidence interval (error bars). A) The predicted values for the ferric reducing antioxidant power (FRAP) were obtained from the final model presented in Table 2 (Site 1: n = 74, Site 2: n = 55, Site 3: n = 37 plasma samples). **B)** The predicted values for the hypochlorous acid shock capacity (HASC) were obtained from the final model presented in Table 3 (Site 1: n = 46, Site 2: n = 38, Site 3: n = 21 plasma samples).

2.5 Discussion

The aim of this study was to assess the extent of spatio-temporal variation in the oxidative profiles of a wild Eastern chipmunk population. We observed an increase in MDA throughout the active season, which was mirrored by a decrease in FRAP. Antioxidant levels were different among sites for both markers. We also found a positive relationship between mass and MDA levels after torpor emergence that disappeared during the following sampling periods. Moreover, females had higher oxidative damages than males at torpor emergence, whereas males had overall higher antioxidant HASC levels. These

results provide a good example of the within year fluctuations, potentially linked to allocation trade-offs, that wild animals can experience and their impact on oxidative stress regulation.

Population-level temporal variation

The temporal monitoring of the oxidative profiles revealed a populational decrease in FRAP levels across the sampling periods, whereas MDA levels increased. Our results are concordant with a previous study on eastern chipmunks within the same area that reported a temporal increase of free MDA levels during a mast year (Bergeron *et al.*, 2011a). Chipmunks population dynamic is highly affected by temporal fluctuations in food availability (Bergeron *et al.*, 2011b), which is likely to affect dietary antioxidant acquisition and resource availability for antioxidant production (Costantini, 2014; Isaksson *et al.*, 2011). During mast years seed availability is low in early summer, therefore chipmunks consume and hoard abundant spring herbaceous plant bulbs (Elliott, 1978). They then shift to hoarding red maple seeds in mid-summer as the spring plants disappeared and the red maple seeds start falling (Elliott, 1978). During late summer, at the time of our last sampling period, a decrease in food availability and above ground activity was observed, which lasted until beech seed masting in early fall (Elliott, 1978; LaZerte and Kramer, 2016; Yahner, 1977). Thus, a general decrease in food availability may be linked with a shift in oxidative stress regulation observed in the studied adult population.

Non-mutually exclusive hypotheses can explain the observed differences in oxidative profiles between May and June when food was available. The shift between bulbs and seeds as the main feeding source may have changed the dietary antioxidant intake (Cohen *et al.*, 2009) or changed the availability of macronutrients required for antioxidant synthesis (Lee *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014), which both can impact the overall antioxidant levels. Also, the second sampling period occurred during the mating period, which can result in decreased foraging and increased aggressions between conspecifics in promiscuous

systems like chipmunks' (Buck and Barnes, 1999; Elliott, 1978; Tobler *et al.*, 2011) which could have impaired oxidative stress regulation (Garratt *et al.*, 2012; Rammal *et al.*, 2010). It should be noted that a closer inspection of our data revealed individual differences in reaction norms of oxidative stress regulation across the sampling periods. There was significant among individual's variation in FRAP levels through time ($p = 0.04$, Table S5), but not for other markers. However, a low statistical power may have impeded correct estimation of parameters (Martin *et al.*, 2011). Future studies should therefore further explore individual differences in reaction norms for these markers using a larger dataset.

Spatial variation in antioxidant capacity

We found that oxidative stress regulation varied at a fine spatial scale, as shown by different antioxidant levels between the study sites for both markers. The overall trend suggests that chipmunks present at site 2 had higher antioxidant levels than the other sites (Fig. 3). In our study system, sites 1 and 2 are within 1 km of each other and located in a deciduous forest, whereas site 3 is located further (about 5 km) in a mixed forest (see St-Hilaire *et al.*, 2017 for details). Therefore, we expected the latter to be the most different, given the close relationship between deciduous trees seed production, population dynamic and physiology of chipmunks (Bergeron *et al.*, 2011b; Landry-Cuerrier *et al.*, 2008). One explanation for the spatial difference in antioxidant levels observed might come from the among site differences in herbaceous spring plant bulb density. As part of the long-term study, the density of herbaceous spring plants (Trout lily and American beauty) within a 10-meter diameter of the occupied burrows was estimated and an additional analysis revealed that site 2 presented higher densities of herbaceous plants ($p < 0.01$, Fig. S1, Table S6). During mast years, when seed availability is initially low, spring plant bulbs are heavily hoarded and consumed by chipmunks (Elliott, 1978). Therefore, chipmunks with better access to spring plant bulbs may have had access to more dietary antioxidants or macronutrients. Oxidative damages, however, remained unchanged across sites possibly because chipmunks allocated resources to other traits of functions instead of minimizing oxidative damages, as observed in other studies. For instance, supplementation studies in nestlings

showed that extra resources were used to maximise growth rates, sometimes at the cost of oxidative stress regulation (Costantini *et al.*, 2018; Giordano *et al.*, 2015; Hall *et al.*, 2010).

Time-dependent mass effect on oxidative damages

There was a positive relationship between MDA levels and body mass during the late-May sampling period (Fig. 2). This result may be driven by compensatory growth following torpor emergence. Muscle catabolism and atrophy can occur during hibernation, leading to considerable weight loss in many species including chipmunks (Levesque and Tattersall, 2010). A restoration period is therefore required after torpor suppression (Humphries *et al.*, 2003), which appeared to be still ongoing during our first blood sampling period in late May, as shown by the temporal increase of mean populational mass (Table S7). The high cellular activity caused by tissue generation is likely to favor reactive species production and result in oxidative stress, either because of an increased biosynthesis rate (Amunugama *et al.*, 2016) or an increased metabolic rate (Halliwell and Gutteridge, 2015). Additionally, spring catch-up phase is characterized by intensive foraging, consisting of digging out and hoarding trout lily and spring beauty bulbs (Elliott, 1978). Therefore chipmunks that regained mass faster could have experienced further oxidative damages due to a possibly elevated energetic cost of foraging (van de Crommenacker *et al.*, 2011).

Sex difference in oxidative profiles

After torpor emergence, females generally had higher oxidative damages than males (Fig. 1). Similarly to other hibernating species (Buck and Barnes, 1999; Michener, 1992; Siutz *et al.*, 2018), male eastern chipmunks cease torpor several days earlier than females and stay in a normothermic state before emergence (Munro *et al.*, 2005). This is likely to facilitate testicular recrudescence and initiate spermatogenesis prior to summer reproduction (Humphries *et al.*, 2003; Siutz *et al.*, 2018). During this pre-emergence

euthermic period, the males also start eating their remaining cached food and regain mass (Munro *et al.*, 2005), as in other species (Buck and Barnes, 1999; Siutz *et al.*, 2018), hence possibly mitigating the oxidative costs of the catch-up phase by extending its duration. On the other hand, females do not spend as much time in euthermia before emergence, possibly because they could benefit from conserving their food reserves for future gestation and lactation (Munro *et al.*, 2005), which can occur during a low food availability period (Elliott, 1978; LaZerte and Kramer, 2016). Females therefore possibly experienced a restoration period that was more constrained in time and resources, which may have impaired oxidative stress regulation. It may also explain why males had higher HASC levels across all summer (Table 3). This however remains to be tested experimentally in further details. A closer analysis of spring populational mass revealed that males were 8.80g (about 10%) heavier than females during spring, although there is no apparent indication that they were regaining mass at a different rate (Table S7). Finally, we have little evidence for an oxidative cost of late-peak lactation by females, which occurred during our last sampling period. A previous study in this population reported an increase in oxidative damages with litter size (Bergeron *et al.*, 2011a), and thus we expected to find possibly greater MDA levels in females than males. Yet, even if all but three sampled females reproduced, their oxidative damage levels and FRAP levels in late summer were similar to males'. Still, HASC levels were higher for males throughout all three sampling periods, suggesting that females may have experienced a greater oxidative challenge.

2.6 Conclusion

Our study shows that oxidative stress regulation is a dynamic process that requires a detailed spatial and temporal monitoring to provide a complete picture of possible trade-offs impacting its regulation in wild populations. We observed a populational decrease in antioxidant levels over the summer mirrored by an increased in oxidative damages, as well as different antioxidant levels among study sites that were possibly linked to food availability. Moreover, following torpor emergence, females and chipmunks with a faster

catch-up growth had higher oxidative damages levels, two relationships that disappeared in the following sampling periods, when populational body mass reached a plateau. Our results therefore highlight that these trade-offs appear to be driven by environmental quality as well as physiology. Future challenges will include studying oxidative profiles in relation with fitness. This will be crucial to address the role oxidative stress in shaping the expression and evolution of life-history traits.

2.7 Authors contributions

VL, PB and DG conceived the ideas and designed the methodology. DG, PB and DR provided logistic support in the field. VL and PB collected the data and VL conducted the physiological analyses. VL and PB and DG designed the statistical analyses. VL, PB and DG wrote the manuscript. All authors approved the final version.

2.8 Acknowledgements

We are grateful to Fanie Pelletier for her contribution to this project and Evan Langille for his work in the laboratory. We also thank Nature Conservancy of Canada for allowing us to conduct this research on their lands. We thank all field assistants and graduate students who have helped to collect data in the field. This research was funded by a team grant from the Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT) to DG, DR, and PB, by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) discovery grants to DG, DR, and PB. VL was supported by a scholarship from FRQNT.

2.9 References

- Alfadda, A. A., and Sallam, R. M. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 2012, 1–14. doi:doi:10.1155/2012/936486
- Aloise King, E. D., Garratt, M., and Brooks, R. (2013). Manipulating reproductive effort leads to changes in female reproductive scheduling but not oxidative stress. *Ecology and Evolution*, 3(12), 4161–4171. doi:10.1155/2012/936486
- Amunugama, K., Jiao, L., Olbricht, G. R., Walker, C., Huang, Y.-W., Nam, P. K., and Hou, C. (2016). Cellular oxidative damage is more sensitive to biosynthetic rate than to metabolic rate: a test of the theoretical model on hornworms (*Manduca sexta* larvae). *Experimental Gerontology*, 82, 73–80. doi:10.1016/j.exger.2016.05.015
- Ayala, A., Muñoz, M. F., and Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2014, 1–31. doi:10.1155/2014/360438
- Ballinger, R. E. (1977). Reproductive strategies: food availability as a source of proximal variation in a lizard. *Ecology*, 58(3), 628–635.
- Bates, D., Mächler, M., Bolker, B. M., and Walker, S. C. (2014). Fitting linear mixed-effects models using lme4. *Journal of Statistical Software* 1., 1–51.
- Beaulieu, M., and Costantini, D. (2014). Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. *Conservation Physiology*, 2, 1–16. doi:10.1093/conphys/cou014
- Beaulieu, M., and Schaefer, H. M. (2013). Rethinking the role of dietary antioxidants through the lens of self-medication. *Animal Behaviour*, 86(1), 17–24. doi:10.1016/j.anbehav.2013.05.022
- Benzie, I. F. F., and Strain, J. J. (1996). Ferric reducing ability of plasma as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Analytical Biochemistry*, 239(1), 70–76. doi:10.1006/abio.1996.0292
- Bergeron, P., Careau, V., Humphries, M. M., Réale, D., Speakman, J. R., and Garant, D. (2011a). The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. *Functional Ecology*, 25(5), 1063–1071. doi:10.1111/j.1365-2435.2011.01868.x
- Bergeron, P., Réale, D., Humphries, M. M., and Garant, D. (2011b). Anticipation and tracking of pulsed resources drive population dynamics in eastern chipmunks. *Ecology*, 92(11), 2027–2034. doi:doi: 10.2307/23034934

- Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., and Willmore, W. G. (2017). A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. *Fish and Fisheries*, 18(5), 928–942. Retrieved from doi:10.1111/faf.12215
- Blount, J. D., Vitikainen, E. I. K., Stott, I., and Cant, M. A. (2016). Oxidative shielding and the cost of reproduction. *Biological Reviews*, 91, 483–497. doi:10.1111/brv.12179
- Buck, L. C., and Barnes, B. M. (1999). Annual cycle of body composition and hibernation in free-living arctic ground squirrels. *Journal of Mammalogy*, 80(2), 430–442. doi:10.1644/BRG-224
- Carbeck, K. M., DeMoranville, K. J., D’Amelio, P. B., Goymann, W., Trost, L., Pierce, B., ... McWilliams, S. R. (2018). Environmental cues and dietary antioxidants affect breeding behavior and testosterone of male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Hormones and Behavior*, 103, 36–44. doi:10.1016/j.yhbeh.2018.05.020
- Careau, V., Bergeron, P., Garant, D., Réale, D., Speakman, J. R., and Humphries, M. M. (2013). The energetic and survival costs of growth in free-ranging chipmunks. *Oecologia*, 171(1), 11–23. doi:10.1007/s00442-012-2385-x
- Careau, V., Thomas, D. W., and Humphries, M. M. (2010). Energetic cost of bot fly parasitism in free-ranging eastern chipmunks. *Oecologia*, 162(2), 303–312. doi:10.1007/s00442-009-1466-y
- Catoni, C., Peters, A., and Schaefer, H. M. (2008). Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. *Animal Behaviour*, 76(4), 1107–1119. doi:10.1016/j.anbehav.2008.05.027
- Chainy, G. B. N., Paital, B., and Dandapat, J. (2016). An overview of seasonal changes in oxidative stress and antioxidant defence parameters in some invertebrate and vertebrate species. *Scientifica*, 2016, 1–8. doi:10.1155/2016/6126570
- Cohen, A. A., McGraw, K. J., and Robinson, W. D. (2009). Serum antioxidant levels in wild birds vary in relation to diet, season, life history strategy, and species. *Oecologia*, 161(4), 673–683. doi:10.1007/s00442-009-
- Costantini, D. (2011). On the measurement of circulating antioxidant capacity and the nightmare of uric acid. *Methods in Ecology and Evolution*, 2, 321–325. doi:10.1111/j.2041-210X.2010.00080.x
- Costantini, D. (2014). *Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology: a marriage between mechanistic and evolutionary approaches*. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.

- Costantini, D., Angeletti, D., Strinati, C., Trisolino, P., Carlini, A., Nascetti, G., and Carere, C. (2018). Dietary antioxidants, food deprivation and growth affect differently oxidative status of blood and brain in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 216, 1–7. doi:10.1016/j.cbpa.2017.10.032
- Costantini, D., Casasole, G., Abdelgawad, H., Asard, H., and Eens, M. (2016). Experimental evidence that oxidative stress influences reproductive decisions. *Functional Ecology*, 30, 1169–1174. doi:10.1111/1365-2435.12608
- Costantini, D., Dell’Omo, G., De Filippis, S. P., Marquez, C., Snell, H. L., Snell, H. M., ... Gentile, G. (2009). Temporal and spatial covariation of gender and oxidative stress in the Galápagos land iguana *Conolophus subcristatus*. *Physiological and Biochemical Zoology*, 82(5), 430–437. doi:10.1086/604668
- Costantini, D., and Møller, A. P. (2008). Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Functional Ecology*, 22(2), 367–370. doi:10.1111/j.1365-2435.2007.01366.x
- Costantini, D., and Møller, A. P. (2009). Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 153, 339–344. doi:10.1016/j.cbpa.2009.03.010
- Costantini, D., and Verhulst, S. (2009). Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Functional Ecology*, 23, 506–509. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01546.x
- Cram, D. L., Blount, J. D., York, J. E., and Young, A. J. (2015). Immune response in a wild bird is predicted by oxidative status, but does not cause oxidative stress. *PLoS ONE*, 10(3), 1–14. doi:10.1371/journal.pone.0122421
- Crawley, M. J. (2012). *The R Book* (2nd edition). John Wiley and Sons.
- Cucco, M., Guasco, B., Malacarne, G., and Ottonelli, R. (2006). Effects of β -carotene supplementation on chick growth, immune status and behaviour in the grey partridge, *Perdix perdix*. *Behavioural Processes*, 73, 325–332. doi:10.1016/j.beproc.2006.08.002
- de Ayala, R. M., Martinelli, R., and Saino, N. (2006). Vitamin E supplementation enhances growth and condition of nestling barn swallows (*Hirundo rustica*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 60(5), 619–630. doi:10.1007/S00265-006-0206-0
- Elliott, L. (1978). Social behavior and foraging ecology of the eastern chipmunk (*Tamias striatus*) in the Adirondack Mountains. *Smithsonian Contributions to Zoology*, 265, 1–120.
- Finkel, T., and Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature*, 408, 239–247. doi:10.1038/35041687

- Fletcher, Q. E., Selman, C., Boutin, S., McAdams, A. G., Woods, S. B., Seo, A. Y., ...
McAdam, A. G. (2013). Oxidative damage increases with reproductive energy expenditure and is reduced by food-supplementation. *Evolution*, 67(5), 1527–1536. doi:10.1111/evo.12014.Oxidative
- Garratt, M., McArdle, F., Stockley, P., Vasilaki, A., Beynon, R. J., Jackson, M. J., and Hurst, J. L. (2012). Tissue-dependent changes in oxidative damage with male reproductive effort in house mice. *Functional Ecology*, 26(2), 423–433. doi:10.1111/j.1365-2435.2011.01952.x
- Giordano, M., Costantini, D., and Tschirren, B. (2015). Sex-specific effects of prenatal and postnatal nutritional conditions on the oxidative status of great tit nestlings. *Oecologia*, 177(1), 123–131. doi:10.1007/s00442-014-3100-x
- Hall, M. E., Blount, J. D., Forbes, S., and Royle, N. J. (2010). Does oxidative stress mediate the trade-off between growth and self-maintenance in structured families? *Functional Ecology*, 24, 365–373. doi:10.1111/j.1365-2435.2009.01635.x
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. (Oxford University Press, Ed.) (5th edition).
- Hentschel, B. T. (1999). Complex life cycles in a variable environment: Predicting when the timing of metamorphosis shifts from resource dependent to developmentally fixed. *The American Naturalist*, 154(5), 549–558. doi:10.1086/303263
- Hoy, S. R., Millon, A., Petty, S. J., Whitfield, D. P., and Lambin, X. (2016). Food availability and predation risk, rather than intrinsic attributes, are the main factors shaping the reproductive decisions of a long-lived predator. *The Journal of Animal Ecology*, 85(4), 892–902. doi:10.1111/1365-2656.12517
- Humphries, M. M., Thomas, D. W., Hall, C. L., and Speakman, J. R. (2002). The energetics of autumn mast hoarding in eastern chipmunks. *Oecologia*, 133, 30–37. doi:10.1007/s00442-002-1014-5
- Humphries, M. M., Thomas, D. W., and Kramer, D. L. (2003). The role of energy availability in mammalian hibernation: a cost-benefit approach. *Physiological and Biochemical Zoology*, 76(2), 165–179. doi:10.1086/367950
- Isaksson, C., Sheldon, B. C., and Uller, T. (2011). The challenges of integrating oxidative stress into life-history biology. *BioScience*, 61(3), 194–202. doi:10.1525/bio.2011.61.3.5
- Kahar, S., Debes, P. V., Vuori, K. A. M., Vähä, J. P., and Vasemägi, A. (2016). Heritability, environmental effects, and genetic and phenotypic correlations of oxidative stress resistance-related enzyme activities during early life stages in atlantic salmon. *Evolutionary Biology*, 43, 215–226. doi:10.1007/s11692-016-9368-5

