

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**Effets des xénoestrogènes sur le développement testiculaire chez le Queue à Tache
Noire (*Notropis hudsonius*)**

Par

Valérie Paquet

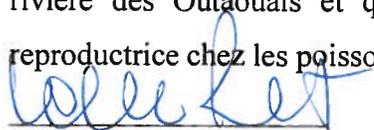
Mémoire présenté
Pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)
Expérimentales de la Santé

Jury d'évaluation :

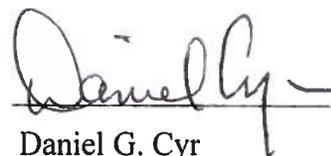
Examineur externe :	Dr Céline Audet Institut des sciences de la mer de Rimouski Université du Québec à Rimouski
Examineur interne :	Dr Patrick J. Devine INRS-Institut Armand-Frappier
Directeur de recherche :	Dr Daniel G. Cyr INRS-Institut Armand-Frappier

RÉSUMÉ

Peu d'informations existent quant aux conséquences physiologiques associées à une exposition aux xenoestrogènes dans un environnement naturel. L'objectif de cette étude était de déterminer les effets des contaminants oestrogéniques sur le système reproducteur mâle du Queue à tache noire (*Notropis hudsonius*). Les niveaux hépatiques d'ARNm de la vitellogénine (VTG) chez les Queues à taches noires immatures indiquent une importante contamination oestrogénique qui s'étend sur environ 50 Km en amont et en aval de la décharge municipale de la Communauté Urbaine de Montréal (CUM). Cette contamination oestrogénique est associée à un ralentissement de la progression de la spermatogenèse chez les Queues à tache noire matures. De plus, des analyses histologiques des testicules ont révélé que plus d'un tiers des poissons capturés dans les sites où la contamination oestrogénique était la plus importante démontrent de l'intersex, une condition représentée par des follicules ovariens qui se développent dans les testicules. Afin de déterminer la provenance de cette contamination en amont de la décharge municipale de la CUM, des études ont été effectuées dans la rivière des Outaouais, un tributaires majeur du fleuve St-Laurent, à l'ouest de l'île de Montréal. Les résultats indiquent une importante contamination oestrogénique en amont et en aval des villes de Gatineau/Ottawa. De plus, des analyses histologiques sur les gonades mâles révèlent une haute incidence d'intersex, et ceci, en amont et en aval de Gatineau/Ottawa. Finalement, afin de vérifier l'incidence d'inversion sexuelle causée par la contamination en xénoestrogènes, un marqueur du chromosome Y du Queue à tache noire devait être identifié. La présence ainsi que la non-spécificité au sexe génétique mâle du Queue à tache noire des gènes SRY et ZFY ont été démontrées. Par la technique des Polymorphismes de Longueurs de Fragments Amplifiés (AFLP), 5 marqueurs spécifiques au sexe mâle du Queue à tache noire ont été identifiés. Ces résultats démontrent qu'il existe une contamination oestrogénique significative dans le fleuve St-Laurent, que la contamination en amont de la décharge municipale provient au moins en partie de la rivière des Outaouais et que celle-ci est associée à des altérations de la fonction reproductrice chez les poissons mâles.



Valérie Paquet



Daniel G. Cyr

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement mon directeur de recherche, le Dr Daniel Cyr, pour m'avoir accueillie dans son laboratoire, prodigué de précieux conseils et permis de participer aux séances d'échantillonnages éreintantes mais palpitantes ainsi qu'à de nombreux congrès scientifiques.

Merci à ma famille (Marc-André, Monic et Andrée-Anne), que je vois trop rarement, de m'encourager et d'être toujours présente quand j'ai besoin d'elle. Remerciement spécial à toi maman pour ta patience et ta connaissance hors paire de l'écriture.

Simplement merci à Martin, mon conjoint, de bien vouloir partager la vie d'une étudiante stressée, ton calme, ta bonté et ton positivisme représentent beaucoup pour moi.

Finalement, merci à mes amis (es), du lab et d'ailleurs, de me permettre de me confier, de m'amuser et de vivre des expériences exceptionnelles. Merci Julie pour ta connaissance des secrets de la science et tes conseils judicieux.

TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	ii
REMERCIEMENTS.....	iii
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	viii
LISTES DES ABRÉVIATIONS	x
INTRODUCTION	1
<u>SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE</u>	
CHAPITRE 1 : <u>LES MODULATEURS ENDOCRINIENS</u>	5
1.1 Le système endocrinien	5
1.2 Les modulateurs endocriniens	5
1.3 Évidences historiques de modulation endocrinienne	6
1.3.1 Effets sur la faune	7
1.3.1.1 Silent Spring	7
1.3.1.2 Effets sur les oiseaux	8
1.3.1.3 Imposex chez les mollusques	9
1.3.1.4 Les phoques de la mer Baltique	10
1.3.1.5 Les alligators du lac Apopka	12
1.3.1.6 Les xénoestrogènes induisent la synthèse hépatique de vitellogénine chez les poissons mâles	13
1.3.2 Effets chez les humains	15
1.3.2.1 Les observations	15
1.3.2.1.1 Exposition <i>in utero</i> aux diéthylstilbestrol (DES)	15
1.3.2.2 Les tendances	16
1.3.2.2.1 Le déclin spermatique	16
1.3.2.2.2 L'augmentation de la fréquence de cryptorchidie et d'hypospadias	17
1.3.2.2.3 L'augmentation de la fréquence de certains cancers	18
1.4 Liste des substances perturbatrices du système endocrinien	21