- Kuznetsova, A., Brockhoff, P. B., and Christensen, R. H. B. (2017). lmerTest package: Tests in linear mixed effects models. *Journal of Statistical Software*, 82(13), 1–26. doi:10.18637/jss.v082.i13
- Landry-Cuerrier, M., Munro, D., Thomas, D. W., and Humphries, M. M. (2008). Climate and resource determinants of fundamental and realized metabolic niches of hibernating chipmunks. *Ecology*, 89(12), 3306–3316. doi:10.1890/08-0121.1
- Langille, E., Lemieux, V., Garant, D. and Bergeron, P. (2018). Development of small blood volume assays for the measurement of oxidative stress markers in mammals. *PLoS One*, 13(12), 1-13. doi.org/10.1371/journal.pone.0209802
- LaZerte, S. E., and Kramer, D. L. (2016). Activity of eastern chipmunks *Tamias striatus* during the summer and fall. *Canadian Journal of Zoology*, 94(10), 685–695. doi:10.1139/cjz-2016-0064
- Lee, S., Han, K.-H., Nakamura, Y., Kawakami, S., Shimada, K., Hayakawa, T., ... Fukushima, M. (2013). Dietary L-Cysteine improves the antioxidative potential and lipid metabolism in rats fed a normal diet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 77(7), 1430–1434. doi:10.1271/bbb.130083
- Levesque, D. L., and Tattersall, G. J. (2010). Seasonal torpor and normothermic energy metabolism in the eastern chipmunk (*Tamias striatus*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 180(2), 279–292. doi:10.1007/s00360-009-0405-x
- Li, C., Xu, B., Wang, Y., Yang, Z., and Yang, W. (2014). Protein content in larval diet affects adult longevity and antioxidant gene expression in honey bee workers. *Entomologia Experimentalis and Applicata*, 151, 19–26. doi:10.1111/eea.12167
- Losdat, S., Helfenstein, F., Blount, J. D., and Richner, H. (2014). Resistance to oxidative stress shows low heritability and high common environmental variance in a wild bird. *Journal of Evolutionary Biology*, 27, 1990–2000. doi:10.1111/jeb.12454
- Martin, J. G. A., Nussey, D. H., Wilson, A. J., and Réale, D. (2011). Measuring individual differences in reaction norms in field and experimental studies: a power analysis of random regression models. *Methods in Ecology and Evolution*, 2(4), 362–374. doi:10.1111/j.2041-210X.2010.00084.x
- Messina, S., Eens, M., Casasole, G., AbdElgawad, H., Asard, H., Pinxten, R., and Costantini, D. (2017). Experimental inhibition of a key cellular antioxidant affects vocal communication. *Functional Ecology*, 31(5), 1101–1110. doi:10.1111/1365-2435.12825
- Michener, G. R. (1992). Sexual differences in over-winter torpor patterns of Richardson's ground squirrels in natural hibernacula. *Oecologia*, 89(3), 397–406.

- Michener, G. R. (1998). Sexual differences in reproductive effort of Richardson's ground squirrels. *Journal of Mammalogy*, 79(1), 1–19. doi:10.2307/1382838
- Monaghan, P., and Costantini, D. (2014). Free Radicals – An Evolutionary Perspective. In Springer-Verlag (Ed.), *Systems biology of free Radicals and Antioxidants* (pp. 39–64). Berlin Heidelberg.
- Munro, D., Thomas, D. W., and Humphries, M. M. (2005). Torpor patterns of hibernating eastern chipmunks *Tamias striatus* vary in response to the size and fatty acid. *Journal of Animal Ecology*, 74, 692–700. doi:10.1111/j.1365-2656.2005.00968.x
- Munro, D., Thomas, D. W., and Humphries, M. M. (2008). Extreme suppression of aboveground activity by a food-storing hibernator, the eastern chipmunk (*Tamias striatus*). *Canadian Journal of Zoology*, 86, 364–370. doi:10.1139/Z08-008
- Nakagawa, S., and Schielzeth, H. (2010). Repeatability for Gaussian and non-Gaussian data: a practical guide for biologists. *Biological Reviews*, 85, 935–956. doi:10.1111/j.1469-185X.2010.00141.x
- Niu, Y., Cao, W., Zhao, Y., Zhai, H., Zhao, Y., Tang, X., and Chen, Q. (2018). The levels of oxidative stress and antioxidant capacity in hibernating *Nanorana parkeri*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 219–220, 19–27. doi:10.1016/j.cbpa.2018.02.003
- Norte, A. C., Sheldon, B. C., Sousa, J. P., and Ramos, J. A. (2009). Environmental and genetic variation in body condition and blood profile of great tit *Parus major* nestlings. *Journal of Avian Biology*, 40, 157–165. doi:10.1111/j.1600-048X.2008.04461.x
- Okamoto, I., Kayano, T., Hanaya, T., Arai, S., Ikeda, M., and Kurimoto, M. (2006). Up-regulation of an extracellular superoxide dismutase-like activity in hibernating hamsters subjected to oxidative stress in mid- to late arousal from torpor. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology and Pharmacology*, 144(1), 47–56. doi:10.1016/j.cbpc.2006.05.003
- Orr, A. L., Lohse, L. A., Drew, K. L., and Hermes-lima, M. (2009). Physiological oxidative stress after arousal from hibernation in Arctic ground squirrel. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 153(2), 213–221. doi:10.1016/j.cbpa.2009.02.016.Physiological
- Page, M. M., Peters, C. W., Staples, J. F., and Stuart, J. A. (2009). Intracellular antioxidant enzymes are not globally upregulated during hibernation in the major oxidative tissues of the 13-lined ground squirrel *Spermophilus tridecemlineatus*. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 152(1), 115–122. doi:10.1016/j.cbpa.2008.09.032

- Pamplona, R., and Costantini, D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 301(4), R843–R863. doi:10.1152/ajpregu.00034.2011
- Parolini, M., Possenti, C. D., Karadas, F., Colombo, G., Romano, M., Caprioli, M., ... Saino, N. (2018). Yolk vitamin E positively affects prenatal growth but not oxidative status in yellow-legged gull embryos. *Current Zoology*, 64(3), 285–292. doi:10.1093/cz/zox037
- Perrin, N., and Sibly, R. M. (1993). Dynamic models of energy allocation and investment. *Annual Reviews of Ecology and Systematics*, 24, 379–410. doi:10.1146/annurev.es.24.110193.002115
- R Core Development Team, R. (2016). R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. Retrieved from <https://www.r-project.org/>
- Rammal, H., Bouayed, J., and Soulimani, R. (2010). A direct relationship between aggressive behavior in the resident/intruder test and cell oxidative status in adult male mice. *European Journal of Pharmacology*, 627, 173–176. doi:10.1016/j.ejphar.2009.11.001
- Salin, K., Auer, S. K., Rudolf, A. M., Anderson, G. J., Cairns, A. G., Mullen, W., ... Metcalfe, N. B. (2015). Individuals with higher metabolic rates have lower levels of reactive oxygen species in vivo. *Biology Letters*, 11, 1–4. doi:10.1098/rsbl.2015.0538
- Siutz, C., Franceschini, C., and Millesi, E. (2016). Sex and age differences in hibernation patterns of common hamsters: adult females hibernate for shorter periods than males. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology*, 186(6), 801–811. doi:10.1007/s00360-016-0995-z
- Siutz, C., Valent, M., Ammann, V., Niebauer, A., and Millesi, E. (2018). Sex-specific effects of food supplementation on hibernation performance and reproductive timing in free-ranging common hamsters. *Scientific Reports*, 8(13082), 1–10. doi:10.1038/s41598-018-31520-4
- Smith, S. M., Nager, R. G., and Costantini, D. (2016). Meta-analysis indicates that oxidative stress is both a constraint on and a cost of growth. *Ecology and Evolution*, 6(9), 2833–2842. doi:10.1002/ece3.2080
- Snyder, D. P. (1982). *Tamias striatus*. *American Society of Mammalogists*, 168, 1–8.
- Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. New York: Oxford University Press.
- St-Hilaire, É., Réale, D., and Garant, D. (2017). Determinants, selection and heritability of docility in wild eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology*, 71(6), 71:88. doi:10.1007/s00265-017-2320-6

- Stier, A., Reichert, S., Massemin, S., Bize, P., and Criscuolo, F. (2012). Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. *Frontiers in Zoology*, 9(37), 1–11. doi:10.1186/1742-9994-9-37
- Tobler, M., Healey, M., and Wilson, M. (2011). Basal superoxide as a sex-specific immune constraint. *Biology Letters*, 9, 906–908.
- Tobler, M., Schlupp, I., and Plath, M. (2011). Costly interactions between the sexes: combined effects of male sexual harassment and female choice? *Behavioral Ecology*, 22(4), 723–729. doi:10.1093/beheco/arr044
- van de Crommenacker, J., Komdeur, J., Burke, T., and Richardson, D. S. (2011). Spatio-temporal variation in territory quality and oxidative status: a natural experiment in the Seychelles warbler (*Acrocephalus sechellensis*). *Journal of Animal Ecology*, 80, 668–680. doi:10.1111/j.1365-2656.2010.01792.x
- van Noordwijk, A. J., and de Jong, G. (1986). Acquisition and allocation of resources: their influence on variation in life history tactics. *The American Naturalist*, 128(1), 137–143. doi:10.1080/09614524.2010.508115
- Vucetic, M., Stancic, A., Otasevic, V., Jankovic, A., Korac, A., Markelic, M., ... Korac, B. (2013). The impact of cold acclimation and hibernation on antioxidant defenses in the ground squirrel (*Spermophilus citellus*): an update. *Free Radical Biology and Medicine*, 65, 916–924. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2013.08.188
- Wickler, S. J., Hoyt, D. F., and van Breukelen, F. (1991). Disuse atrophy in the hibernating golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology*, 261(5), R1214–R1217. doi:10.1152/ajpregu.1991.261.5.R1214
- Yahner, R. H. (1977). Brief note activity lull of *Tamias striatus* during the summer in Southeast Ohio. *Ohio Journal of Science*, 77(3), 143–145.
- Zera, A. J., and Harshman, L. G. (2001). The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Reviews*, 32, 95–126. doi:10.1146/annurev.ecolsys.32.081501.114006

2.10 Supplementary material

Table S1. Summary of the 2017 sample sizes.

Sampling period	Site 1	Site 2	Site 3
May	31	26	17
June	33	31	15
August	24	14	13
ID Age	1-2	3-4	5-6
(females, males)	30, 37	13, 12	1, 3
Blood samples per ID	1 sample	2 samples	3 samples
	25	34	37

The upper part represents the number of plasma samples collected for each period and site.

The middle part summarizes the age distribution and sex ratio of the sampled individuals.

The lower part represents the number of repeated sampling.

Table S2. Full model of determinants of population malondialdehyde levels (MDA, oxidative damages).

Components	Values	% of variance	LRT	P value
Chipmunk ID	0.66	14.0	37.50	<0.01
Blood sample	1.41	30.0	23.82	<0.01
Assay run	0.64	13.6	14.75	<0.01
Residual variance	1.99	42.3		
Variables	Coefficients	Std. Error	t value	P value
Intercept	1.50	3.13	0.48	0.63
Hours in trap before sampling	-0.13	0.24	-0.54	0.59
Sampling duration in minutes	0.06	0.04	1.53	0.13
Hours stored at 4°C	-0.24	0.15	-1.56	0.12
Hours stored at -20°C	0.00	0.00	-0.31	0.76
Hours in HPLC queue	-0.01	0.03	-0.47	0.64
Haemolysis	0.99	0.42	2.39	0.02
Site (2)	0.10	0.38	0.26	0.80
Site (3)	-0.03	0.42	-0.08	0.93
Age	0.04	0.13	0.33	0.74
Botfly larvae	-0.36	0.45	-0.80	0.42
Mass	0.01	0.03	2.59	0.01
Sex (male)	-1.92	0.57	-3.60	<0.01
Sampling period (June)	8.32	4.13	2.01	0.47
Sampling period (August)	10.03	5.08	1.98	0.05
Sampling period (June) x Sex (male)	1.76	0.67	2.62	0.01
Sampling period (August) x Sex (male)	2.27	0.76	3.00	<0.01
Sampling period (June) x Mass	-0.11	0.49	2.18	0.03
Sampling period (August) x Mass	-0.12	0.58	2.06	0.04

This model linear mixed-model was further simplified by a backward selection. Female was the reference sex and May was the reference sampling period. The model included 183 plasma samples from 92 chipmunks, all processed in 12 assay runs. LRT stands for likelihood ratio test.

Table S3. Full model of determinants of population ferric reducing antioxidant power values (FRAP, total antioxidant capacity).

Components	Values	% of variance	LRT	P value
Chipmunk ID	0.66	14.0	37.50	<0.01
Blood sample	1.41	30.0	23.82	<0.01
Assay run	0.64	13.6	14.75	<0.01
Residual variance	1.99	42.3		
Variables	Coefficients	Std. Error	t value	P value
Intercept	0.7527	0.2059	3.66	<0.01
Hours in trap before sampling	-0.0038	0.0148	-0.26	0.80
Sampling duration in minutes	0.0028	0.0023	1.24	0.22
Hours stored at 4°C	0.0058	0.0100	0.58	0.56
Hours stored at -15°C	-0.0009	0.0003	-3.16	<0.01
Haemolysis	0.1134	0.0143	4.92	<0.01
Site (2)	0.0465	0.0212	2.19	0.03
Site (3)	0.0065	0.0233	0.28	0.78
Minimal known age	0.0045	0.0082	0.55	0.58
Botfly larvae	-0.0139	0.0288	-0.48	0.63
Mass	-0.0011	0.0013	-0.81	0.42
Sex (male)	0.0004	0.0209	0.02	0.98
Sampling period (June)	-0.0536	0.0194	-2.76	<0.01
Sampling period (August)	-0.0992	0.0236	-4.20	<0.01
Sampling period (June) x Sex (male)	-0.0075	0.0371	-0.20	0.84
Sampling period (August) x Sex (male)	-0.0369	0.0475	-0.78	0.44
Sampling period (June) x Mass	0.0021	0.0033	0.64	0.53
Sampling period (August) x Mass	0.0018	0.0039	0.47	0.64

This linear mixed-model was further simplified by a backward selection. Site 1 was the reference site and May was the reference sampling period. The model included 166 plasma samples from 83 chipmunks, all processed in 8 assay runs. LRT stands for likelihood ratio test.

Table S4. Full model of determinants of population hypochlorous acid shock capacity values (HASC, total antioxidant capacity).

Components	Values	% of variance	LRT	P value
Chipmunk ID	0.66	14.0	37.50	<0.01
Blood sample	1.41	30.0	23.82	<0.01
Assay run	0.64	13.6	14.75	<0.01
Residual variance	1.99	42.3		
Variables	Coefficients	Std. Error	t value	P value
Intercept	0.09094	0.00693	13.13	<0.01
Hours in trap before sampling	0.00034	0.00051	0.67	0.51
Sampling duration in minutes	0.00014	0.00007	1.87	0.06
Hours stored at 4°C	-0.00008	0.00031	-0.26	0.80
Hours stored at -15°C	-0.00001	0.00001	-1.46	0.15
Haemolysis	0.00004	0.00087	0.04	0.97
Site (2)	0.00137	0.00062	2.19	0.03
Site (3)	-0.00127	0.00074	-1.73	0.09
Minimal known age	0.00016	0.00026	0.61	0.55
Botfly larvae	-0.00048	0.00180	-0.27	0.79
Mass	0.00001	0.00005	0.28	0.78
Sex (male)	0.00169	0.00054	3.11	<0.01
Sampling period (June)	0.00002	0.00065	0.03	0.98
Sampling period (August)	-0.00033	0.00084	-0.39	0.70
Sampling period (June) x Sex (male)	-0.00104	0.00166	-0.63	0.53
Sampling period (August) x Sex (male)	-0.00005	0.00192	-0.03	0.98
Sampling period (June) x Mass	0.00011	0.00010	1.07	0.29
Sampling period (August) x Mass	0.00007	0.00012	0.56	0.58

This linear mixed-model was further simplified by a backward selection. Site 1 was the reference site and females were the reference sex. The model included 105 plasma samples from 73 chipmunks, all processed in 4 assay runs. LRT stands for likelihood ratio test.

Table S5. Random regression analyses of the effect of the Julian day on markers values (malondialdehyde levels, MDA; ferric reducing antioxidant power, FRAP; hypochlorous acid shock capacity, HASC).

Marker	Random effect structure	Loglikelihood	D.f.	LRT	P value
MDA	Chipmunk ID	-735.73	11		
	Chipmunk ID x Julian day	-735.60	13	0.27	0.87
FRAP	Chipmunk ID	420.98	10		
	Chipmunk ID x Julian day	424.24	12	6.52	0.04
HASC	Chipmunk ID	978.88	9		
	Chipmunk ID x Julian day	979.16	11	0.55	0.76

Addition of Julian day within chipmunk ID was compared to the random effect structure used in populational determinant analyses (Tables 1, 2 and 3) using likelihood ratio test (LRT). Fixed effects included Julian day and each markers' significant fixed effects from the populational determinant analyses (Tables 1, 2 and 3), except for the sampling period.

Table S6. Sites' edible spring plant density obtained from a linear model.