CHAPITRE 2 : <u>LES CONTAMINANTS OESTROGÉNIQUES ET LE MILIEU AQUATIQUE</u>	25
2.1 Les contaminants oestrogéniques dans le milieu aquatique	25
2.1.1 Les effluents municipaux	26
2.1.2 Les effluents provenant de l'agriculture	27
2.1.3 Les effluents provenant de l'industrie du papier	29
2.2 Modes d'action des xénoestrogènes	30
2.2.1 Interaction directe par l'intermédiaire d'un récepteur	30
2.2.1.1 Activité oestrogénique via le récepteur des oestrogènes	32
2.2.1.2 Activité anti-androgénique via le récepteur des androgènes (RA)	35
2.2.1.3 Activité antioestrogénique et liaison au récepteur Ah (Aryl Hydrocarbone) (AhR)	36
2.2.1.4 Action non génomique via des récepteurs stéroïdiens membranaires	37
2.2.2 Interaction indirecte avec le système endocrinien	39
2.2.2.1 Altération de la synthèse ou du métabolisme de l'œstrogène	39
2.2.2.1.1 Les enzymes de biosynthèses des stéroïdes	39
2.2.2.1.2 Les conjugaisons aux glucuronides et sulfates	42
2.2.2.2 Variation des niveaux de récepteurs aux oestrogènes (RE)	43
2.2.2.3 Liaison aux protéines de transport et biodisponibilité des stéroïdes ...	44
2.2.2.4 Addition et synergisme entre xénoestrogènes	45
CHAPITRE 3 : <u>PRINCIPAUX EFFETS D'UNE EXPOSITION AUX XÉNOESTROGÈNES SUR LE SYSTÈME REPRODUCTEUR DU POISSON</u>	48
3.1 Endocrinologie reproductive du poisson	48
3.2 Les effets des xénoestrogènes sur la reproduction	53
3.2.1 Les effets des xénoestrogènes sur l'axe hypothalamo-hypophyse gonades	53
3.2.2 La vitellogénine et les protéines chorioniques	54
3.2.2.1 Les effets des xénoestrogènes sur la synthèse des protéines de l'œuf chez les mâles	55
3.2.3 Les effets des xénoestrogènes sur les gonades	56
3.2.3.1 Mâles	57
3.2.3.2 Femelles	61
3.2.4 Les effets des xénoestrogènes sur le comportement reproducteur	62

CHAPITRE 4 : <u>LE FLEUVE ST-LAURENT ET LE QUEUE À TACHE NOIRE</u>	64
4.1 Le fleuve St-Laurent	64
4.2 Le Queue à tache noire	65
<u>SECTION 2 : LES ARTICLES</u>	67
Conséquences of Xenoestrogens Exposure on Male Reproductive Function in Spottail Shiners (<i>Notropis Hudsonius</i>)	69
Résumé français	69
Abstract	69
Introduction	70
Materials and methods	71
Results	72
Discussion	76
References	78
Estrogenic Contamination of the Ottawa River and the Effects of this Contamination on Spottail Shiners (<i>Notropis Hudsonius</i>)	80
Résumé français	80
Abstract	82
Introduction	83
Materials and methods	85
Results	87
Discussion	88
References	91
Figures	94
Identification of a Y Chromosome Marker in the Spottail Shiners (<i>Notropis Hudsonius</i>) Using Amplified Fragment Length Polymorphism	98
Résumé français	98
Abstract	100
Introduction	101
Materials and methods	103
Results	106

Discussion.....	107
References.....	111
Figures.....	114
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	119
REFERENCES.....	124

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

SECTION 1 : REVUE DE LITTÉRATURE

Tableau 1 : Substances perturbatrices du système endocrinien	21
Figure 1 : Structures chimiques des alkylphénols, du Bisphénol A, du <i>o,p'</i> -DDT et du 17β -estradiol.	26
Figure 2 : Représentation schématique des différentes régions des récepteurs nucléaires.	32
Figure 3 : Représentation schématique des mécanismes de stimulation et d'inhibition qui régulent l'endocrinologie reproductrice chez les téléostéens	51
Figure 4 : Représentation schématique simplifiée de la stimulation de la production de vitellogénine et des protéines chorioniques hépatiques.	52

SECTION 2 : LES ARTICLES

Consequences of Xenoestrogens Exposure on Male Reproductive Function in Spottail Shiners (*Notropis hudsonius*)

Figure 1 : Schematic map depicting the location of sampling sites along the St. Lawrence River in the vicinity of the island of Montreal.....	71
Figure 2 : RT-PCR of hepatic VTG in a mature vitellogenic female spottail shiners and rainbow trout.....	73
Figure 3 : Linear PCR amplification of spottail shiner VTG (a) and 28S rRNA (b).....	73
Figure 4 : Hepatic VTG mRNA levels in immature spottail shiners captured at different sites along the St. Lawrence River during June 1999 (a) and 2000 (b)	74
Figure 5 : Photomicrographs of four representative stages of spermatogenesis from spottail shiner testes	74
Figure 6 : Stages of spermatogenesis in spottail shiner testes from different sites along the St. Lawrence River.....	74
Figure 7 : Sperm concentration in spottail shiners captured at Îles de la Paix and Îlet Vert	75
Figure 8 : Mean percentage sperm motility from spottail shiners captured at Îles de la Paix and Îlet Vert	75

Figure 9: Mean percentage of (a) rapid, (b) medium, (c) slow, and (d) static spermatozoal cells from spottail shiners captured at Îles de la Paix and Îlet Vert 76

Figure 10: Sperm motility parameters from spottail shiners captured at Îles de la Paix and Îlet Vert. Mean (a) path velocity, VAP, (b) progressive velocity, VSL, (c) curvilinear velocity, VCL, (d) beat frequency, BCF 76

Figure 11: Sperm motility parameters from spottail shiners captured at Îles de la Paix and Îlet Vert. Mean (a) Straightness, (b) linearity 76

Figure 12: Intersex in male spottail shiners captured at different sites along the St. Lawrence River 76

Estrogenic Contamination of the Ottawa River and the Effects of this Contamination on Spottail Shiners (*Notropis hudsonius*)

Figure 1: Sampling sites in the Ottawa River 94

Figure 2: VTG mRNA levels in immature spottail shiners captured at different sites along the Ottawa River in a) 2002 and b) 2003 95

Figure 3: Photomicrograph at the light microscope level of an intersex spottail shiner testis in the Ottawa River containing testicular tissues and atretic oocyte 96

Figure 4: Percent of ovotestis in male spottail shiners from different sites along the Ottawa River captured in a) 2002 and b) 2003 97

Identification of a Y Chromosome Marker in the Spottail Shiners (*Notropis hudsonius*) Using Amplified Fragment Length Polymorphism

Figure 1: Diagrammatic presentation of the AFLP technique 114

Figure 2 : PCR amplification of SRY and two regions of the ZFY (long and short) genes in female (left) and male (right) spottail shiners 115

Figure 3: Typical AFLP profiles generated by 3 females (left) and 3 males (right) spottail shiners using primer combinations E-AGG/M-CAC 116

Figure 4: Nucleotide sequences of the 5 sex-specific markers identified with the AFLP technique 117

Figure 5: Southern blot of male-specific AFLP markers 5.1/2 (right) and 5.2/3 (left) hybridized to male and female genomic DNA digested with *EcoRI* and *MseI* restriction enzymes 118

LISTES DES ABRÉVIATIONS

2,4-D	2,4-Dichlorophénoxy acétique acide
20 β -S	17,20 β ,21-trihydroxy-4-pregn-3-one
2,4,5-T	2,4,5-Trichlorophénoxy acétique acide
ABP	Globuline liant les androgènes-Androgen Binding Globulin
ADN	Acide désoxyribonucléique
AF-1	Fonction d'activation constitutive des récepteurs nucléaires
AF-2	Fonction d'activation dépendante du ligand des récepteurs nucléaires
AFLP	Polymorphismes de longueurs de fragments amplifiés-Amplified Fragments Length Polymorphisms
Ah-	Aryle hydrocarbure
AhR	Récepteur d'Aryle hydrocarbure
AIP	Immunophiline interagissant avec AhR-Ahr-interacting protein
AMP	Adénosine mono-phosphate
ARA9	Immunophilines activant AhR -AhR activated
ARN	Acide ribonucléique
Arnt	Translocateur nucléaire d'AhR-AhR nuclear translocator
BDMP	Birth Defects Monitoring Program
BPC	Biphényles Polychlorés
BT-20	Lignée cancéreuse mammaire humaine indépendante d'oestradiol
b-HLH-PAS	Basic Helix-Loup-Helix-Per-AhR-Sim
CBG	Globuline liant les Corticostéroïdes-Corticosteroid Binding Globulin
CBP/p300	CREB-Binding protein
CHO	Lignée cellulaire d'ovaires de Hamsters-Chinese Hamster Ovary
CSTEE	Scientific Committee on Toxicology, Ecotoxicity, and Environment
CUM	Communauté Urbaine de Montréal
CYP1A1	Cytochrome P450 1A1
CYP1A2	Cytochrome P450 1A2
CYP11B1	Cytochrome P450 11B1
CYP17	Cytochrome P450 17 α -hydroxylase
CYP19	Cytochrome P450 aromatasase
DDD	Dichloro-Diphényl-Dichloroéthane
DDE	Dichloro-Diphényl-Dichloroéthylène
DDT	Dichloro-Diphényl-Trichloréthane
DES	Diéthylstilbestrol
DHT	Dihydrotestostérone
DRE	Élément de réponse des dioxines-Dioxin Response Element
E1	Oestrone
E2	Oestradiol
EDC	Modulateurs endocriniens-Endocrine Disrupting Chemicals
EGF	Facteur de croissance épidermique-Epidermal Growth Factor
ERE	Élément de réponse des oestrogènes-Estrogen Response Element
EROD	Éthoxyrésorufine O-dééthylase
E-Screen	Dépistage d'oestrogène -Estrogen Screen