Variables	Coefficients	Std. Error	t value	P value
Intercept	3.5914	0.3201	11.221	< 0.01
Site 2	3.8632	0.5315	7.268	< 0.01
Site 3	0.5177	0.8016	0.646	0.52

Site 1 was the reference site. Site estimations are based on microhabitat sampling of burrows (Site 1: n = 58, Site 2: n = 33, Site 3: n = 11).

Table S7. Full model of determinants of 2017 spring mass catch-up growth.

Components	Values	% of variance	LRT	P value
ID	33.78	78.42	515.50	< 0.01
Residual variance	9.30	21.58		
Variables	Coefficients	Std. Error	t value	P value
Intercept	80.91	0.94	85.84	< 0.01
Julian day (std)	3.40	0.17	20.24	< 0.01
Julian day ² (std)	-0.35	0.14	-2.41	0.02
Sex (male)	8.80	1.27	6.94	< 0.01
Julian day (std): Sex (male)	0.05	0.31	0.16	0.87

This linear mixed model was further simplified using backward selection. Females were the reference sex. The model included 540 mass measurements from May first to June 15th on 52 females and 70 males. LRT stands for likelihood ratio test.

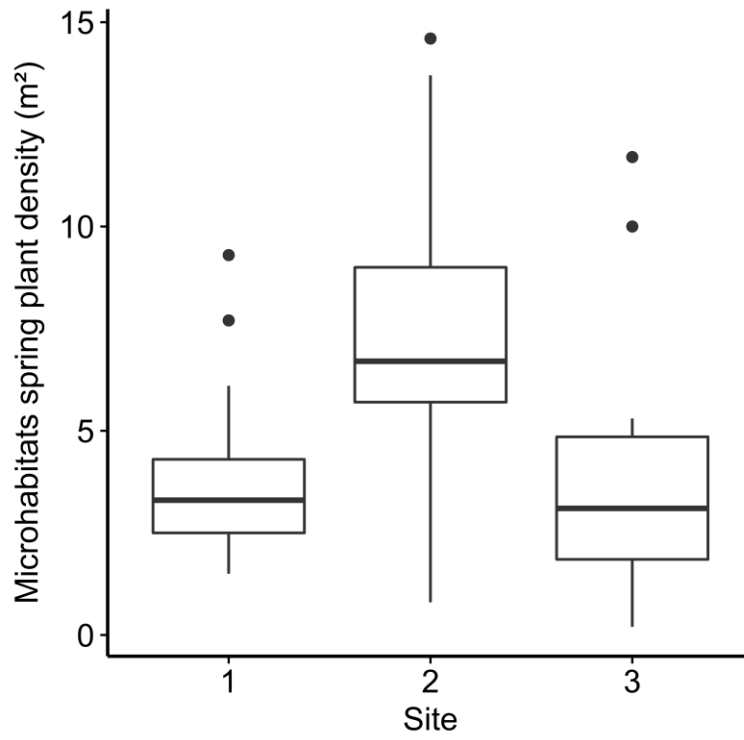


Figure S1. Among sites differences in microhabitat edible spring plant density (Site 1: n = 58, Site 2: n = 33, Site 3: n = 11).

CHAPITRE 3

DISCUSSION GÉNÉRALE ET CONCLUSION

3.1 Retour sur les objectifs

Ce projet avait comme objectif principal d’approfondir nos connaissances sur les niveaux de variation spatio-temporelle dans la régulation des profils oxydatifs d’une population naturelle de tamias rayés. Un suivi temporel au cours de l’été 2017 a permis d’identifier les principaux déterminants individuels et environnementaux responsables de la variation dans les niveaux de dommages oxydatifs et de protection antioxydante.

3.2 Retour sur les résultats

Le suivi temporel à l’échelle populationnelle a révélé une diminution du marqueur d’antioxydants FRAP de 18% au cours des périodes d’échantillonnage, accompagnée d’une hausse de 10% des niveaux de MDA, le marqueur de dommages oxydatifs. Le marqueur d’antioxydants HASC n’a pas montré de variation temporelle, toutefois il n’affiche pas de tendance contraire au marqueur FRAP. À ce jour, les niveaux de stress oxydatif ont été peu suivis en milieu naturel, ce qui complique la comparaison avec d’autres études (Chainy *et al.*, 2016). Néanmoins, les résultats obtenus sont concordants avec une étude précédente menée par Bergeron *et al.* (2011a) dans la même population qui rapporte une hausse de MDA au cours de l’été. Ces fluctuations temporelles pourraient avoir été causées par plusieurs facteurs, notamment une diminution de l’abondance de nourriture accumulable au cours de l’été. En effet, les tamias se nourrissent des abondants bulbes d’herbacées printanières au printemps, lorsque la disponibilité de graines est faible, puis consomment des samaras d’érables rouges lorsqu’ils deviennent disponibles et que les

herbacées disparaissent (Elliott, 1978). Au milieu de l'été, l'épuisement de ressources accumulables entraîne généralement une diminution de l'activité qui reprend avec la chute des faînes de hêtres au début de l'automne (Elliott, 1978; LaZerte et Kramer, 2016; Yahner, 1977). Puisque la dernière prise de sang a été faite à la fin de l'été, avant la chute des faînes, il est possible que l'augmentation des niveaux de stress oxydatif soit liée à une diminution de l'abondance de nourriture dans l'environnement. En plus d'affecter la disponibilité des antioxydants alimentaires, cela aurait pu forcer l'allocation de ressources allouées à la régulation du profil oxydatif vers d'autres traits ou fonctions reliés à la survie à court terme. De plus, des changements dans les sources d'alimentation principales peuvent avoir des répercussions sur l'acquisition d'antioxydants alimentaires et sur la disponibilité de macronutriments et ainsi avoir des répercussions sur la régulation du stress oxydatif (Cohen *et al.*, 2009; Lee *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2014). Puisque les tamias consomment principalement des bulbes d'herbacées printanières au printemps, puis des samares d'érable rouge à l'été (Elliott, 1978), il est possible qu'une partie de la fluctuation observée soit due à des changements au niveau de la diète.

Au niveau individuel, des différences temporelles dans la norme de réaction de la régulation du stress oxydatif ont été observées pour le marqueur FRAP, montrées par des variations interindividuelles significatives avec le jour julien. Toutefois, un manque de puissance statistique pourrait avoir empêché l'estimation correcte des paramètres (Martin *et al.*, 2011).

Des différences dans les niveaux d'antioxydants ont également été trouvées entre les sites d'étude, pour FRAP et HASC. Bien que les sites étant significativement différents ne soient pas les mêmes selon les marqueurs, la tendance générale indique que les tamias présents sur le site 2 présentent des niveaux d'antioxydants plus élevés, tandis que ceux des sites 1 et 3 présentent des niveaux plus similaires. Certaines études ont rapporté des différences spatiales dans la régulation du stress oxydatif qui semblent être liées à l'abondance de nourriture (Costantini *et al.*, 2009; Fletcher *et al.*, 2013; van de Crommenacker *et al.*, 2011). Les différences spatiales observées entre les sites ne semblent pas correspondre à la

densité globale des arbres producteurs de graines, malgré leur forte influence sur la physiologie, l'activité et la dynamique de population des tamias (Bergeron *et al.*, 2011b; Landry-Cuerrier *et al.*, 2008; Munro *et al.*, 2008). En effet, les sites 1 et 2 sont rapprochés dans l'espace (1 km) et situés en forêt décidue, tandis que le site 3 est plus éloigné (5 km) et se trouve dans une forêt mixte. Une analyse complémentaire a cependant révélé que les microhabitats du site 2 présentaient généralement une plus grande densité d'herbacées printanières, une importante source de nourriture accumulable (Elliott, 1978), que ceux des deux autres sites. Ainsi il est possible que les tamias présents sur le site 2 aient eu accès à une plus grande disponibilité de nourriture en début de saison ce qui aurait favorisé le maintien d'une protection antioxydante plus élevée.

Nous avons observé une relation positive entre la masse et les dommages oxydatifs lors de la première période de prise de sang, un effet possiblement lié à l'émergence de la torpeur. Chez plusieurs espèces incluant le tamia, cette dernière est caractérisée par une reprise de la masse musculaire et adipeuse perdue durant la torpeur (Humphries *et al.*, 2003; Levesque et Tattersall, 2010; Wickler *et al.*, 1991) qui semblait encore être en cours lors de la première période d'échantillonnage. Une période de reprise de masse est susceptible de favoriser la génération d'espèces réactive par différents mécanismes incluant une augmentation du métabolisme basal (Halliwell et Gutteridge, 2015), un niveau élevé de biosynthèse (Amunugama *et al.*, 2016) ou une forte dépense énergétique associée à la quête alimentaire (van de Crommenacker *et al.*, 2011). Ainsi, il est possible que les tamias ayant alloué davantage de ressources au regain de leur condition corporelle aient été contraints de sacrifier une partie des ressources allouées à la régulation du stress oxydatif ou n'aient pas été en mesure de pallier à une augmentation de la production des espèces réactives.

De plus, les femelles avaient des niveaux de MDA plus élevés au printemps et les mâles avaient des niveaux de HASC plus élevés durant tout l'été, ce qui pourrait être en partie dû à des différences de patron d'émergence de la torpeur entre les sexes. Chez plusieurs espèces de rongeurs, incluant le tamia, les mâles cessent la torpeur plus tôt que les femelles et passent plusieurs jours en normothermie avant l'émergence, possiblement pour initier la

spermatogénèse (Humphries *et al.*, 2003; Munro *et al.*, 2005; Siutz *et al.*, 2018). Ils peuvent ainsi consommer leurs ressources résiduelles (Buck et Barnes, 1999; Munro *et al.*, 2005; Siutz *et al.*, 2018), diminuant possiblement les coûts oxydatifs de la période de regain de masse en prolongeant sa durée. Les femelles ne passent pas autant de temps en normothermie avant l'émergence, possiblement dans le but de conserver de leurs réserves pour la lactation (Munro *et al.*, 2005) qui peut se produire durant une période de faible abondance de nourriture (Elliott, 1978; LaZerte et Kramer, 2016). Ainsi, il est possible qu'une période de croissance compensatoire de durée restreinte chez les femelles ait été accompagnée d'un coût oxydatif supplémentaire, bien que cela reste à être démontré expérimentalement. Une analyse complémentaire de la masse printanière n'a pas révélé de taux de gain de masse différent entre les deux sexes. Finalement, aucun coût oxydatif de la lactation n'a été détecté au niveau populationnel, bien que seulement trois femelles échantillonnées en août n'aient pas montré de signes de reproduction. Néanmoins, les niveaux de HASC des femelles étaient plus faibles que ceux des mâles, ce qui suggère qu'un défi oxydatif n'ayant pas résulté en des dommages accrus pourrait tout de même avoir eu lieu.

3.3 Limitations du projet et perspectives futures

Un des enjeux principaux entourant la mesure du profil oxydatif dans un contexte de suivi longitudinal est le prélèvement non invasif de tissus permettant l'analyse simultanée de plusieurs marqueurs complémentaires, ce qui est particulièrement difficile à accomplir lors de l'étude d'espèces de petite taille (Beaulieu et Costantini, 2014; van de Crommenacker *et al.*, 2017) comme le tamia rayé. Dans cette étude, les tests biochimiques utilisés ont été optimisés pour de petits volumes sanguins, ce qui a permis d'estimer simultanément les niveaux de trois biomarqueurs. L'information additionnelle obtenue avec l'ajout de marqueurs a cependant été accompagnée d'une plus grande incertitude sur les valeurs estimées. En effet, l'utilisation de petits volumes peut être associée à un risque plus élevé de variations causées par la manipulation des réactifs (e.g. durant le pipetage) et par un

impact accru d'une contamination ou impureté sur la valeur mesurée. Cet enjeu apparaît particulièrement important dans les études en milieu naturel, considérant qu'elles peuvent rarement rivaliser avec la qualité des conditions expérimentales des études en laboratoire. Nos valeurs de répétabilité méthodologique se situent tout de même dans les niveaux d'autres études en milieu naturel (e.g. Isaksson, 2013; Nussey *et al.*, 2009). Cependant, dans l'éventualité de projets futurs, il pourrait s'avérer avantageux d'optimiser les tests biochimiques afin d'augmenter leur robustesse, peut-être au prix d'une augmentation du volume de plasma requis. Par exemple, le test HASC requérant actuellement seulement 1 μL de plasma par lecture semble particulièrement susceptible à cette problématique. Augmenter le volume requis par lecture, par exemple à 5 μL comme pour FRAP, pourrait augmenter sa robustesse sans compromettre sa faisabilité.

Une autre limitation de mon étude concernant les marqueurs est qu'une classe importante d'antioxydants, les enzymes, n'a pas été considérée. Bien que les marqueurs FRAP et HASC permettent de mesurer simultanément la contribution de plusieurs voies antioxydantes, les réactifs utilisés ne correspondent pas aux substrats des enzymes antioxydantes et ne permettent donc pas de tenir compte de leur contribution. Ces dernières apparaissent cependant essentielles à une bonne compréhension des moyens par lesquels un organisme régule son profil oxydatif. En effet, leur expression est associée à un potentiel coût de production et peut s'adapter en réponse à la production d'espèces réactives, contrairement aux antioxydants alimentaires (Costantini, 2014; Halliwell et Gutteridge, 2015). Cependant, les marqueurs non enzymatiques donnant un portrait plus général sont souvent privilégiés en écologie au détriment de marqueurs plus spécifiques comme ceux associés à une enzyme (Bilham *et al.*, 2018; Guindre-Parker et Rubenstein, 2018; Herborn *et al.*, 2016; Messina *et al.*, 2017; Viblanç *et al.*, 2018), principalement en raison des contraintes associées à l'invasibilité d'un échantillonnage sanguin (Beaulieu et Costantini, 2014; van de Crommenacker *et al.*, 2017). Il faut noter que, dans le cadre de mon projet, un test biochimique évaluant l'activité de la superoxyde dismutase, une enzyme clé dans la neutralisation des espèces réactives (Halliwell et Gutteridge, 2015), a été optimisé pour des petits volumes sanguins. Des contraintes logistiques et matérielles ont empêché

l'analyse de ces échantillons, toutefois il pourrait être très informatif dans le cadre de projets futurs de revisiter ce test.

Bien que l'étude des implications potentielles du stress oxydatif dans les compromis physiologiques et l'expression de traits d'histoire de vie soit un sujet en pleine expansion (Speakman et Selman, 2011), les données empiriques sont encore éparpillées. Par exemple, seulement sept études ont étudié le lien entre la reproduction et le stress oxydatif chez des mammifères en milieux sauvages (Oldakowski et Taylor, 2018; Viblanc *et al.*, 2018), malgré le fait que le coût oxydatif de la reproduction soit l'un des sujets les plus étudiés et débattu dans ce domaine (Alonso-Álvarez *et al.*, 2016; Costantini, 2016; Metcalfe et Monaghan, 2013; Speakman et Garratt, 2014). Ainsi, bien que mes travaux aient comblé une lacune évidente dans les connaissances actuelles, il a été relativement difficile de comparer mes résultats avec ceux d'autres études et de les intégrer dans un contexte écoévolutif plus général. Par exemple, à ma connaissance, aucune autre étude n'a présentement exploré le possible impact de la croissance compensatoire à la sortie de la torpeur sur le stress oxydatif. Ce faisant, les hypothèses et explications avancées devront être testées par des études futures pour cibler avec plus de certitude le rôle et l'importance du stress oxydatif dans la dynamique des compromis écoévolutifs.

La possibilité de différences interindividuelles dans les normes de réaction du marqueur FRAP a soulevé beaucoup de questions et d'intérêt, puisque cela ne semble pas avoir encore été investigué chez un marqueur du stress oxydatif (Chainy *et al.*, 2016; Costantini, 2014). En effet, relativement peu de systèmes d'étude en milieu naturel semblent en mesure de surmonter les défis logistiques associés à un échantillonnage sanguin répété (Costantini, 2014), d'autant plus que les analyses de régressions aléatoires requièrent beaucoup de puissance statistique (Martin *et al.*, 2011). Bien qu'il soit pour l'instant impossible de savoir si les estimations apparemment incorrectes des paramètres sont dues à un manque de puissance ou une absence d'effet, des données supplémentaires devraient permettre de trancher. Une analyse plus approfondie des normes de réaction sera donc requise afin de

mieux comprendre les effets de l'environnement et du contexte écologique sur la régulation du stress oxydatif et le niveau de variation interindividuelle.

Le fait que mon étude se déroule sur une année représente une autre limitation. Dans un contexte de fluctuations temporelles, on peut s'attendre à ce que la dynamique de compromis diffère d'une année à l'autre selon l'environnement. Il pourrait donc être intéressant dans le cadre de projets futurs de tester la répétabilité annuelle des relations observées dans le cadre de mon étude. En effet, chez le tamia rayé, la forte variabilité interannuelle dans l'abondance et la disponibilité temporelle de la nourriture induite par les *mast* a des répercussions sur la dynamique de population (Bergeron *et al.*, 2011b; Elliott, 1978). De plus, l'abondance de nourriture peut influencer sa physiologie (Landry-Cuerrier *et al.*, 2008). Ce faisant, il est possible de penser que des différences interannuelles dans les contextes écologiques et environnementaux pourraient résulter en des différences dans les compromis d'allocation et dans la régulation du stress oxydatif. Dans cette optique, un échantillonnage similaire durant une année sans *mast* avec reproduction hivernale sera essentiel afin de survoler l'ensemble des contextes écologiques et des conditions environnementales susceptibles d'influencer la régulation du stress oxydatif chez le tamia. Aussi, étendre les périodes d'échantillonnage au cours de l'automne pourrait permettre de cibler les compromis physiologiques associés à la préparation à l'hibernation. Il pourrait être particulièrement intéressant de coupler un tel échantillonnage aux potentiels effets post-émergence révélés par mes résultats.