Gn-RH	Gonadolibérine-Gonadotropin Releasing Hormone
GtHI	Gonadotrophine I, homologue de FSH
GtHII	Gonadotrophine II, homologue de LH
HAT	Acétylation des histones
HCH	Hexachlorohexane
HDAC	Déacétylation des histones
HOX	Homeobox
HRE	Élément de réponse hormonale-Hormone Response Element
HSD	Hydroxystéroïde déhydrogénase
Hsp 90	Protéine de choc thermique 90-Heat Shock Protein 90
iDRE	DRE inhibiteur
IGF-1	Facteur de croissance apparenté à l'insuline-1-Insulin Growth Factor-1
Insl3	Facteur de type insuline-3-Insulin-like factor-3
LBD	Domaine de liaison du ligand-Ligand Binding Domain
LDL	Lipoprotéine de faible densité-Low density lipoprotein
MA-10	Lignée cancéreuse de cellules de Leydig de souris
MAP	Mitogen Activated Protein
MCF-7	Lignée cancéreuse mammaire humaine
N-Cor	Co-répresseur des récepteurs nucléaires-Nuclear receptor co-repressor
<i>o,p</i>	Ortho, para
P450 _{ssc}	Cytochrome P450 side chain cleavage
<i>p,p</i>	Para, para
PAPS	3'-Phosphoadénosine-5'-phosphosulfonate
RA	Récepteur des androgènes-Androgen receptor
RAR	Récepteur de l'acide rétinoïque-Retinoic acid receptor
RE	Récepteur des estrogènes-Estrogen receptor
RG	Récepteur des glucocorticoïdes-Glucocorticoid receptor
RM	Récepteur des minéralocorticoïdes-Mineralocorticoid receptor
RP	Récepteur de la progesterone-Progesterone receptor
RT	Récepteur des hormones thyroïdiennes-Thyroid receptor
RVD-	Récepteur de la Vitamine D-Vitamine D receptor
SHBG	Globuline liant les stéroïdes sexuels-Sex Hormone Binding Globulin
SMRT	Co-répresseur des RAR et RT-Silencing Mediator for Retinoic acid and Thyroid receptors
SNC	Système Nerveux Centrale
ST	Sulfotransférase
StAR	Protéine régulatrice du transport intramitochondrial du cholestérol-Steroidogenesis Acute Regulatory protein
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
T47D	Lignée cancéreuse mammaire humaine dépendante de estradiol
TBT	Tributylétain
TCDD	Tétrachlorodibenzodioxine
TCDF	Tétrachlorodibenzofuranne
TGF- α	Facteur transformant-Tumor Growth Factor α
TRH	Protiréline-Thyrotropin-releasing hormone

TSH	Thyrotropine-Thyroid Stimulating Hormone
UDP	Uridine diphospho
USGS	United-States Geological Survey
VTG	Vitellogénine
Y1	Lignée de cellules adrénocorticales de souris
ZRP	Protéines chorioniques : Zona radiata et Zona pellucida

INTRODUCTION

Il est maintenant reconnu qu'une grande variété de substances présentes dans l'environnement possède le pouvoir d'altérer le système endocrinien. En effet, une multitude de contaminants environnementaux démontre une capacité à moduler ou à mimer l'action des hormones stéroïdiennes et ainsi, dans certains cas, à produire une réponse biologique similaire à celle produite par l'hormone endogène (Jobling *et al.*, 1998). Parmi ces contaminants, certains possèdent la capacité de mimer l'œstrogène; on les nomme xénoestrogènes. Les xénoestrogènes peuvent être de nature industrielle (alkylphénol, bisphénol A, phtalates, biphenyls polychlorés), provenir de l'emploi de pesticides (DDT, dieldrine, toxaphène, endosulfane) ou encore être d'origine naturelle telles que les hormones endogènes ou les phytoestrogènes (Colborn, vom Saal et Soto, 1993). Conséquemment, l'activité hormonale de certaines substances est maintenant reconnue comme un important mécanisme de toxicité.

Plusieurs xénoestrogènes, de par les décharges municipales et industrielles, sont susceptibles de se retrouver dans le milieu aquatique. En effet, pratiquement toutes les substances connues pour leur capacité à interagir avec le récepteur des oestrogènes (RE) ont été identifiées dans les effluents municipaux (Kime, 1995). De ce fait, on retrouve, chez plusieurs espèces de poissons exposés dans leur milieu naturel, les exemples les plus évidents de perturbations endocriniennes. Ces exemples incluent des niveaux élevés de la protéine déposée dans le vitellus, la Vitellogénine (VTG), chez les mâles (Arukwe *et al.*, 2000, Sumpter et Jobling, 1995), un retardement du développement testiculaire (Tyler, Jobling et Sumpter, 1998), la présence d'intersex (Jobling *et al.*, 2002a,b) et d'inversion sexuelle (mâle génétique qui possède un appareil reproducteur femelle) (Nagler *et al.*, 2001).