Finalement, les marqueurs physiologiques peuvent varier à très fine échelle temporelle (Halliwell et Gutteridge, 2015). Il est donc possible qu'une partie de la variabilité intersaisonnière et interindividuelle dans les profils oxydatifs soit induite par des facteurs ayant le potentiel d'exercer une influence peu avant l'échantillonnage sanguin. Par exemple, la réponse au stress hormonal pourrait induire la relocalisation d'antioxydants en seulement quelques minutes (Costantini *et al.*, 2012b), tandis que l'immunostimulation et le stress thermique ont le potentiel d'influencer le profil oxydatif en quelques heures (Costantini et Dell'Omo, 2006a; Montilla *et al.*, 2014). De plus, une rythmicité journalière

des profils oxydatifs a été démontrée chez plusieurs taxons qui pourrait être causée notamment par des fluctuations dans les niveaux d'hormones et d'activités métaboliques (Beaver *et al.*, 2012; Giannetto *et al.*, 2011; Peek *et al.*, 2013; van de Crommenacker *et al.*, 2011). Mon étude permet de contrôler pour une partie de ces facteurs par le fait que le protocole d'échantillonnage sanguin ait été le même pour chaque période et que les résultats ne suggèrent aucun impact du temps de manipulation des tamias sur les niveaux des marqueurs. Toutefois, les études futures pourraient tenter d'inclure davantage de facteurs pouvant expliquer des variations rapides dans le profil oxydatif, comme l'heure de la journée, la température ambiante ou les niveaux d'hormones liées au stress.

3.4 Conclusion

Cette étude a permis d'améliorer notre compréhension des moyens par lesquels certains facteurs individuels et environnementaux peuvent affecter la régulation du profil oxydatif en milieu naturel. Les résultats obtenus suggèrent un effet important de l'abondance de nourriture et de l'émergence de la torpeur sur la dynamique des compromis physiologiques chez le tamia rayé. Ils illustrent aussi qu'un suivi spatio-temporel pourrait être requis afin de permettre une compréhension globale des facteurs responsables de la variation des profils oxydatifs et de leurs impacts respectifs. Ainsi, bien que certaines des hypothèses avancées doivent encore être testées expérimentalement, ce projet de recherche a contribué à l'avancement des connaissances fondamentales en écophysiologie.

ANNEXE A

DEVELOPMENT OF SMALL BLOOD VOLUME ASSAYS FOR THE MEASUREMENT OF OXIDATIVE STRESS MARKERS IN MAMMALS

Auteurs : Evan Langille, Vincent Lemieux, Dany Garant et Patrick Bergeron

Dans le but d'obtenir un portrait global et représentatif du profil oxydatif des individus étudiés, il apparaît important d'analyser simultanément plusieurs mécanismes physiologiques pouvant influencer la régulation du stress oxydatif ou son impact sur les tissus. Or, effectuer plusieurs tests biochimiques sanguins peut nécessiter un volume considéré trop invasif pour les espèces de petite taille. La présente étude visait à optimiser des tests biochimiques de marqueurs de stress oxydatif couramment utilisés pour des petits volumes sanguins, facilitant ainsi leur analyse en parallèle.

Pour cet article, j'ai participé à la collecte de données, aux analyses physiologiques et statistiques et j'ai également contribué à la rédaction de la version finale. Evan Langille a mené l'optimisation des tests biochimiques, les analyses physiologiques ainsi que la rédaction d'une première version du manuscrit. Dany Garant et Patrick Bergeron ont supervisé l'ensemble du projet et ont contribué à la version finale du manuscrit. Ce manuscrit a été publié dans le journal *PLoS One* :

Langille, E., Lemieux, V., Garant, D. et Bergeron, P. (2018). Development of small blood volume assays for the measurement of oxidative stress markers in mammals. *PLoS One* 13, 1-13.

A.1 Summary

1. Measuring oxidative stress has become increasingly valuable in ecological studies, especially when different markers are measured on the same individual. However, many of the current methods lack sensitivity for analysis of low blood volume samples, which represent a challenge for longitudinal field studies of small organisms. Small blood volumes can usually only be analysed by using a single assay, therefore providing limited information on individual's oxidative profile.
2. In this study, we used blood collected from a population of wild eastern chipmunks (*Tamias striatus*) and modified methods presented in the literature to improve analytical selectivity and sensitivity required for small blood volumes.
3. Specifically, we proposed a modified malondialdehyde (MDA) analysis protocol by HPLC and also optimized both the uric acid independent ferric reducing antioxidant power (FRAP) and hypochlorous acid shock capacity (HASC) assays.
4. Development of the three modified methods was achieved with a sensitivity and repeatability that meets standards of field ecology while allowing measurement of all three assays in duplicate using less than 60 μL of plasma. Availability of these tests using small blood volumes will provide ecologists with a more comprehensive portrait of an individual's oxidative profile and a better understanding of its determinants and interactions with the environment.

Keywords: High-performance liquid chromatography, oxidative stress markers, lipid peroxidation, ferric reducing antioxidant power, hypochlorous acid, plasma assays, low blood volume tests, small mammal ecological studies, antioxidants

A.2 Introduction

Measuring markers of oxidative stress has become increasingly popular and useful for the evaluation of individual's physiological states. Previous work on humans reported that abnormally high oxidative stress can be associated with a number of diseases (1–3) and increased aging at cellular and organismal levels (4). In ecological studies, oxidative stress is increasingly used to identify the factors that may cause physiological stress and study their potential involvement in life-history trade-offs (5). Measuring several markers of oxidative stress has now become the norm to better understand an individual's oxidative profile because of the complexity of its regulation mechanisms (6–8). However, using multiple oxidative stress markers and estimate methodological precision with replicate measurements usually requires large blood sample volumes, making it difficult for researchers to perform comprehensive analyses of oxidative stress profile of small wild animals without being invasive.

Our goal in this study was to adapt published methodologies of three commonly reported markers of oxidative profile in order to decrease the blood volume required to quantify: i) malondialdehyde (MDA) concentration, ii) the ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay, and iii) the hypochlorous acid shock capacity (HASC) assay (9–12). We first introduce these three markers and some of their current main limitations. Then, we present in-house assays optimized to yield the most selective analysis for each marker using the smallest blood volumes possible.

A.2.1 Oxidative damages

A.2.1.1 Malondialdehyde (MDA)

Quantifying levels of malondialdehyde (MDA) is performed to assess lipid peroxidation in a wide range of disciplines from food preservation (13) to medicine (14). In ecological studies, plasma MDA levels are commonly used to estimate the overall oxidative damages experienced by an individual (5,7,10,15). Traditionally, MDA levels were quantified using the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS; (16)), an assay that is still commonly used in animal physiology (17–19). Thiobarbituric acid reacts with tissues and create a colored adduct that can be quantified by spectrophotometry.

Although being a relatively simple assay, TBARS has been readily criticized for its lack of specificity to MDA. Thiobarbituric acid can react with a wide range of components present in the plasma, such as aldehydes, sugars and urea (20–22). Thus, external factors like diet or nitrogen elimination can confound assay values, leading to an overestimation of MDA levels up to 3 folds (23,24). A greater specificity to MDA can be achieved with the TBARS assay by injecting the reacted sample into a high-performance liquid chromatograph (HPLC) (15,23,25,26). However, HPLC methods for plasma MDA detection are mainly developed in biomedical studies where blood sampling volume is not a limiting factor, requiring plasma volumes ranging from 50 μL to 100 μL (23,27,28). Therefore, approximately 200-400 μL of whole blood would have to be collected from an individual to enable replicated measurements of MDA levels. This amount of blood may require sampling procedures that are too invasive for conservation studies or for longitudinal studies of smaller species, preventing the measurement of multiples assays on a single sample (5).

Also, the MDA generated in the cell quickly binds to amino acids and proteins due to its high reactivity, making it present in both free and bound states in tissues. Free MDA readily reacts with TBA while bound MDA must return to its free form before reacting. Although most bound MDA becomes free during the derivatization process (27), it appears crucial to thoroughly liberate all the bound MDA since it may represent about 90% of all the MDA present in a sample (26). Adding an additional alkaline hydrolysis step allows a more complete and uniform release of bound MDA, thus yielding better measurements (26,29).

Moreover, high-throughput methods can be necessary for larger-scale studies, since MDA levels in stored plasma samples (25) or processed samples (27,30) can degrade over time. Therefore, optimizing the retention of the compound while using the shortest possible runtime could allow to process hundreds of injections per day on a single HPLC system.

A.2.2 Antioxidant protection

A.2.2.1 Ferric reducing/antioxidant power (FRAP)

The ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay has been used extensively in various disciplines ranging from agronomy and nutrition (31,32) to ecological studies (8,9,17). Antioxidants in the samples reduce ferric-tripyridyltriazine (Fe^{3+} -TPTZ) complex to ferrous tripyridyltriazine (Fe^{2+} -TPTZ), producing a blue colour. The coloration intensity is proportional to the reducing capacity of the mainly non-enzymatic antioxidants in the plasma, hence providing the overall antioxidant capacity. The FRAP assay is a simple, quick and inexpensive test which already requires fairly small blood volumes (17,19,33,34).

As for other antioxidant capacity test like the TAS/TEAC assay (35), FRAP values are strongly correlated with uric acid levels, which could bias the antioxidant power estimate (33). It may be difficult to decipher whether fluctuations in uric acid levels are due to other incidental metabolic processes, like an increase of amino acid catabolism, or a change in antioxidant regulation (35,36). Furthermore, differential selective pressure among species may have operated to induce variation in concentration and dynamics of uric acid (36). In recent studies, its level is often assayed in parallel with antioxidant assays and statistically accounted for (37,38). However, this approach requires the use of an extra blood assay kit which may add measurement errors to the data and reduce the amount of blood available to other assays.

An approach to remove uric acid from a plasma sample has been previously proposed by pre-treating the plasma with great excess of uricase to specifically eliminate uric acid (39). This approach spares the need of using an extra blood assay kit but high plasma volumes are usually required (e.g. 200 μ L; (40)). Here we optimized the amount of uricase added to fully remove all uric acid from the samples and we modified the incubation and assay protocol for smaller blood volumes.

A.2.2.2 Hypochlorous acid shock capacity assay (HASC)

In biological studies, the HASC assay is commonly referred to by its kit name OXY-adsorbent testTM from Diacron International (Grosseto, Italy). This total antioxidant test is popular in animal ecological studies (5,41) and it is also used in agronomy (42,43) and neurophysiology (44). The test works by incubating a plasma sample with an excess of hypochlorous acid, a strong oxidant. The hypochlorous acid oxidizes any reduced components in the plasma, then a chromogenic dye is added to quantify the remaining hypochlorous acid. The original concentration of hypochlorous acid minus the remaining quantity provides the total antioxidant capacity of the sample. The HASC assay is not correlated with uric acid levels (11). Because of its general mechanism and the non-

specificity of the pro-oxidant reagent, this assay allows most of the antioxidant mechanism to mitigate plasma oxidation. However, hypochlorous acid is not the substrate of the antioxidant enzymes, which are not contributing to its neutralisation. Therefore, the HASC assay measures total non-enzymatic antioxidant capacity. Comparative studies between HASC and FRAP have found no correlation (11) or weak positive correlation (45), suggesting that the two assays are complementary and may generate a more complete picture of the total antioxidant capacity when used together (11,45).

OXY-adsorbent testTM requires small plasma/serum volumes (10 μ L) which allows to simultaneously measure other oxidative stress or physiological components. However, with large sample sizes and/or longitudinal studies, these kits can prove to be expensive. Because of the simplicity of the assay, we propose a low-cost in-house version of this assay that is specifically adapted for small plasma volumes.

A.3 Materials and methods

A.3.1 Study population and sample collection

In order to develop methods using low blood volume often available in ecological studies, we used a population of wild eastern chipmunks (*Tamias striatus*) already followed as part of a longitudinal study in southern Québec, Canada (45°05' N, 72°26' W) and on which only small amount of blood can be collected (e.g. less than 200 μ L of whole blood,(10). Since 2012, individually marked chipmunks from three sites (6.8 ha, 6.8 ha and 3.2 ha) are systematically trapped using Longworth traps from May to September and monitored for phenotypic traits such as behavior, body mass, sex, reproductive status and parasite load (see (46) for details). We assess the methods' ability to provide reliable and repeatable results for individuals from this population to ensure that the methods are accurate enough to provide a high level of measurable variability among individuals.

The current study took place between June 21 and June 29 in 2017 when chipmunk activity was high. Upon capture, chipmunks were gently constrained in a handling bag and blood was collected in 70 μ L heparinized glass capillary tubes (Fisher Scientific, ON, Canada) after clipping the tip of a toenail following (10). Capillaries were immediately stored at 4 °C upon collection and were processed within 5.25 hours by centrifugation of the tubes at 12 000 RPM and 4 °C for 6 min in a microhematocrit centrifuge (M24, LW Scientific, Lawrenceville, GA). A metal file was used to cut between the buffy coat layer and the plasma from the capillary, and positive pressure of a syringe was used to push the sample into 0.5 mL microcentrifuge tubes. Blood fractions from each capillary were kept in separate microcentrifuge tubes. The tubes were stored at -15 °C for up to 5 days, before being transported to -80 °C for storage for up to 7 months.

We collected blood on 69 different individuals. However, because there was variation in the amount of blood available per chipmunk, 18 individuals were measured on one marker, 34 on 2 markers and 17 of all three markers. Ethics approval was obtained from both The Canadian Council on Animal Care (#A2016-01 - Bishop's University) and the Ministère des Ressources naturelles et de la Faune du Québec (#2017-05- 01-102-05-S-F).

A.3.2 MDA analysis by HPLC

A.3.2.1 MDA Reagents and system settings

HPLC grade acetonitrile was purchased from VWR Int. (Mississauga, ON, Canada). A license to procure and possess 2-thiobarbituric acid was obtained from Health Canada (authorization #43305.06.17). The 2-thiobarbituric acid was purchased from EMD Millipore (Billerica, MA, USA). Malondialdehyde bis (diethylacetal), butylated hydroxytoluene, trichloroacetic acid and trifluoroacetic acid were purchased from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). All other reagents used were of analytical grade unless

otherwise noted. Ultrapure water was made in-house using a Barnstead NANOpure water system (Resistivity $\geq 18.2 \text{ M}\Omega \cdot \text{cm}^{-1}$).

MDA was determined using an Agilent Technologies 1100 HPLC system consisting of an autosampler (G1313A), a binary pump (G1312A), a thermostatted column compartment (G1316A) and a variable wavelength detector (G1315A) (Santa Clara, CA, USA). The “OpenLab Chromatography Data System” software (Agilent Technologies) was used to control the instrument and collect the data. Analytical separations were performed using a Varian ODS2 250x4.6 mm column at 30.0 °C. The mobile phase was an isocratic mixture of 0.1% TFA in water: acetonitrile (70:30 V/V) at a flow rate of 1.00 mL min⁻¹. The backpressure of the system was 165±5 BAR. The injection volume was 20 µL. Detection was at a wavelength of 532 nm. The runtime of the method was 4 min and the retention time of the TBA₂-MDA adduct was 3.00±0.05 min.

A.3.2.2 MDA analysis for 20 µL of plasma

The MDA quantification protocol was adapted from (23). We added 2 µL of butylated hydroxytoluene (0.1M) in anhydrous ethanol and 5 µL of NaOH (2.0 M) to a 20 µL aliquot of plasma or standards (see below), before being placed in a shaking dry block incubator set at 60 °C for 30 min and 400 RPM. To precipitate proteins, 100 µL of aqueous trichloroacetic acid (15% V/V) was added. The samples were then briefly vortexed, placed in an ice bath for 5 minutes, then centrifuged for 10 min at 14,000•g and 4 °C. The supernatant (100 µL) was transferred to a screw-cap 500 µL microcentrifuge tube and 50 µL of 2-thiobarbituric acid (0.375% w/v) as a solution in HCl (0.25 M) was added. The tubes were capped, vortexed, and placed in a dry bath incubator at 100 °C for 60 min. They were then cooled on ice and centrifuged for 5 minutes at 14,000•g and 4°C, before the resulting derivatized solution (60 µl) was transferred to a 250 µL microinsert HPLC vial for analysis.

For calibration, a standard stock solution was prepared daily by diluting 1.00 mL of 1,1,3,3-tetraethoxypropane (TEP) (25 μ L into 1.00 mL of anhydrous ethanol; 100 mM) by a factor of 1:100 with ultrapure water. Standards were prepared through serial dilution of the stock standard (1 mM) with ultrapure water to obtain concentrations of 20, 15, 10, 5, 2.5, 1.25, and 0 (blank) μ M TEP. Quality control (QC) samples were prepared by pooling 5 μ L of each derivatized sample in a single HPLC vial. The QC sample was injected every twenty sample injections, and again at the end of the series run. Standards were measured from triplicate injections. Samples were prepared in duplicate and measured from duplicate injections.

A.3.3 FRAP and HASC analyses by spectrophotometry

A.3.3.1 System settings

All spectrophotometric assays for microplate analyses were conducted in standard flat bottomed 96 well plates (P/N 82.1581 Sarstedt AG et Co. KG, Nümbrecht, Germany) Analyses was carried out on an iMark Filter absorbance microplate reader with computer control and data analysis by Microplate Manager 6 Software (Bio-Rad Laboratories Canada Ltd., Mississauga, ON).

A.3.3.2 Uric Acid Independent FRAP analysis for 5 μ L of plasma

The FRAP assay protocol was adapted from (39). The amount of uricase added was reduced to 5 μ L of 1U/mL after calculating the expected physiological range of uricase in plasma and the theoretical rate at which the uric acid could be removed by uricase. 1U/mL uricase was compared to 10U/mL of uricase as used by (39), with no observable difference in FRAP levels.

A 5 μL aliquot of plasma or standards (see below) was mixed with 5 μL ultrapure water-containing uricase (1.00 U/mL) in a well of a 96 well plate and incubated for 5 min at room temperature on a 2D shaker. Then, 200 μL of FRAP reagent was added to each well. After a 30 min incubation at room temperature with regular shaking in the spectrophotometer, absorbance at 593 nm was read vs. reagent blank. Calibration curves were generated from a daily prepared standard stock FeSO_4 solution (30mM), serially diluted to 3.0 mM, 2.0 mM, 1.0 mM, 0.5 mM and 0 mM (blank) using ultrapure water. FRAP reagent was freshly prepared each day by mixing 20.0 mL acetate buffer (pH 3.6, 300 mmol/L), 2.00 mL 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) (10 mmol/L) in HCl (40 mmol/L) and 2.00 mL FeCl_3 (20 mmol/L). All analyses were conducted in duplicate.

A.3.3.3 HASC analysis for 1 μL of plasma

An aliquot of plasma was added to a well of a 96 well plate containing 100 μL of ultrapure water and the plate was briefly vortexed on a 2D shaker. Then, 100 μL of oxidant solution (for samples) or standard solutions (see below) were added, followed by a 10 min incubation at room temperature on a 2D shaker. After that, 20 μL of a stock N,N-dimethyl-p-phenylenediamine (NPD) solution (83 μL diluted to 50mL in anhydrous ethanol) was added to every well, followed by a 1 min incubation on the 2D shaker, prior to reading the absorbance of the wells at 515 nm.

NPD solution was freshly prepared each day and protected from daylight. The oxidant solution was prepared daily by diluting 10% sodium hypochlorite by a factor of 500 and adjusting the pH to 6.2 using 0.6 M sulfuric acid. The concentration of hypochlorous acid prepared was determined by measuring the absorbance at 292 nm in a 1 cm pathlength quartz cuvette and using the Beer-Lambert law with an absorptivity coefficient of 350 $\text{L mol}^{-1} \text{cm}^{-1}$. Calibration curves were generated by serial dilutions of the oxidant solution to factors of 2X, 4X, 8X, 16X, 32X with ultrapure water. The reagent blank was prepared using ultrapure water. All sample measurements were run in duplicate.

A.4 Statistical analyses

The three developed methods were assessed for intra and inter day variability using relative standard deviations (%RSD) and repeatability (r) calculation. We used the 'rpt' function in the R package rptR (version 3.4.3), which estimates repeatability of the samples' readings using a linear mixed-effects model framework (47). Number of bootstraps and permutations were set at 1000 each.

Very few studies assessed the stability of the MDA-TBA₂ adduct once prepared and in queue waiting for HPLC analysis. We compared the prepared QC sample's wait time to its relative MDA value using a linear regression. Also, a possible day-to-day drift in reagents efficiency was investigated by comparing the QC value to the mean of all the individuals assessed in each day, using a linear regression.

A.5 Results

Analysis of the MDA standard using the method developed yielded a single HPLC peak at 3.00 ± 0.05 min (Fig. A1). The linearity of the calibration curve from 1.25-20 μM was high using this method (%RSD = 0.32, $n = 7$). The LOD and LOQ were 0.06 and 0.125 μM respectively. The inter-assay variation (%RSD = 9.31, $n = 48$) and repeatability ($r = 0.82$, $n = 48$, C.I. = 0.73-0.89) were representative of the laboratory measurement error, as well as differences in capillaries, as each technical replicate was prepared from a separate capillary from the blood sampling of an individual. We obtained no significant increase for QC samples over time ($\beta = 0.0195$ μM per hour, $r^2 = 0.017$, $n = 8$). The QC quantifications compared to the mean of all the individuals assessed in each day revealed that there is little effect on the results from different days of analysis (slope = 0.99, $r^2 = 0.98$, $n = 9$). The MDA values obtained for individuals ranged from 4.4 to 15.6 μM (Fig. A2).

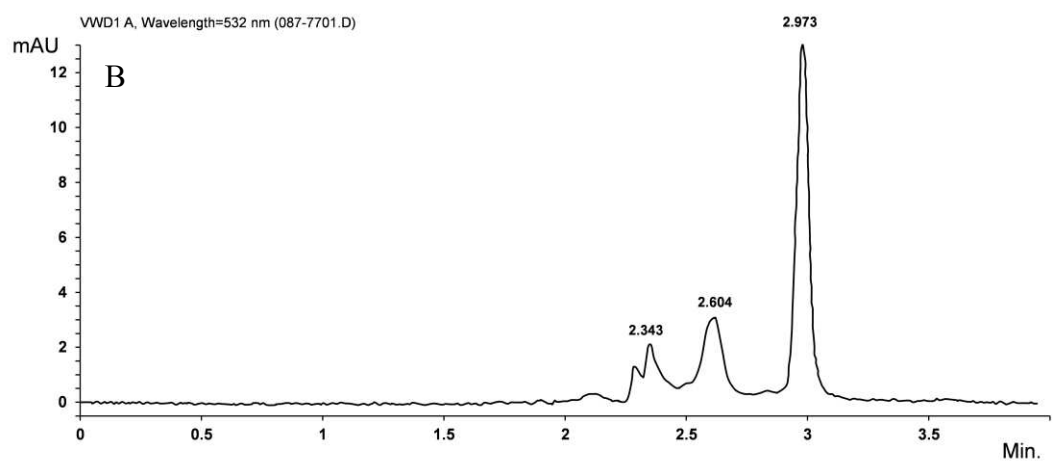
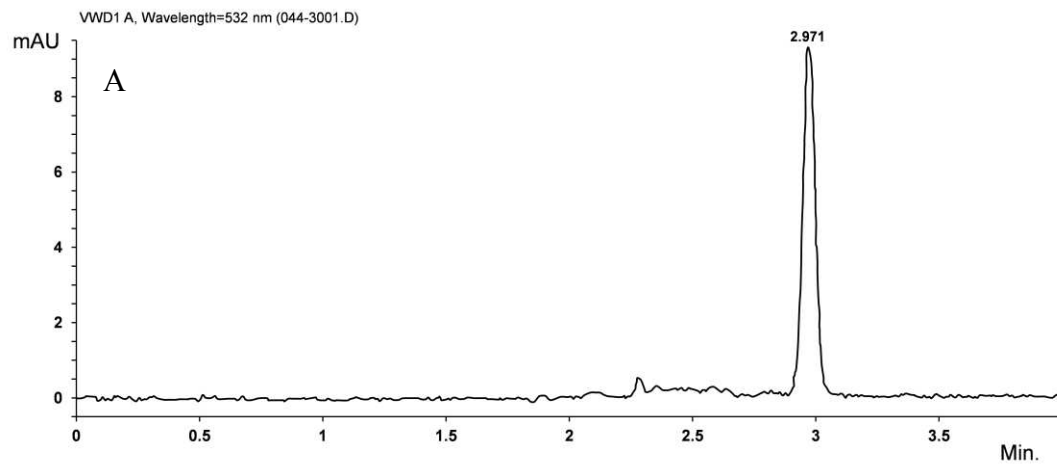


Figure A1. (a) HPLC chromatogram of 5 μ M MDA standard, (b) HPLC chromatogram of plasma sample from an eastern chipmunk showing separation of interfering substances and MDA.

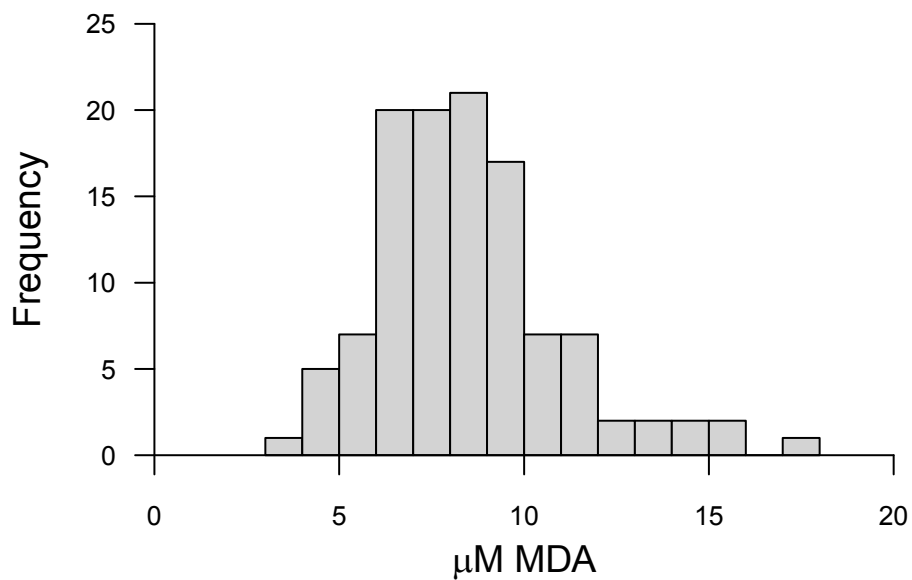


Figure A2. Distribution of MDA concentrations found in a population of wild eastern chipmunks (*Tamias striatus*).

For the developed uric acid independent FRAP assay, the linearity of the calibration curve, from 0.5-3 mM FeSO₄, was high (%RSD = 2.50, n = 7). The inter-assay variation (%RSD) was 5.82 (n = 57) and repeatability was 0.95 (n = 57, CI: 0.92-0.97). The assay range for individuals was from 0.3 to 1.5 mM FeSO₄ (Fig. A3).

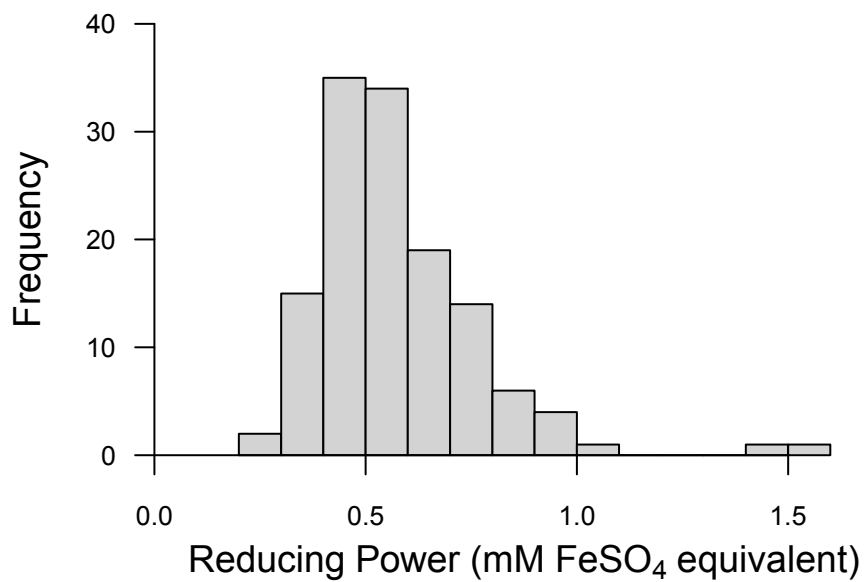


Figure A3. Distribution of FRAP assay values found in a population of wild eastern chipmunks (*Tamias striatus*).

The linearity of the calibration curve for the adapted HASC assay, ranging from 0.03-0.5 mM HOCl, was high (%RSD = 3.64, n = 4). The inter-assay variation (%RSD) was 2.03 (n = 32) and repeatability was 0.79 (n = 32, CI: 0.64-0.89). The assay range for individuals was from 82 to 96 μ mol HOCl consumed per microliter of plasma (Fig. A4).

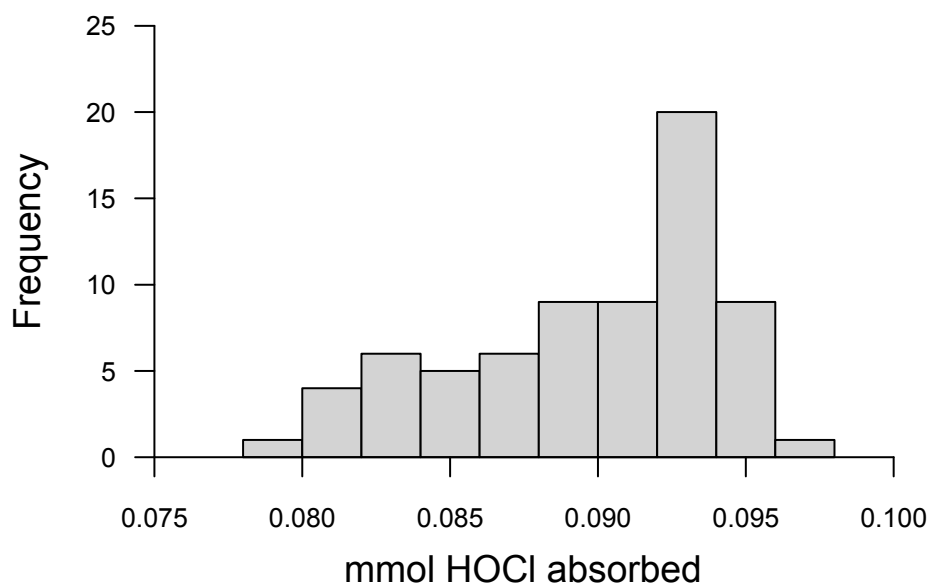


Figure A4. Distribution of hypochlorous acid shock capacities for 1 μ L plasma found in a population of wild eastern chipmunks (*Tamias striatus*).

A.6 Discussion

Several methods have been developed and modified for the measurement of oxidative stress in animal studies. However, these methodologies often require large blood volumes and are potentially biased by interfering substances. We report methodologies for three markers that can be used jointly to assess oxidative profile of small animals, requiring less than 55 μ L of plasma to assay the three markers in duplicate. Despite reducing the required volumes, our methods show the average error level reported in other biological studies. We reported a repeatability of 0.82 for MDA, while previous ecological studies reported repeatabilities averaging 0.82 (ranging from 0.62 to 0.98; (15,38,48–50). For FRAP and HASC, our reported inter-assay %RSD are 5.82 and 2.03, respectively, whereas other

studies reported inter-assay coefficients of variation averaging 3.94% for FRAP (ranging from 3.00% to 5.50%; (8,11,39,45,51)) and 5.16% for the OXY adsorbent test™ kit (ranging from 1.96% to 9.73% for the OXY adsorbent test™ kit; (11,45,52–54).

For MDA analysis, we found that the most efficient separation and elution was with a 70:30 isocratic mixture of water with 0.1% TFA:acetonitrile. Using this method, we were able to reduce the elution time to three minutes and subsequently the runtime to four minutes with no need for equilibration between runs. In this manner, we improved the efficiency of the method in order to process more samples in a given period of time. We estimate that one could process 40 individuals and 4 calibration curves in a single day using the presented method.

Through our method development process, we noted that prepared samples were stable in the HPLC queue for up to 24 hours. Thus a larger number of samples could be prepared in one day and loaded into the HPLC system queue to run. We carried out all sample preparation in single 500 μ L microcentrifuge tubes, however using microplate sample preparation technologies could be beneficial to analyse a larger number of samples. In this way, samples could be prepared and processed with less manipulation. Moreover, an autosampler equipped to sample directly from the wells of a microplate would further increase the streamlining of the method.

Some research has reported (39) a simple and rapid method for the determination of uric-acid independent FRAP levels. They used 200 μ L of plasma and 10 U/mL uricase for the determination of uric acid independent FRAP values. We modified this approach to obtain a method that used 5 μ L of plasma, which make the assay more appropriate for small animal studies. Also, reducing the amount of required uricase to 5 μ L at 1U/mL substantially decreased the cost of the assay. In addition, we modified the method to be suitable for microplate measurement, therefore making the method amenable for large scale studies.

Our HASC assay method was developed from the OXY-Adsorbent kitTM by Diacron International (Grosseto, Italy). The kit's protocol requires 10 μ L of plasma for each reading. We reduced the volume of plasma needed to 1 μ L and kept the method adapted to a microplate assay. This allows a better control the incubation times, yielding more accurate reading, while minimizing laboratory error and maximizing throughput. Using our method, we estimate that one would be able to process 200 individuals in duplicate and 10 calibration curves in a single day. The simple and inexpensive NPD dye and commercially available bleach needed for this method have dramatically reduced the cost of the assay to a fraction of the kit's cost.

Because we decreased the price and tissue volumes required for the three presented markers, more future studies should be able to use them jointly to thoroughly address an individual's oxidative and antioxidant status. Although HASC and FRAP are two total antioxidant markers, they do not focus on the same antioxidant group in the cellular machinery. FRAP measures the effect of molecules with an active reducing power, whereas HASC also measure the contribution of passive sacrificial molecules such as proteins like albumin, amino acids, nucleotides, etc. (55–57). These sacrificial elements can contribute to absorb oxidative damage and indirectly prevent or delay the degradation of other cellular structures that are more important to maintain cellular integrity. Although they are not part of the oxidative stress regulation, it is argued that these sacrificial elements could play a major role in antioxidant protection because of their quick turn over (5,14,58). Thus, these two general antioxidant assays could depict two complementary components of an individual's antioxidant status (11,45).

Overall, we have presented three improved methodologies for the measurement of oxidative stress in small animal plasma samples. We have improved the methods by lowering plasma volumes required, increasing analysis efficiency and throughput, and removing prominent interfering signals in the analyses. All three tests that we have developed have shown a high repeatability. With these improved techniques, we hope to

provide ecologists tools to better understand the factors which influence individuals' and populations' oxidative stress trends.

A.7 Acknowledgments

We are grateful to Denis Réale for his contribution to this project. We also thank Nature Conservancy of Canada for allowing us to conduct this research on their lands. We thank all field assistants, and students who have helped to collect data in the field. This research was funded by Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC) discovery grants to PB and DG and a Québec Center for Biodiversity Science (QCBS) seed grant. VL was supported by a scholarship from Fonds de Recherche du Québec - Nature et Technologies (FRQNT).

A.8 References

1. Xinglong W, Wang W, Li L, Perry G, Lee H, Zhu X. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 2014 Aug 1;1842(8):1240–7.
2. Blesa J, Trigo-Damas I, Quiroga-Varela A, Jackson-Lewis VR. Oxidative stress and Parkinson's disease. *Front Neuroanat* [Internet]. 2015 [cited 2018 Mar 11];9(91). Available from: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnana.2015.00091/full>
3. Siti HN, Kamsiah, Y, Kamsiah J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). *Vascul Pharmacol.* 2015 Aug 1;71:40–56.
4. Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullos M. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf.* 2006 Jun;64(2):178–89.
5. Costantini D. *Oxidative Stress and Hormesis in Evolutionary Ecology and Physiology.* 2014. 348 p.