Le milieu aquatique d'intérêt dans cette étude est le fleuve St-Laurent, dans la région de Montréal. Celui-ci est susceptible de contenir des xénoestrogènes provenant de différentes sources incluant les effluents municipaux. En effet, la décharge municipale de la Communauté Urbaine de Montréal (CUM) rejette ses effluents dans le fleuve St-

Laurent à un point unique situé à l'extrémité Nord-est de l'île. De plus, l'étude de Sabik *et al.*, (2003) révèle la présence d'alkylphénols, des produits dérivés de surfactants et possédant une activité oestrogénique, aux alentours de l'île de Montréal, plus particulièrement en aval de la décharge municipale de la CUM.

Étant donné la présence d'une contamination en composés oestrogéniques, dans le fleuve St-Laurent, dans la région de Montréal et compte tenu du peu de données disponibles quant aux répercussions physiologiques de ces composés sur le système reproducteur mâle, l'objectif de mon étude était de **caractériser les effets d'une telle contamination sur le système reproducteur mâle chez le Queue à tache noire**. Afin d'éclaircir la provenance de la contamination présente en amont de la décharge municipale de la CUM, nous avons déterminé les niveaux de contamination dans différents sites d'échantillonnage dans la rivière des Outaouais, en amont et en aval des villes de Gatineau/Ottawa. De plus, nous avons effectué des études histologiques sur des testicules de Queues à tache noire capturés à différents sites dans le fleuve St-Laurent et la rivière des Outaouais. Aussi, nous avons identifié un marqueur spécifique du chromosome Y chez le Queue à tache noire. Cette séquence spécifique au sexe génétique mâle sera éventuellement employée afin de déterminer l'incidence d'inversion sexuelle suite à une exposition à une contamination oestrogénique.

Ce mémoire se divise en deux sections; la première est une revue de littérature portant sur les principales connaissances scientifiques sur le présent sujet. Cette section est subdivisée en quatre chapitres qui élaborent un élément distinct du sujet soit : les modulateurs endocriniens, les contaminants oestrogéniques dans le milieu aquatique, les principaux effets d'une exposition aux xénoestrogènes chez le poisson et finalement, une description de l'écosystème et de l'espèce étudiés. Le premier chapitre se veut une définition complète du terme modulateur endocrinien ainsi qu'une description des principales évidences historiques de modulation endocrinienne. Le deuxième chapitre traite de la susceptibilité du milieu aquatique à contenir différents contaminants oestrogéniques ainsi que des différents mécanismes d'action de ces contaminants. Au chapitre trois, il est question des principaux effets associés à une exposition aux

xenoestrogènes chez le poisson soit : des bio-marqueurs d'expositions aux contaminants oestrogéniques, ainsi que des conséquences associées à la capacité reproductrice. Le dernier chapitre est consacré à une description de fleuve St-Laurent ainsi qu'à définir le Queue à tache noire.

La seconde section de ce mémoire est consacrée à la présentation des articles découlant de ce travail. Le premier article : *Consequences of Xenooestrogen Exposure on Male Reproductive Function in Spottail Shiners (Notropis hudsonius)* publié dans la revue «Toxicological Sciences» démontre les niveaux de contamination oestrogénique aux alentours de la Communauté Urbaine de Montréal ainsi que les effets de cette contamination sur la concentration en spermatozoïdes, la spermatogenèse ainsi que sur l'apparence d'intersex chez le Queue à tache noire. Le second article : *Estrogenic Contamination of the Ottawa River and the Effects of this Contamination in Spottail shiners (Notropis hudsonius)* fait part des niveaux de contamination oestrogénique déterminés dans la rivière des Outaouais ainsi que des niveaux d'intersex observés dans différents sites d'échantillonnages en amont et en aval des villes de Gatineau/Ottawa chez le Queue à tache noire. Finalement, le troisième article, intitulé : *Identification of a Y chromosome marker in the Spottail shiner (Notropis hudsonius) using Amplified Fragment Length Polymorphism* traite de la méthode employée pour l'identification d'un marqueur spécifique au chromosome Y chez le Queue à tache noire.

Finalement, une discussion ainsi qu'une conclusion générale portant sur l'ensemble des résultats ainsi que l'apport de ceux-ci à la communauté scientifique sont formulées.