6. Christensen LL, Selman C, Blount JD, Pilkington JG, Watt KA, Pemberton JM, *et al.* Marker-dependent associations among oxidative stress, growth and survival during early life in a wild mammal. *Proc R Soc B Biol Sci.* 2016; 283(1840):1–8.
7. Janssens L, Stoks R. Rapid larval development under time stress reduces adult lifespan through increasing oxidative damage. *Funct Ecol.* 2018; 32(4):1036–45.
8. Eikenaar C, Isaksson C, Hegemann A. A hidden cost of migration? Innate immune function versus antioxidant defense. *Ecol Evol.* 2018; 8(5):2721–8.
9. Griffin S, Bhagooli R. Measuring antioxidant potential in corals using the FRAP assay. *J Exp Mar Biol Ecol.* 2004 May 12; 302(2):201–11.
10. Bergeron P, Careau V, Humphries MM, Réale D, Speakman JR, Garant D. The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. *Funct Ecol.* 2011; 25(5):1063–71.
11. Costantini D. On the measurement of circulating antioxidant capacity and the nightmare of uric acid. *Methods Ecol Evol.* 2011; 2:321–5.
12. Costantini D, Ferrari C, Pasquaretta C, Cavallone E, Carere C, von Hardenberg A, *et al.* Interplay between plasma oxidative status, cortisol and coping styles in wild alpine marmots, *Marmota marmota*. *J Exp Biol.* 2012 Jan; 215(2):374–83.
13. Degala HL, Mahapatra AK, Demirci A, Kannan G. Evaluation of non-thermal hurdle technology for ultraviolet-light to inactivate *Escherichia coli* K12 on goat meat surfaces. *Food Control.* 2018; 90:113–20.
14. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. 5ème édit. Oxford University Press, editor. 2015. 896 p.
15. Nussey DH, Pemberton JM, Pilkington JG, Blount JD. Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Funct Ecol.* 2009; 23(4):809–17.
16. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979 Jun; 95(2):351–8.
17. Ruykys L, Rich B, McCarthy P. Haematology and biochemistry of warru (*Petrogale lateralis* MacDonnell Ranges race) in captivity and the wild. *Aust Vet J.* 2012 Sep; 90(9):331–40.
18. Xu Y, Yang D, Speakman JR, Wang D. Oxidative stress in response to natural and experimentally elevated reproductive effort is tissue dependent. *Funct Ecol.* 2014; 28:402–10.

19. Salmón P, Stroh E, Herrera-Dueñas A, von Post M, Isaksson C. Oxidative stress in birds along a NOx and urbanisation gradient: An interspecific approach. *Sci Total Environ.* 2018; 622–623:635–43.
20. Buttkus H, Bose RJ. Amine-malonaldehyde condensation products and their relative color contribution in the thiobarbituric acid test. *J Am Oil Chem Soc.* 1972 Jul; 49(7):440–3.
21. Sun Q, Faustman C, Senecal A, Wilkinson AL, Furr H. Aldehyde reactivity with 2-thiobarbituric acid and TBARS in freeze-dried beef during accelerated storage. *Meat Sci.* 2001 Jan; 57(1):55–60.
22. Knight JA, Robert K, McClellan L. Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem.* 1988; 34(12):2433–8.
23. Moselhy HF, Reid RG, Yousef S, Boyle SP. A specific, accurate, and sensitive measure of total plasma malondialdehyde by HPLC. *J Lipid Res.* 2013; 54(3):852–8.
24. Hörak P, Cohen AA. How to measure oxidative stress in an ecological context: Methodological and statistical issues. *Funct Ecol.* 2010; 24(5):960–70.
25. Young IS, Trimble ER. Measurement of malondialdehyde in plasma by high performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Ann Clin Biochem.* 1991; 28:504–8.
26. Hong YL, Yeh SL, Chang CY, Hu ML. Total plasma malondialdehyde levels in 16 Taiwanese college students determined by various thiobarbituric acid tests and an improved high-performance liquid chromatography-based method. *Clin Biochem.* 2000; 33(8):619–25.
27. Agarwal R, Chase SD. Rapid, fluorimetric–liquid chromatographic determination of malondialdehyde in biological samples. *J Chromatogr B.* 2002; 775(1):121–6.
28. Giera M, Lingeman H, Niessen WMA. Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): A brief overview. *Chromatographia.* 2012; 75(9–10):433–40.
29. Mateos R, Lecumberri E, Ramos S, Goya L, Bravo L. Determination of malondialdehyde (MDA) by high-performance liquid chromatography in serum and liver as a biomarker for oxidative stress. Application to a rat model for hypercholesterolemia and evaluation of the effect of diets rich in phenolic antioxidant. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Nov; 827(1):76–82.
30. Seljeskog E, Hervig T, Mansoor MA. A novel HPLC method for the measurement of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS). A comparison with a commercially available kit. *Clin Biochem.* 2006; 39(9):947–54.

31. Carlsen MH, Halvorsen BL, Holte K, Bøhn SK, Dragland S, Sampson L, *et al.* The total antioxidant content of more than 3100 foods, beverages, spices, herbs and supplements used worldwide. *Nutr J.* 2010; 9(1):1–11.
32. Di Silvestro R, Di Loreto A, Bosi S, Bregola V, Marotti I, Benedettelli S, *et al.* Environment and genotype effects on antioxidant properties of organically grown wheat varieties: a 3-year study. *J Sci Food Agric.* 2017; 97(2):641–9.
33. Benzie IFF, Strain JJ. Ferric reducing ability of plasma as a measure of “Antioxidant Power”: the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996; 239(1):70–6.
34. Celi P, Sullivan M, Evans D. The stability of the reactive oxygen metabolites (d-ROMs) and biological antioxidant potential (BAP) tests on stored horse blood. *Vet J.* 2010; 183(2):217–8.
35. Cohen AA, Klasing K, Ricklefs R. Measuring circulating antioxidants in wild birds. *Comp Biochem Physiol - B Biochem Mol Biol.* 2007; 147(1):110–21.
36. Monaghan P, Costantini D. Free radicals: an evolutionary perspective. Springer-Verlag, editor. Berlin Heidelberg; 2014.
37. Cram DL, Blount JD, Young AJ. Oxidative status and social dominance in a wild cooperative breeder. *Funct Ecol.* 2015; 29(2):229–38.
38. López-Arrabé J, Cantarero A, Pérez-rodríguez L, Palma A, Moreno J. Oxidative stress in early life: associations with sex, rearing conditions, and parental physiological traits in nestling Pied Flycatchers. *Physiol Biochem Zool.* 2016; 89(2):83–92.
39. Duplancic D, Kukoc-Modun L, Modun D, Radic N. Simple and rapid method for the determination of uric acid-independent antioxidant capacity. *Molecules.* 2011; 16(8):7058–67.
40. Srinivasa Rao PVLN, Kiranmayi VS, Swathi P, Jeyseelan L, Suchitra MM, R. Bitla A. Comparison Of Two Analytical Methods Used For The Measurement Of Total Antioxidant Status. Gupta S, editor. *J Antioxid Act.* 2015 Jun 6; 1(1):22–8.
41. Viblanc VA, Schull Q, Roth JD, Rabdeau J, Saraux C, Uhlrich P, *et al.* Maternal oxidative stress and reproduction: Testing the constraint, cost and shielding hypotheses in a wild mammal. *Funct Ecol.* 2018; 32(3):722–35.
42. Meineri G, Longato E, Peiretti PG. Effects of diets containing linseed oil or lard and supplemented with pumpkin seeds on oxidative status, blood serum metabolites, growth performance and meat quality of naked neck chickens. *Can J Anim Sci.* 2018; 1–27.

43. Fazio F, Arfuso F, Rizzo M, Giannetto C, Giudice E, Zanghi E, *et al.* Livestock handling and road transport influence some oxidative stress parameters in ewes. *J Vet Behav.* 2018; 26:5–10.
44. Kusaki M, Ohta Y, Inufusa H, Yamashita T, Morihara R, Nakano Y, *et al.* Neuroprotective Effects of a Novel Antioxidant Mixture Twendee X in Mouse Stroke Model. *J Stroke Cerebrovasc Dis.* 2017; 26(6):1191–6.
45. Vassalle C, Masini S, Carpeggiani C, L'Abbate A, Boni C, Zucchelli GC. In vivo total antioxidant capacity: comparison of two different analytical methods. *Clin Chem Lab Med CCLM FESCC.* 2004; 42(1):84–9.
46. St-Hilaire É, Réale D, Garant D. Determinants, selection and heritability of docility in wild eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Behav Ecol Sociobiol.* 2017; 71(6):71:88.
47. Stoffel MA, Nakagawa S, Schielzeth H. rptR: repeatability estimation and variance decomposition by generalized linear mixed-effects models. *Methods Ecol Evol.* 2017; 8(11):1639–44.
48. Losdat S, Helfenstein F, Blount JD, Richner H. Resistance to oxidative stress shows low heritability and high common environmental variance in a wild bird. *J Evol Biol.* 2014; 27:1990–2000.
49. Christensen LL, Selman C, Blount JD, Pilkington JG, Watt KA, Pemberton JM, *et al.* Plasma markers of oxidative stress are uncorrelated in a wild mammal. *Ecol Evol.* 2015; 5(21):5096–108.
50. Sepp T, Sild E, Blount JD, Männiste M, Karu U, Hõrak P. Individual consistency and covariation of measures of oxidative status in greenfinches. *Physiol Biochem Zool.* 2012; 85(3):299–307.
51. Rao S, Kiranmayi VS, Swathi P, Jeyseelan L, Suchitra MM, Bitla AR. Comparison of two analytical methods used for the measurement of total antioxidant status. *Antioxid Act.* 2015; 1(1):22–8.
52. Delhaye J, Jenkins T, Christe P. Plasmodium infection and oxidative status in breeding great tits, *Parus major*. *Malar J.* 2016; 15(531):1–11.
53. Geiger S, Vaillant MLE, Lebard T, Reichert S, Stier A, Le Maho Y, *et al.* Catching-up but telomere loss: half-opening the black box of growth and ageing trade-off in wild king penguin chicks. *Mol Ecol.* 2012; 21:1500–10.
54. Stier A, Reichert S, Massemin S, Bize P, Criscuolo F. Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: Correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. *Front Zool.* 2012; 9.

55. Pennathur S, Maitra D, Byun J, Sliskovic I, Abdulhamid I, Saed GM, *et al.* Potent antioxidative activity of lycopene : A potential role in scavenging hypochlorous acid. *Free Radic Biol Med.* 2010; 49(2):205–13.
56. Pattison DI, Hawkins CL, Davies MJ. Hypochlorous acid-mediated oxidation of lipid components and antioxidants present in low-density lipoproteins : Absolute rate constants, product analysis, and computational modeling. *Chem Res Toxicol.* 2003; 16:439–49.
57. Folkes LK, Candeias LP, Wardman P. Kinetics and Mechanisms of Hypochlorous Acid Reactions. *Arch Biochem Biophys.* 1995; 323(1):120–6.
58. Pamplona R, Costantini D. Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *Am J Physiol - Regul Integr Comp Physiol.* 2011; 301(4):R843–

BIBLIOGRAPHIE

Alan, R. R., et McWilliams, S. R. (2013). Oxidative stress, circulating antioxidants, and dietary preferences in songbirds. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry et Molecular Biology* 164, 185–193.

Alfadda, A. A., et Sallam, R. M. (2012). Reactive oxygen species in health and disease. *Journal of Biomedicine and Biotechnology* 2012, 1–14.

Aloise King, E. D., Garratt, M., et Brooks, R. (2013). Manipulating reproductive effort leads to changes in female reproductive scheduling but not oxidative stress. *Ecology and Evolution* 3, 4161–4171.

Alonso-Álvarez, C., Bertrand, S., Faivre, B., et Sorci, G. (2007). Increased susceptibility to oxidative damage as a cost of accelerated somatic growth in zebra finches. *Functional Ecology* 21, 873–879.

Alonso-Álvarez, C., Canelo, T., et Romero-Haro, A. Á. (2016). The oxidative cost of reproduction: theoretical questions and alternative mechanisms. *BioScience* 67, 1–13.

Amunugama, K., Jiao, L., Olbricht, G. R., Walker, C., Huang, Y.-W., Nam, P. K., et Hou, C. (2016). Cellular oxidative damage is more sensitive to biosynthetic rate than to metabolic rate: a test of the theoretical model on hornworms (*Manduca sexta* larvae). *Experimental Gerontology* 82, 73–80.

Arriero, E., Moreno, J., Merino, S., et Martínez, J. (2008). Habitat effects on physiological stress response in nestling blue tits are mediated through parasitism. *Physiological and Biochemical Zoology* 81, 195–203.

Ayala, A., Muñoz, M. F., et Argüelles, S. (2014). Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 2014, 1–31.

Badás, E. P., Martínez, J., Rivero de Aguilar Cachafeiro, J., Miranda, F., Figuerola, J., et Merino, S. (2015). Ageing and reproduction: antioxidant supplementation alleviates telomere loss in wild birds. *Journal of Evolutionary Biology* 28, 896–905.

Barja, G. (2014). The mitochondrial free radical theory of aging. In *Progress in molecular biology and translational science* (pp. 1–27). Academic Press.

Beaulieu, M., et Costantini, D. (2014). Biomarkers of oxidative status: missing tools in conservation physiology. *Conservation Physiology* 2, 1–16.

Beaulieu, M., Geiger, R. E., Reim, E., Zielke, L., et Fischer, K. (2015). Reproduction alters oxidative status when it is traded-off against longevity. *Evolution* 69, 1786–1796.

Beaver, L. M., Klichko, V. I., Chow, E. S., Kotwica-Rolinska, J., Williamson, M., Orr, W. C., Radyuk, S. N., Giebultowicz, J. M. (2012). Circadian Regulation of glutathione levels and biosynthesis in *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 7, 1-9.

Bergeron, P., Careau, V., Humphries, M. M., Réale, D., Speakman, J. R., et Garant, D. (2011a). The energetic and oxidative costs of reproduction in a free-ranging rodent. *Functional Ecology* 25, 1063–1071.

Bergeron, P., Montiglio, P.-O., Réale, D., Humphries, M. M., Gimenez, O., et Garant, D. (2013). Disruptive viability selection on adult exploratory behaviour in eastern chipmunks. *Journal of Evolutionary Biology* 26, 766–774.

Bergeron, P., Réale, D., Humphries, M. M., et Garant, D. (2011b). Anticipation and tracking of pulsed resources drive population dynamics in eastern chipmunks. *Ecology* 92, 2027–2034.

Bergeron, P., Réale, D., Humphries, M. M., et Garant, D. (2011c). Evidence of multiple paternity and mate selection for inbreeding avoidance in wild eastern chipmunks. *Journal of Evolutionary Biology* 24, 1685–1694.

Berglund, Å. M. M., Rainio, M. J., Kanerva, M., Nikinmaa, M., et Eeva, T. (2014). Antioxidant status in relation to age, condition, reproductive performance and pollution in three passerine species. *Journal of Avian Biology* 45, 235–246.

Bielski, B. H. J., Arudi, R. L., et Sutherland, M. W. (1983). A study of the reactivity of HO₂/O₂- with unsaturated fatty acids. *The Journal of Biological Chemistry* 258, 25–28.

Bilham, K., Newman, C., Buesching, C. D., Noonan, M. J., Boyd, A., Smith, A. L., et Macdonald, D. W. (2018). Effects of weather conditions on oxidative stress, oxidative damage, and antioxidant capacity in a wild-living mammal, the european badger (*Meles meles*). *Physiological and Biochemical Zoology* 91, 987–1004.

Birnie-Gauvin, K., Costantini, D., Cooke, S. J., et Willmore, W. G. (2017). A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: a review. *Fish and Fisheries* 18, 928–942.

Bjelland, S., et Seeberg, E. (2003). Mutagenicity, toxicity and repair of DNA base damage induced by oxidation. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 531, 37–80.

Blagojevic, D. P., Grubor-Lajsic, G. N., et Spasic, M. B. (2011). Cold defence responses: the role of oxidative stress. *Frontiers in Bioscience* 3, 416–427.

Blount, J. D., Vitikainen, E. I. K., Stott, I., et Cant, M. A. (2016). Oxidative shielding and the cost of reproduction. *Biological Reviews* 91, 483–497.

Bonneaud, C., Mazuc, J., Gonzalez, G., Haussy, C., Chastel, O., Faivre, B., et Sorci, G. (2003). Assessing the cost of mounting an immune response. *The American Naturalist* *161*, 367–379.

Brand, M. D. (2000). Uncoupling to survive? The role of mitochondrial inefficiency in ageing. *Experimental Gerontology* *35*, 811–820.

Buck, L. C., et Barnes, B. M. (1999). Annual cycle of body composition and hibernation in free-living arctic ground squirrels. *Journal of Mammalogy* *80*, 430–442.

Buzadžić, B., Blagojević, D., Korać, B., Saičić, Z. S., Spasić, M. B., et Petrović, V. M. (1997). Seasonal variation in the antioxidant defense system of the brain of the ground squirrel (*Citellus citellus*) and response to low temperature compared with rat. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part C: Toxicology et Pharmacology* *117*, 141–149.

Buzadžić, B., Spasić, M., Saičić, S. Z., Radojičić, R., Petrović, M., et Halliwell, B. (1990). Antioxydant defenses in the ground squirrel *Citellus citellus* 2. The effect of hibernation. *Free Radical Biology and Medicine* *9*, 407–413.

Calabrese, E. J., Bachmann, K. A., Bailer, A. J., Bolger, P. M., Borak, J., Cai, L., Cedergreen, N., Cherian, M. G., Chiueh, C. C., Clarkson T. W., *et al.* (2007). Biological stress response terminology: integrating the concepts of adaptive response and preconditioning stress within a hormetic dose-response framework. *Toxicology and Applied Pharmacology* *222*, 122–128.

Carbeck, K. M., DeMoranville, K. J., D'Amelio, P. B., Goymann, W., Trost, L., Pierce, B., Bryla, A., Dzialo, M., Beauchinger, U., et McWilliams, S. R. (2018). Environmental cues and dietary antioxidants affect breeding behavior and testosterone of male European starlings (*Sturnus vulgaris*). *Hormones and Behavior* *103*, 36–44.

Careau, V., Bergeron, P., Garant, D., Réale, D., Speakman, J. R., et Humphries, M. M. (2013). The energetic and survival costs of growth in free-ranging chipmunks. *Oecologia* *171*, 11–23.

Careau, V., Garant, D., et Humphries, M. M. (2012a). Free-ranging eastern chipmunks (*Tamias striatus*) infected with bot fly (*Cuterebra emasculator*) larvae have higher resting but lower maximum metabolism. *Canadian Journal of Zoology* *90*, 413–421.

Careau, V., Réale, D., Garant, D., Pelletier, F., Speakman, J. R., et Humphries, M. M. (2012b). Context-dependent correlation between resting metabolic rate and daily energy expenditure in wild chipmunks. *Journal of Experimental Biology* *216*, 418–426.