SECTION 1 :

REVUE DE LITTÉRATURE

CHAPITRE 1

LES MODULATEURS ENDOCRINIENS

1.1 Le système endocrinien

Une hormone est une substance chimique sécrétée par des cellules glandulaires qui, déversée dans le sang, possède une action à distance sur un organe cible de façon spécifique. Ces messagers chimiques influent sur la plupart des cellules de l'organisme et ont des effets étendus et diversifiés. Les principaux processus qu'elles régissent sont la reproduction, la croissance et le développement, la mobilisation des moyens de défense de l'organisme, le maintien de l'équilibre des électrolytes, de l'eau et des nutriments dans le sang ainsi que la régulation du métabolisme cellulaire et de l'équilibre énergétique (Marieb, 1999). Ainsi, par l'intermédiaire des hormones, le système endocrinien régule et coordonne l'activité cellulaire dont dépend l'homéostasie. Le système endocrinien est composé de huit glandes (hypothalamus, hypophyse, parathyroïde, thyroïde, thymus, surrénales, pancréas, gonades), chacune d'entre elles possédant une activité spécialisée, ainsi que des tissus endocriniens additionnels. Les hormones produites par ces différentes glandes et tissus endocriniens dérivent soit : d'acides aminés (hormone de croissance), de cholestérol (stéroïdes sexuels), de tyrosine iodée (hormones thyroïdiennes) ou encore d'acide arachidonique (icosanoïde) (Hadley, 1996). Chacune de ces classes de messagers comprend plusieurs hormones, de structures et propriétés différentes, se liant à un récepteur qui lui est spécifique (François *et al.*, 2003).

1.2 Les modulateurs endocriniens

Au cours de la dernière décennie, l'intérêt de la population scientifique concernant les conséquences d'une exposition à des composés xénobiotiques capables de moduler le système endocrinien n'a cessé d'augmenter. En effet, non seulement influencé par les hormones endogènes, le système endocrinien se voit influencé par une grande variété de substances chimiques. Ces composés bioactifs incluent les hormones naturelles et de

synthèse, les phytoestrogènes, les pesticides, ainsi qu'une variété de produits chimiques, industriels et leurs sous-produits. Certaines de ces substances sont hautement persistantes dans l'environnement et bioaccumulables dans les organismes vivants. Devant l'augmentation incessante d'évidences provenant de l'environnement et démontrant les effets néfastes de ces substances exercés via le système endocrinien, un groupe de scientifiques (Scientific Committee on Toxicity, Ecotoxicity and the Environment (CSTEE)) s'est entendu, en 1998, sur le terme modulateurs endocriniens (EDC) :

Substance ou mélange exogène altérant les fonctions de l'appareil endocrinien et induisant des effets nocifs sur la santé d'un organisme intact, de ses descendants ou d'une (sous-)population. (Vos *et al.*, 2000).

Cette modulation du système endocrinien peut être le résultat soit : d'une liaison avec le récepteur de l'hormone, causant une activation ou une inactivation de celui-ci, d'une modification de l'expression du récepteur lui-même, d'une altération de la synthèse, de l'émission, du transport, du métabolisme, de l'action ou de l'élimination d'une hormone naturelle à l'intérieur d'un organisme. Une substance modulatrice du système endocrinien peut donc, selon son mode d'action, mimer (agoniste), ou inhiber (antagoniste) l'action d'une hormone endogène (Vos *et al.*, 2000).

1.3 Évidences historiques de modulation endocrinienne

Au cours des dernières années, une préoccupation croissante de la communauté scientifique s'est développée sur le rôle joué par des polluants organiques ou minéraux sur la modulation des systèmes participant à la régulation des processus endocriniens. Il serait fastidieux d'énumérer toutes les observations réalisées sur des animaux dans leur biotope naturel, par contre, certains des exemples les plus convaincants peuvent être cités.

1.3.1 Effets sur la faune

Les plus considérables évidences de modulation endocrinienne proviennent d'études portant sur la faune exposée à des contaminants environnementaux. Des effets néfastes ont été observés à plusieurs niveaux ; de l'expression de biomarqueur de contamination (Purdom, Hardiman et Bye, 1994) à des malformations (Oehlmann *et al.*, 1996) et jusqu'à des effets sur les populations (Guillette *et al.*, 1996, Hutchinson et Matthiessen, 1999). On relate de tels effets chez des invertébrés (Bryan, Gibbs et Burt, 1988), des poissons (Purdom, Hardiman et Bye, 1994), des reptiles (Guillette *et al.*, 1996), des oiseaux (Ratcliffe, 1967) et des mammifères (Olsson, Johnels et Vaz, 1975). Ces études ainsi que celles subséquentes traitent des effets observés sur des animaux tels une baisse de fertilité chez des oiseaux, des poissons et des mammifères, des effets physiologiques chez des oiseaux et des mammifères, une certaine "démasculinisation" et "féminisation" chez des poissons et des gastéropodes, une altération de la fonction immunitaire chez des reptiles et des mammifères ainsi qu'une altération de la fonction thyroïdienne chez des mammifères.

1.3.1.1 Silent Spring

La prise de conscience collective sur les effets néfastes de certaines substances chimiques sur l'environnement remonte aux années soixante. En 1962, la publication du livre «Silent Spring» de la biologiste et océanographe américaine Rachel Carson (1907-1964) fut le premier ouvrage à avertir le grand public des dangers du pesticide DDT (Dichloro-Diphényl-Trichloroéthane) mis sur le marché en 1942 (Daston, Cook et Kavlock, 2003). Ce livre fait état entre autres des dégâts causés par le DDT : de son entrée dans la chaîne alimentaire, de son accumulation dans les tissus gras des animaux, de sa persistance dans l'environnement, même suivant sa dilution par les pluies et de ses effets, non seulement sur sa cible (les insectes) mais aussi sur la faune et l'environnement. Grâce à son ouvrage, l'usage du DDT fut soumis à une régulation stricte des gouvernements pour ensuite être banni par plusieurs pays dont le Canada.

1.3.1.2 Effets sur les oiseaux

Un des effets les plus sérieux et les plus documentés concernant les modulateurs endocriniens est l'amincissement de la coquille des œufs des oiseaux, particulièrement des oiseaux de proie par le dichloro-diphényl-dichloroéthylène (DDE), le métabolite principal du DDT. En effet, Ratcliffe (1967) a noté l'amincissement de la coquille des œufs ainsi que l'augmentation de la fréquence d'œufs brisés dans les nids de faucon pèlerin, d'épervier d'Europe et d'aigle royal depuis 1946 en Grande-Bretagne. De plus, l'apparition de ces effets coïncide avec l'emploi de plus en plus important du pesticide DDT suivant la deuxième guerre mondiale. Quelques années plus tard, Ratcliffe confirme une corrélation négative entre l'épaisseur de la coquille de l'œuf et le contenu en résidus de DDT dans l'œuf (Ratcliffe, 1970). Depuis la constatation de Ratcliffe en 1967, plusieurs équipes ont démontré l'effet de certains polluants environnementaux sur l'épaisseur de la coquille des œufs incluant le méthylmercure et les pesticides organochlorés dont le *p,p'*-DDE chez plusieurs espèces (Bignert *et al.*, 1995, Fry, 1995, Hickey et Anderson, 1968, Peakall *et al.*, 1973). Malgré qu'il soit ardu d'accuser avec certitude un polluant environnemental en particulier pour l'amincissement de la coquille des œufs, Faber et Hickey (1973) ont conclu que, par rapport à 13 substances retrouvées dans l'environnement, le *p,p'*-DDE démontre la plus forte corrélation entre son contenu dans l'œuf et les effets sur la coquille. Le mécanisme par lequel le DDT induit l'amincissement de la coquille des œufs ne demeure que partiellement compris à ce jour (Vos *et al.*, 2000). Plusieurs hypothèses ont par contre été émises. En 1970, Peakall démontre que chez le pigeon femelle, le *p,p'*-DDT diminue la concentration sanguine d'oestradiol (E2) ainsi que la déposition de carbonate de calcium. La coquille des œufs est faite de carbonate de calcium; le calcium provient des os de l'oiseau, et de là passe à la coquille. Une autre hypothèse, venant appuyer celle de Peakall (1970) propose une inhibition de l'anhydrase carbonique, enzyme nécessaire à la production d'ions carbonates requis pour la déposition de carbonate de calcium sur la coquille de l'œuf suivant l'exposition de cailles japonaises aux *p,p'*-DDT et *p,p'*-DDE (Bitman, Cecil et Fries, 1970). Plus récemment, Lundholm (1997) a démontré que le *p,p'*-DDE inhibe l'action de la prostaglandine synthétase, diminuant ainsi les niveaux de prostaglandines

ce qui résulte en une diminution du transport des ions calcium vers la lumière de l'œuf. Pour confirmer l'importance de l'inhibition de la synthèse des prostaglandines dans le mécanisme de l'amincissement de la coquille de l'œuf, Lundholm a démontré le même amincissement lors de l'inhibition de la cyclooxygénase par l'indométhacine. Contrairement aux hypothèses de Peakall (1970) et Bitman, Cecil et Fries, (1970), Lundholm attribue les effets du *p,p'*-DDE à l'inhibition du transport de calcium plutôt qu'à une diminution de la disponibilité de celui-ci. De plus, il démontre que l'inhibition de la synthèse des prostaglandines est un effet unique du *p,p'*-DDE; *o,p'*-DDE, *p,p'*-DDT, *o,p'*-DDT et *p,p'*-DDD n'ayant aucun effet. La diminution de l'épaisseur de la coquille relatée par d'autres auteurs suivant l'exposition, entre autres, au *p,p'*-DDT résulte probablement de la conversion de celui-ci en *p,p'*-DDE (Lundholm, 1997).

1.3.1.3 Imposéx chez les mollusques

La masculinisation des mollusques marins femelles par le tributylétain (TBT), un agent biocide utilisé dans les peintures antisalissures, est probablement le cas le plus évident de perturbation endocrinienne par un polluant environnemental. Les organismes les plus sensibles à la contamination par le TBT sont les gastéropodes, qui subissent des transformations morphologiques quand ils sont exposés à des concentrations de TBT de 1-2 ng/L d'eau (Bryan, Gibbs et Burt, 1988). Par contre, l'espèce la plus sensible connue, *Ocenebra aciculata*, développe l'imposéx à une concentration de 0,1 ng/L de TBT (Oehlmann *et al.*, 1996). L'imposéx est caractérisé par le développement de structures reproductrices mâles, telles le pénis et le canal déférent, chez les femelles gastéropodes prosobranches. On a constaté que plus de 150 espèces sont touchées par l'imposéx, bien que l'influence directe du TBT n'ait pas été établie dans tous les cas (Hutchinson et Matthiessen, 1999). Deux hypothèses pouvant expliquer le mécanisme d'induction d'imposéx par le TBT sont présentement favorisées. La première suggère une inhibition de l'enzyme aromatasase (CYP19) responsable de l'aromatation des androgènes en œstrogène résultant en une augmentation des niveaux de testostérone et une masculinisation (Bettin, Oehlmann et Stroben, 1996). En effet, Bettin, Oehlmann et Stroben, (1996) ont démontré qu'il existe une relation dose-réponse entre la