Careau, V., Thomas, D. W., et Humphries, M. M. (2010). Energetic cost of bot fly parasitism in free-ranging eastern chipmunks. *Oecologia* *162*, 303–312.

Catoni, C., Peters, A., et Schaefer, H. M. (2008). Life history trade-offs are influenced by the diversity, availability and interactions of dietary antioxidants. *Animal Behaviour* *76*, 1107–1119.

Catts, E. P. (1982). Biology of new world bot flies: cuterebridae. *Annual Review of Entomology* 27, 313–338.

Chainy, G. B. N., Paital, B., et Dandapat, J. (2016). An overview of seasonal changes in oxidative stress and antioxidant defence parameters in some invertebrate and vertebrate species. *Scientifica* 2016, 1–8.

Christensen, L. L., Selman, C., Blount, J. D., Pilkington, J. G., Watt, K. A., Pemberton, J. M., Reid, J. M., et Nussey, D. H. (2015). Plasma markers of oxidative stress are uncorrelated in a wild mammal. *Ecology and Evolution* 5, 5096–5108.

Cleavitt, N. L., et Fahey, T. J. (2017). Seed production of sugar maple and american beech in northern hardwood forests, New Hampshire, USA. *Canadian Journal of Forest Research* 47, 985–990.

Cohen, A. A., McGraw, K. J., et Robinson, W. D. (2009). Serum antioxidant levels in wild birds vary in relation to diet, season, life history strategy, and species. *Oecologia* 161, 673–683.

Cohen, A. A., McGraw, K. J., Wiersma, P., Williams, J. B., Robinson, W. D., Robinson, T. R., Brawn, J. D., et Ricklefs, R. E. (2008). Interspecific associations between circulating antioxidant levels and life-history variation in birds. *The American Naturalist* 172, 178–193.

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

Costantini, D. (2010). Redox physiology in animal function: the struggle of living in an oxidant environment. *Current Zoology* 56, 687–702.

Costantini, D. (2014). *Oxidative stress and hormesis in evolutionary ecology and physiology: a marriage between mechanistic and evolutionary approaches*. (Berlin Heidelberg: Springer-Verlag).

Costantini, D. (2016). Commentary: oxidative stress as a cost of reproduction: beyond the simplistic trade-off model. *Frontiers in Ecology and Evolution* 4, 1–3.

Costantini, D. (2018). Meta-analysis reveals that reproductive strategies are associated with sexual differences in oxidative balance across vertebrates. *Current Zoology* 64, 1–11.

Costantini, D., Angeletti, D., Strinati, C., Trisolino, P., Carlini, A., Nascetti, G., et Carere, C. (2018). Dietary antioxidants, food deprivation and growth affect differently oxidative status of blood and brain in juvenile European seabass (*Dicentrarchus labrax*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular et Integrative Physiology* 216, 1–7.

Costantini, D., Casasole, G., AbdElgawad, H., Asard, H., et Eens, M. (2016). Experimental evidence that oxidative stress influences reproductive decisions. *Functional Ecology* 30, 1169–1174.

Costantini, D., Casasole, G., et Eens, M. (2014). Does reproduction protect against oxidative stress? *Journal of Experimental Biology* 217, 4237–4243.

Costantini, D., et Dell’Omo, G. (2006a). Effects of T-cell-mediated immune response on avian oxidative stress. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular et Integrative Physiology* 145, 137–142.

Costantini, D., et Dell’Omo, G. (2006b). Environmental and genetic components of oxidative stress in wild kestrel nestlings (*Falco tinnunculus*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 176, 575–579.

Costantini, D., et Dell’Omo, G. (2015). Oxidative stress predicts long-term resight probability and reproductive success in Scopoli’s shearwater (*Calonectris diomedea*). *Conservation Physiology* 3, 1–7.

Costantini, D., Dell’Omo, G., De Filippis, S. P., Marquez, C., Snell, H. L., Snell, H. M., Washington, T., Gianfranco, B., et Gentile, G. (2009). Temporal and spatial covariation of gender and oxidative stress in the Galápagos land iguana *Conolophus subcristatus*. *Physiological and Biochemical Zoology* 82, 430–437.

Costantini, D., Ferrari, C., Pasquarella, C., Cavallone, E., Carere, C., von Hardenberg, A., et Réale, D. (2012a). Interplay between plasma oxidative status, cortisol and coping styles in wild alpine marmots, *Marmota marmota*. *The Journal of Experimental Biology* 215, 374–383.

Costantini, D., Metcalfe, N. B., et Monaghan, P. (2010b). Ecological processes in a hormetic framework. *Ecology Letters* 13, 1435–1447.

Costantini, D., et Møller, A. P. (2008). Carotenoids are minor antioxidants for birds. *Functional Ecology* 22, 367–370.

Costantini, D., et Møller, A. P. (2009). Does immune response cause oxidative stress in birds? A meta-analysis. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular et Integrative Physiology* 153, 339–344.

Costantini, D., Monaghan, P., et Metcalfe, N. B. (2012b). Early life experience primes resistance to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology* 215, 2820–2826.

Costantini, D., Monaghan, P., et Metcalfe, N. B. (2013). Loss of integration is associated with reduced resistance to oxidative stress. *Journal of Experimental Biology* 216, 2213–2220.

Costantini, D., Rowe, M., Butler, M. W., et McGraw, K. J. (2010a). From molecules to living systems: historical and contemporary issues in oxidative stress and antioxidant ecology. *Functional Ecology* 24, 950–959.

Costantini, D., et Verhulst, S. (2009). Does high antioxidant capacity indicate low oxidative stress? *Functional Ecology* 23, 506–509.

Cram, D. L., Blount, J. D., York, J. E., et Young, A. J. (2015). Immune response in a wild bird is predicted by oxidative status, but does not cause oxidative stress. *PLoS ONE* 10, 1–14.

Cucco, M., Guasco, B., Malacarne, G., et Ottonelli, R. (2006). Effects of β -carotene supplementation on chick growth, immune status and behaviour in the grey partridge, *Perdix perdix*. *Behavioural Processes* 73, 325–332.

Dammhahn, M., Landry-Cuerrier, M., Réale, D., Garant, D., et Humphries, M. M. (2017). Individual variation in energy-saving heterothermy affects survival and reproductive success. *Functional Ecology* 31, 866–875.

de Ayala, R. M., Martinelli, R., et Saino, N. (2006). Vitamin E supplementation enhances growth and condition of nestling barn swallows (*Hirundo rustica*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 60, 619–630.

De Block, M., et Stoks, R. (2008). Compensatory growth and oxidative stress in a damselfly. *Proceedings of the Royal Society of London Series B-Biological Sciences* 275, 781–785.

de Boer, R. A., Costantini, D., Casasole, G., AbdElgawad, H., Asard, H., Eens, M., et Müller, W. (2017). Sex-specific effects of inbreeding and early life conditions on the adult oxidative balance. *Current Zoology* 64, 631–639.

Deenbergh, C., Overkamp, G. J. F., Visser, G. H., et Daan, S. (1998). Compensation in resting metabolism for experimentally increased activity. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 166B, 507–512.

Dröge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiological Reviews* 82, 47–95.

Elias, R. J., McClements, D. J., et Decker, E. A. (2005). Antioxidant activity of cysteine, tryptophan, and methionine residues in continuous phase β -lactoglobulin in oil-in-water emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 10248–10253.

Elliott, L. (1978). Social behavior and foraging ecology of the eastern chipmunk (*Tamias striatus*) in the Adirondack Mountains. *Smithsonian Contributions to Zoology* 265, 1–120.

Erikstad, K. E., Fauchald, P., Tveraa, T., et Steen, H. (1998). On the cost of reproduction in long-lived birds : the influence of environmental variability. *Ecology* 79, 1781–1788.

Feoli, A. M., Siqueira, I. R., Almeida, L., Tramontina, A. C., Vanzella, C., Sbaraini, S., ... Gonçalves, C. A. (2006). Effects of protein malnutrition on oxidative status in rat brain. *Nutrition* 22, 160–165.

Finkel, T., et Holbrook, N. J. (2000). Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. *Nature* 408, 239–247.

Fisher, R. A. (1930). *The genetical theory of natural selection*. Oxford: Clarendon Press.

Fletcher, Q. E., Selman, C., Boutin, S., McAdams, A. G., Woods, S. B., Seo, A. Y., Leeuwenburgh, C., Speakman, J. R., et Humphries, M. M. (2013). Oxidative damage increases with reproductive energy expenditure and is reduced by food-supplementation. *Evolution* 67, 1527–1536.

Friguet, B. (2006). Oxidized protein degradation and repair in ageing and oxidative stress. *FEBS Letters* 580, 2910–2916.

Galván, I., Erritzøe, J., Karadaş, F., et Møller, A. P. (2012). High levels of liver antioxidants are associated with life-history strategies characteristic of slow growth and high survival rates in birds. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 182, 947–959.

García-de Blas, E., Mateo, R., et Alonso-Álvarez, C. (2016). Specific carotenoid pigments in the diet and a bit of oxidative stress in the recipe for producing red carotenoid-based signals. *PeerJ* 4, e2237.

Garratt, M., McArdle, F., Stockley, P., Vasilaki, A., Beynon, R. J., Jackson, M. J., et Hurst, J. L. (2012). Tissue-dependent changes in oxidative damage with male reproductive effort in house mice. *Functional Ecology* 26, 423–433.

Giannetto, C., Fazio, F., Casella, S., Assenza, A., Marafioti, S., et Piccione, G. (2011). Comparison of daily rhythms of oxygen metabolites and serum barrier to oxidation in domestic animals. *Central European Journal of Biology* 6, 91–98.

Giordano, M., Costantini, D., et Tschirren, B. (2015). Sex-specific effects of prenatal and postnatal nutritional conditions on the oxidative status of great tit nestlings. *Oecologia* 177, 123–131.

Giraudeau, M., Sweazea, K., Butler, M. W., et McGraw, K. J. (2013). Effects of carotenoid and vitamin E supplementation on oxidative stress and plumage coloration in house finches (*Haemorhous mexicanus*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular et Integrative Physiology* 166, 406–413.

Gomez-Cabrera, M. C., Domenech, E., et Viña, J. (2008). Moderate exercise is an antioxidant: upregulation of antioxidant genes by training. *Free Radical Biology and Medicine* 44, 126–131.

Gorbi, S., Baldini, C., et Regoli, F. (2005). Seasonal variability of metallothioneins, cytochrome P450, bile metabolites and oxyradical metabolism in the European eel *Anguilla anguilla* L. (Anguillidae) and striped mullet *Mugil cephalus* L. (Mugilidae). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49, 62–70.

Guindre-Parker, S., et Rubenstein, D. R. (2018). The oxidative costs of parental care in cooperative and pair-breeding African starlings. *Oecologia* 188, 53–63.

Hall, M. E., Blount, J. D., Forbes, S., et Royle, N. J. (2010). Does oxidative stress mediate the trade-off between growth and self-maintenance in structured families? *Functional Ecology* 24, 365–373.

Halliwell, B. (2006). Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends in Biochemical Sciences* 31, 509–515.

Halliwell, B., et Gutteridge, J. M. C. (2015). *Free radicals in biology and medicine*. (USA: Oxford University Press)

Hammond, K. A. (1997). Adaptation of the maternal intestine during lactation. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2, 243–252.

Hancock, J. T., Desikan, R., et Neill, S. J. (2001). Role of reactive oxygen species in cell signalling pathways. *Biochemical Society Transactions* 29, 345–350.

Hasselquist, D., et Nilsson, J.-Å. (2012). Physiological mechanisms mediating costs of immune responses: what can we learn from studies of birds? *Animal Behaviour* 83, 1303–1312.

Herborn, K. A., Coffey, J., Larcombe, S. D., Alexander, L., et Arnold, K. E. (2011). Oxidative profile varies with personality in European greenfinches. *The Journal of Experimental Biology* 214, 1732–1739.

Herborn, K. A., Daunt, F., Heidinger, B. J., Granroth-Wilding, H. M. V, Burthe, S. J., Newell, M. A., Monaghan, P. (2016). Age, oxidative stress exposure and fitness in a long-lived seabird. *Functional Ecology* 30, 913–921.

Hermes-Lima, M., Carreiro, C., Moreira, D. C., Polcheira, C., Machado, D. P., et Campos, É. G. (2012). Glutathione status and antioxidant enzymes in a crocodilian species from the swamps of the Brazilian Pantanal. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular et Integrative Physiology* 163, 189–198.

Hirshfield, M. F., et Tinkle, D. W. (1975). Natural selection and the evolution of reproductive effort. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 72, 2227–2231.

Hoy, S. R., Millon, A., Petty, S. J., Whitfield, D. P., et Lambin, X. (2016). Food availability and predation risk, rather than intrinsic attributes, are the main factors shaping the reproductive decisions of a long-lived predator. *The Journal of Animal Ecology* 85, 892–902.

- Hulbert, A. J., Faulks, S. C., et Buffenstein, R. (2006). Oxidation-resistant membrane phospholipids can explain longevity differences among the longest-living rodents and similarly-sized mice. *Journal of Gerontology* *61A*, 1009–1018.
- Hulbert, A. J., Pamplona, R., Buffenstein, R., et Buttemer, W. A. (2007). Life and death: metabolic rate, membrane composition, and life span of animals. *Physiological Reviews* *87*, 1175–1213.
- Humphries, M. M., Thomas, D. W., Hall, C. L., Speakman, J. R., et Kramer, D. L. (2002). The energetics of autumn mast hoarding in eastern chipmunks. *Oecologia* *133*, 30–37.
- Humphries, M. M., Thomas, D. W., et Kramer, D. L. (2003). The role of energy availability in mammalian hibernation: a cost-benefit approach. *Physiological and Biochemical Zoology* *76*, 165–179.
- Isaksson, C. (2013). Opposing effects on glutathione and reactive oxygen metabolites of sex, habitat, and spring date, but no effect of increased breeding density in great tits (*Parus major*). *Ecology and Evolution* *3*, 2730–2738.
- Isaksson, C., Sheldon, B. C., et Uller, T. (2011). The challenges of integrating oxidative stress into life-history biology. *BioScience* *61*, 194–202.
- Jørgensen, C. B. (1988). Metabolic costs of growth and maintenance in the toad, *Bufo bufo*. *The Journal of Experimental Biology* *138*, 319–331.
- Kahar, S., Debes, P. V., Vuori, K. A. M., Vähä, J. P., et Vasemägi, A. (2016). Heritability, environmental effects, and genetic and phenotypic correlations of oxidative stress resistance-related enzyme activities during early life stages in atlantic salmon. *Evolutionary Biology* *43*, 215–226.
- Kaitala, A. (1991). Phenotypic plasticity in reproductive behaviour of waterstriders: trade-offs between reproduction and longevity during food stress. *Functional Ecology* *5*, 12–18.
- Kovacic, P., et Wakelin, L. P. G. (2001). Review: DNA molecular electrostatic potential: novel perspectives for the mechanism of action of anticancer drugs involving electron transfer and oxidative stress. *Anti-Cancer Drug Des.* *16*, 175–184.
- Landry-Cuerrier, M., Munro, D., Thomas, D. W., et Humphries, M. M. (2008). Climate and resource determinants of fundamental and realized metabolic niches of hibernating chipmunks. *Ecology* *89*, 3306–3316.
- Langille, E., Lemieux, V., Garant, D. et Bergeron, P. (2018). Development of small blood volume assays for the measurement of oxidative stress markers in mammals. *PLoS One* *13*, 1-13.

Larcombe, S. D., Coffey, J. S., Bann, D., Alexander, L., et Arnold, K. E. (2010). Impacts of dietary antioxidants and flight training on post-exercise oxidative damage in adult parrots. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part B: Biochemistry et Molecular Biology* 155, 49–53.

LaZerte, S. E., et Kramer, D. L. (2016). Activity of eastern chipmunks *Tamias striatus* during the summer and fall. *Canadian Journal of Zoology* 94, 685–695.

Lee, S., Han, K.-H., Nakamura, Y., Kawakami, S., Shimada, K., Hayakawa, T., Onoue, H. et Fukushima, M. (2013). Dietary L-Cysteine improves the antioxidative potential and lipid metabolism in rats fed a normal diet. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 77, 1430–1434.

Lello, E., et de Rosis, A. M. B. (2003). Inflammatory reaction to the human bot-fly, *Dermatobia hominis*, in infested and reinfested mice. *Medical and Veterinary Entomology* 17, 55–60.

Levesque, D. L., et Tattersall, G. J. (2010). Seasonal torpor and normothermic energy metabolism in the eastern chipmunk (*Tamias striatus*). *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 180, 279–292.

Li, C., Xu, B., Wang, Y., Yang, Z., et Yang, W. (2014). Protein content in larval diet affects adult longevity and antioxidant gene expression in honey bee workers. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 151, 19–26.

Lochmiller, R. L., et Deerenberg, C. (2000). Trade-offs in evolutionary immunology: just what is the cost of immunity? *Oikos* 88, 87–98.

López-Arrabé, J., Cantarero, A., Pérez-rodríguez, L., Palma, A., et Moreno, J. (2016). Oxidative stress in early life: associations with sex, rearing conditions, and parental physiological traits in nestling Pied Flycatchers. *Physiological and Biochemical Zoology* 89, 83–92.

López-Martínez, G., et Hahn, D. A. (2012). Short-term anoxic conditioning hormesis boosts antioxidant defenses, lowers oxidative damage following irradiation and enhances male sexual performance in the Caribbean fruit fly, *Anastrepha suspensa*. *The Journal of Experimental Biology* 215, 2150–2161.

Losdat, S., Helfenstein, F., Blount, J. D., Marri, V., Maronde, L., et Richner, H. (2012). Nestling erythrocyte resistance to oxidative stress predicts fledging success but not local recruitment in a wild bird. *Biology Letters* 9, 1–4.

Losdat, S., Helfenstein, F., Blount, J. D., et Richner, H. (2014). Resistance to oxidative stress shows low heritability and high common environmental variance in a wild bird. *Journal of Evolutionary Biology* 27, 1990–2000.

- Marasco, V., Boner, W., Heidinger, B., Griffiths, K., et Monaghan, P. (2015). Repeated exposure to stressful conditions can have beneficial effects on survival. *Experimental Gerontology* *69*, 170–175.
- Margaritelis, N. V., Veskoukis, A. S., Paschalis, V., Vrabas, I. S., Dipla, K., Zafeiridis, A., Kyparos A., et Nikolaidis, M. G. (2015). Blood reflects tissue oxidative stress: a systematic review. *Biomarkers* *20*, 97–108.
- Marshall, H. H., Vitikainen, E. I. K., Mwanguhya, F., Businge, R., Kyabulima, S., Hares, M. C., Inzani, E., Kalema-Zikusoka, G., Mwesige, K., Nichols, H. J., *et al.* (2017). Lifetime fitness consequences of early-life ecological hardship in a wild mammal population. *Ecology and Evolution* *7*, 1712–1724.
- Martin, J. G. A., Nussey, D. H., Wilson, A. J., et Réale, D. (2011). Measuring individual differences in reaction norms in field and experimental studies: a power analysis of random regression models. *Methods in Ecology and Evolution* *2*, 362–374.
- Matrková, J., et Remeš, V. (2014). Vitamin E improves growth of collared flycatcher *Ficedula albicollis* young: a supplementation experiment. *Journal of Avian Biology* *45*, 475–483.
- McInerney, E. P., Byrne, P. G., et Silla, A. J. (2017). The effect of dietary antioxidants and exercise training on the escape performance of Southern corroboree frogs. *Behavioural Processes* *144*, 46–50.
- McKinney, T. D., et Christian, J. J. (1970). Incidence and effects of botfly parasitism in the Eastern chipmunk. *Journal of Wildlife Diseases* *6*, 140–143.
- Messina, S., Eens, M., Casasole, G., AbdElgawad, H., Asard, H., Pinxten, R., et Costantini, D. (2017). Experimental inhibition of a key cellular antioxidant affects vocal communication. *Functional Ecology* *31*, 1101–1110.
- Metcalf, N. B., et Alonso-Álvarez, C. (2010). Oxidative stress as a life-history constraint: the role of reactive oxygen species in shaping phenotypes from conception to death. *Functional Ecology* *24*, 984–996.
- Metcalf, N. B., et Monaghan, P. (2013). Does reproduction cause oxidative stress? An open question. *Trends in Ecology et Evolution* *28*, 347–350.
- Monaghan, P., Metcalf, N. B., et Torres, R. (2009). Oxidative stress as a mediator of life history trade-offs: mechanisms, measurements and interpretation. *Ecology Letters* *12*, 75–92.
- Montiglio, P.-O., Garant, D., Bergeron, P., Messier, G. D., et Réale, D. (2014). Pulsed resources and the coupling between life-history strategies and exploration patterns in eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Journal of Animal Ecology* *83*, 720–728.

- Montilla, S. I. R., Johnson, T. P., Pearce, S. C., Gardan-salmon, D., Gabler, N. K., Ross, J. W., Rhoads, J. W., Baumgard, L. H., Lonergan, S. M., et Selsby, J. T. (2014). Heat stress causes oxidative stress but not inflammatory signaling in porcine skeletal muscle. *Temperature* 1, 42–50.
- Montoya, B., Valverde, M., Rojas, E., et Torres, R. (2016). Oxidative stress during courtship affects male and female reproductive effort differentially in a wild bird with biparental care. *The Journal of Experimental Biology* 219, 3915–3926.
- Mougeot, F., Martínez-Padilla, J., Webster, L. M. I., Blount, J. D., Pérez-Rodríguez, L., et Piertney, S. B. (2009). Honest sexual signalling mediated by parasite and testosterone effects on oxidative balance. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276, 1093–1100.
- Munro, D., Thomas, D. W., et Humphries, M. M. (2005). Torpor patterns of hibernating eastern chipmunks *Tamias striatus* vary in response to the size and fatty acid. *Journal of Animal Ecology* 74, 692–700.
- Munro, D., Thomas, D. W., et Humphries, M. M. (2008). Extreme suppression of aboveground activity by a food-storing hibernator, the eastern chipmunk (*Tamias striatus*). *Canadian Journal of Zoology* 86, 364–370.
- Niveditha, S., Deepashree, S., Ramesh, S. R., et Shivanandappa, T. (2017). Sex differences in oxidative stress resistance in relation to longevity in *Drosophila melanogaster*. *Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology* 187, 899–909.
- Noguera, J. C., Lores, M., Alonso-Álvarez, C., et Velando, A. (2011). Thrifty development: early-life diet restriction reduces oxidative damage during later growth. *Functional Ecology* 25, 1144–1153.
- Norte, A. C., Sheldon, B. C., Sousa, J. P., et Ramos, J. A. (2009). Environmental and genetic variation in body condition and blood profile of great tit *Parus major* nestlings. *Journal of Avian Biology* 40, 157–165.
- Nussey, D. H., Pemberton, J. M., Pilkington, J. G., et Blount, J. D. (2009). Life history correlates of oxidative damage in a free-living mammal population. *Functional Ecology* 23, 809–817.
- Ołdakowski, Ł., et Taylor, J. R. E. (2018). Oxidative damage and antioxidant defense are assay and tissue-dependent both in captive and wild-caught bank voles (*Myodes glareolus*) before and after reproduction. *Ecology and Evolution* 1–10.
- Ołdakowski, Ł., Wasiluk, A., Sadowska, E. T., Koteja, P., et Taylor, J. R. E. (2015). Reproduction is not costly in terms of oxidative stress. *The Journal of Experimental Biology* 218, 3901–3910.

Olsson, M., Wilson, M., Uller, T., Mott, B., Isaksson, C., Healey, M., et Wanger, T. (2008). Free radicals run in lizard families. *Biology Letters* 4, 186–188.

Orledge, J. M., Blount, J. D., Hoodless, A. N., Pike, T. W., et Royle, N. J. (2012). Synergistic effects of supplementation of dietary antioxidants during growth on adult phenotype in ring-necked pheasants, *Phasianus colchicus*. *Functional Ecology* 26, 254–264.

Pamplona, R., et Barja, G. (2007). Highly resistant macromolecular components and low rate of generation of endogenous damage: two key traits of longevity. *Ageing Research Reviews* 6, 189–210.

Pamplona, R., et Costantini, D. (2011). Molecular and structural antioxidant defenses against oxidative stress in animals. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 301, R843–R863.

Parolini, M., Possenti, C. D., Karadas, F., Colombo, G., Romano, M., Caprioli, M., Dalle-Donne, I., Rubolini, D., Milzani, A. et Saino, N. (2018). Yolk vitamin E positively affects prenatal growth but not oxidative status in yellow-legged gull embryos. *Current Zoology* 64, 285–292.

Peek, C. B., Affinati, A. H., Ramsey, K. M., Kuo, H. Y., Yu, W., Sena, L. A., Ilkayeva, O., Marcheva, B., Kobayashi, Y., Omura, C., et al. (2013). Circadian clock NAD⁺ cycle drives mitochondrial oxidative metabolism in mice. *Science* 342, 1243417.

Pinheiro, L. C., et Oliveira, G. T. (2016). Oxidative status profile in different tissues of *Parastacus brasiliensis promatensis* (Crustacea, Decapoda, Parastacidae) over a seasonal cycle. *Journal of Experimental Zoology Part A: Ecological Genetics and Physiology* 325, 318–328.

Powers, S. K., et Jackson, M. J. (2008). Exercise-induced oxidative stress: cellular mechanisms and impact on muscle force production. *Physiological Reviews* 88, 1243–1276.

Raja-aho, S., Kanerva, M., Eeva, T., Lehtikoinen, E., Suorsa, P., Gao, K., Vosloo, D. et Nikinmaa, M. (2012). Seasonal variation in the regulation of redox state and some biotransformation enzyme activities in the Barn Swallow (*Hirundo rustica* L.). *Physiological and Biochemical Zoology* 85, 148–158.

Réale, D., Garant, D., Humphries, M. M., Bergeron, P., Careau, V., et Montiglio, P.-O. (2010). Personality and the emergence of the pace-of-life syndrome concept at the population level. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 365, 4051–4063.

Richter, Y., et Fischer, B. (2006). Nucleotides and inorganic phosphates as potential antioxidants. *Journal of Biological Inorganic Chemistry* 11, 1063–1074.

Roche, M., Rondeau, P., Singh, N. R., Tarnus, E., et Bourdon, E. (2008). The antioxidant properties of serum albumin. *FEBS Letters* 582, 1783–1787.

Romero-Haro, A. Á., et Alonso-Álvarez, C. (2015). The level of an intracellular antioxidant during development determines the adult phenotype in a bird species: a potential organizer role for glutathione. *The American Naturalist* 185, 390–405.

Romero-Haro, A. Á., Sorci, G., et Alonso-Álvarez, C. (2016). The oxidative cost of reproduction depends on early development oxidative stress and sex in a bird species. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 283, 1–9.

Ronget, V., Gaillard, J. M., Coulson, T., Garratt, M., Gueyffier, F., Lega, J. C., et Lemaître, J. F. (2018). Causes and consequences of variation in offspring body mass: meta-analyses in birds and mammals. *Biological Reviews* 93, 1–27.

Ruuskanen, S., Morosinotto, C., Thomson, R. L., Ratnayake, C. P., et Korpimäki, E. (2017). Food supplementation, but not predation risk, alters female antioxidant status during breeding. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 71, 1–10.

Salin, K., Auer, S. K., Rudolf, A. M., Anderson, G. J., Cairns, A. G., Mullen, W., Hartley R. C., Selman C. et Metcalfe, N. B. (2015). Individuals with higher metabolic rates have lower levels of reactive oxygen species in vivo. *Biology Letters* 11, 1–4.

Samanta, L., et Paital, B. (2016). Effects of seasonal variation on oxidative stress physiology in natural population of toad *Bufo melanostictus*; clues for analysis of environmental pollution. *Environmental Science and Pollution Research* 23, 22819–22831.

Selman, C., Blount, J. D., Nussey, D. H., et Speakman, J. R. (2012). Oxidative damage, ageing, and life-history evolution: where now? *Trends in Ecology and Evolution* 27, 570–577.

Selman, C., McLaren, J. S., Collins, A. R., Duthie, G. G., et Speakman, J. R. (2002). Antioxidant enzyme activities, lipid peroxidation, and DNA oxidative damage: the effects of short-term voluntary wheel running. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 401, 255–261.

Selman, C., McLaren, J. S., Meyer, C., Duncan, J. S., Redman, P., Collins, A. R., Duthie, G. G. et Speakman, J. R. (2006). Life-long vitamin C supplementation in combination with cold exposure does not affect oxidative damage or lifespan in mice, but decreases expression of antioxidant protection genes. *Mechanisms of Ageing and Development* 127, 897–904.

Sin-Yeon, K., Noguera, J. C., Morales, J., et Velando, A. (2010). Heritability of resistance to oxidative stress in early life. *Journal of Evolutionary Biology* 23, 769–775.

Sin-Yeon, K., Noguera, J. C., Morales, J., et Velando, A. (2011). Quantitative genetic evidence for trade-off between growth and resistance to oxidative stress in a wild bird. *Evolutionary Ecology* 25, 461–472.

Siutz, C., Valent, M., Ammann, V., Niebauer, A., et Millesi, E. (2018). Sex-specific effects of food supplementation on hibernation performance and reproductive timing in free-ranging common hamsters. *Scientific Reports* 8, 1–10.

Skip, M. M., et McWilliams, S. R. (2016). Oxidative balance in birds: an atoms-to-organisms-to-ecology primer for ornithologists. *Journal of Field Ornithology* 87, 1–20.

Smith, S. M., Nager, R. G., et Costantini, D. (2016). Meta-analysis indicates that oxidative stress is both a constraint on and a cost of growth. *Ecology and Evolution* 6, 2833–2842.

Snyder, D. P. (1982). *Tamias striatus*. *American Society of Mammalogists* 168, 1–8.

Sorci, G., et Faivre, B. (2009). Inflammation and oxidative stress in vertebrate host – parasite systems. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364, 71–83.

Speakman, J. R., Blount, J. D., Bronikowski, A. M., Buffenstein, R., Isaksson, C., Kirkwood, T. B. L., Monaghan, P., Ozanne, S. E., Beaulieu, M., Briga, M., *et al.* (2015). Oxidative stress and life histories: unresolved issues and current needs. *Ecology and Evolution* 5, 5745–5757.

Speakman, J. R., et Garratt, M. (2014). Oxidative stress as a cost of reproduction: beyond the simplistic trade-off model. *BioEssays* 36, 93–106.

Speakman, J. R., et Selman, C. (2011). The free-radical damage theory: Accumulating evidence against a simple link of oxidative stress to ageing and lifespan. *BioEssays* 33, 255–259.

Speakman, J. R., Talbot, D. A., Selman, C., Snart, S., McLaren, J. S., Redman, P., Krol, E., Jackson, D. M., Johnson, M. S. et Brand, M. D. (2004). Uncoupled and surviving: individual mice with high metabolism have greater mitochondrial uncoupling and live longer. *Aging Cell* 3, 87–95.

Stearns, S. C. (1989). Trade-offs in life-history evolution. *Functional Ecology* 3, 259–268.

Stearns, S. C. (1992). *The evolution of life histories*. New York: Oxford University Press.

St-Hilaire, É., Réale, D., et Garant, D. (2017). Determinants, selection and heritability of docility in wild eastern chipmunks (*Tamias striatus*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 71, 71:88.

Stier, A., Delestrade, A., Zahn, S., Arrivé, M., Criscuolo, F., et Massemin-Challet, S. (2014). Elevation impacts the balance between growth and oxidative stress in coal tits. *Oecologia* 175, 791–800.

Stier, A., Reichert, S., Massemin, S., Bize, P., et Criscuolo, F. (2012). Constraint and cost of oxidative stress on reproduction: correlative evidence in laboratory mice and review of the literature. *Frontiers in Zoology* 9, 1–11.

Swindle, E. J., et Metcalfe, D. D. (2007). The role of reactive oxygen species and nitric oxide in mast cell-dependent inflammatory processes. *Immunological Reviews* 217, 186–205.

Thomson, R. L., Tomás, G., Forsman, J. T., Broggi, J., et Mönkkönen, M. (2010). Predator proximity as a stressor in breeding flycatchers: mass loss, stress protein induction, and elevated provisioning. *Ecology* 91, 1832–1840.

Tobler, M., Healey, M., et Wilson, M. (2011). Basal superoxide as a sex-specific immune constraint. *Biology Letters* 9, 906–908.

Vaanholt, L. M., Milne, A., Zheng, Y., Hambly, C., Mitchell, S. E., Valencak, T. G., Allison, D. B. et Speakman, J. R. (2016). Oxidative costs of reproduction: oxidative stress in mice fed standard and low antioxidant diets. *Physiology et Behavior* 154, 1–7.

Vaanholt, L. M., Speakman, J. R., Garland Jr, T., Lobley, G. E., et Visser, G. H. (2008). Protein synthesis and antioxidant capacity in aging mice: effects of long-term voluntary exercise. *Physiological and Biochemical Zoology* 81, 148–157.

van de Crommenacker, J., Hammers, M., van der Woude, J., Louter, M., Santema, P., Richardson, D. S., et Komdeur, J. (2017). Oxidative status and fitness components in the Seychelles warbler. *Functional Ecology* 31, 1210–1219.

van de Crommenacker, J., Komdeur, J., Burke, T., et Richardson, D. S. (2011). Spatio-temporal variation in territory quality and oxidative status: a natural experiment in the Seychelles warbler (*Acrocephalus sechellensis*). *Journal of Animal Ecology* 80, 668–680.

Vaugoyeau, M., Decenciere, B., Perret, S., Karadas, F., Meylan, S., et Biard, C. (2015). Is oxidative status influenced by dietary carotenoid and physical activity after moult in the great tit (*Parus major*)? *Journal of Experimental Biology* 218, 2106–2115.

Veskoukis, A. S., Nikolaidis, M. G., Kyparos, A., et Kouretas, D. (2009). Blood reflects tissue oxidative stress depending on biomarker and tissue studied. *Free Radical Biology and Medicine* 47, 1371–1374.

Vézina, F., Love, O. P., Lessard, M., et Williams, T. D. (2009). Shifts in metabolic demands in growing altricial nestlings illustrate context-specific relationships between basal metabolic rate and body composition. *Physiological and Biochemical Zoology* 82, 248–257.

Viblanc, V. A., Schull, Q., Roth, J. D., Rabdeau, J., Saraux, C., Uhlrich, P., Criscuolo, F. et Dobson, F. S. (2018). Maternal oxidative stress and reproduction: testing the constraint, cost and shielding hypotheses in a wild mammal. *Functional Ecology* 32, 722–735.

Vucetic, M., Stancic, A., Otasevic, V., Jankovic, A., Korac, A., Markelic, M., Velickovic, K., Golic, I., Buzadzic, B., Storey, K. B., et al. (2013). The impact of cold acclimation and hibernation on antioxidant defenses in the ground squirrel (*Spermophilus citellus*): an update. *Free Radical Biology and Medicine* 65, 916–924.

Wang, Y. J., Chien, Y. H., et Pan, C.-H. (2006). Effects of dietary supplementation of carotenoids on survival, growth, pigmentation, and antioxidant capacity of characins, *Hyphessobrycon callistus*. *Aquaculture* 261, 641–648.

Wickler, S. J., Hoyt, D. F., et van Breukelen, F. (1991). Disuse atrophy in the hibernating golden-mantled ground squirrel, *Spermophilus lateralis*. *American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 261, R1214–R1217.

Wiersma, P., Salomons, H. M., et Verhulst, S. (2005). Metabolic adjustments to increasing foraging costs of starlings in a closed economy. *The Journal of Experimental Biology* 208, 4099–4108.

Xu, Y., Yang, D., Speakman, J. R., et Wang, D. (2014). Oxidative stress in response to natural and experimentally elevated reproductive effort is tissue dependent. *Functional Ecology* 28, 402–410.

Yahner, R. H. (1977). Brief note activity lull of *Tamias striatus* during the summer in Southeast Ohio. *Ohio Journal of Science* 77, 143–145.

Zera, A. J., et Harshman, L. G. (2001). The physiology of life history trade-offs in animals. *Annual Reviews* 32, 95–126.

Zhao, X. Y., Zhang, J. Y., Cao, J., et Zhao, Z. J. (2015). Oxidative damage does not occur in striped hamsters raising natural and experimentally increased litter size. *PLoS ONE* 10, 1–15.