masculinisation et les niveaux d'exposition au TBT. Confirmant cette hypothèse, l'exposition à un inhibiteur de l'aromatase (SH-489) conduit aussi à l'imposex. La seconde hypothèse formulée par Ronis et Mason, (1996) suggère une inhibition de la biotransformation de phase II des conjugués sulfates résultant en une inhibition de l'élimination de la testostérone. Le TBT, par l'intermédiaire de l'imposex entraîne donc une diminution des populations de gastéropodes due à la réduction du nombre de femelles fertiles (Hutchinson et Matthiessen, 1999).

1.3.1.4 Les phoques de la mer Baltique

La capture de mammifères marins permet d'évaluer les niveaux de contaminants persistants accumulés dans ce milieu. En effet, d'après leur position en fin de chaîne trophique, leur longue durée de vie et la lente demi-vie biologique d'élimination des polluants, ces animaux sont capables d'accumuler d'importantes teneurs en polluants. Un cas connu concernant des mammifères marins ayant accumulé des niveaux importants de polluants est celui des phoques de la mer Baltique. En effet, au cours des années soixante, la population de phoque (gris et annelé) de la mer Baltique a subi une diminution dramatique. Plusieurs groupes ont démontré des niveaux élevés de BPC (Biphényles Polychlorés), de DDT ainsi que de leurs métabolites dans les tissus de ces animaux (Bergman et Olsson, 1985, Bergman, Klasson-Wehler et Kuroki, 1994, Haraguchi *et al.*, 1992). Des concentrations de 5300 et 1600 µg/g de tissus gras de BPC et de DDT (DDT, DDE, DDD) ont été rapportées chez une femelle de la mer Baltique (Blomkvist *et al.*, 1992). Olsson, Johnels et Vaz, (1975) ont aussi démontré qu'il existe une corrélation entre les niveaux élevés de contaminants dans les tissus et la présence d'avortements spontanés et de naissances prématurées. Les pathologies retrouvées lors des autopsies révèlent des sténoses, des fibromes (leiomyomas) et des occlusions utérines; conditions favorisant la stérilité et qui permettent d'expliquer partiellement la décroissance de la population de ces phoques dans la mer Baltique (Bergman et Olsson, 1985). Outre les pathologies reproductrices, diverses autres conditions ont été identifiées chez les phoques de la mer Baltique : ostéoporose, ulcères intestinaux, diminution de l'épaisseur de l'épiderme, hyperadrénocorticisme ainsi qu'une diminution des niveaux d'hormones

thyroïdiennes et de vitamine A (Bergman, 1999, Bergman et Olsson, 1985, Jenssen, 1996, Olsson, Karlsson et Ahnland, 1994). Étant donné la diversité des effets toxiques et la quantité de composés persistants retrouvés dans les graisses de ces phoques, il est impossible de connaître avec certitude le ou les coupables des effets toxiques identifiés. Par contre, certaines de ces pathologies peuvent être partiellement expliquées. Premièrement, les effets observés sur le système reproducteur des femelles semblent associés aux BPCs (Vos *et al.*, 2000). En effet, plusieurs études ont démontré que les BPCs et leurs métabolites possèdent la capacité de lier le récepteur aux oestrogènes (RE) (Kester *et al.*, 2000, Korach *et al.*, 1988, Kramer *et al.*, 1997, Moore *et al.*, 1997). Donc, les pathologies du système reproducteur des femelles peuvent être dues à la liaison des BPCs avec le récepteur aux oestrogènes (Korach *et al.*, 1988), à l'inhibition de l'enzyme œstrogène sulfotransférase, résultant en une augmentation de la biodisponibilité de l'œstrogène (Kester *et al.*, 2000) ou encore à des mécanismes indépendants du RE (Kramer *et al.*, 1997). Ces hypothèses peuvent être particulièrement appliquées au fibrome utérin, qui résulte de la prolifération de cellules musculaires lisses sous le contrôle des stéroïdes ovariens. Plusieurs pathologies non reproductrices peuvent être associées à une augmentation des niveaux de glucocorticoïdes. En effet, l'ostéoporose, l'amincissement de l'épiderme ainsi que l'hyperadrénocorticisme peuvent résulter d'une augmentation de la production des hormones surrénaliennes (Vos *et al.*, 2000). Par contre, il semble que l'hyperadrénocorticisme soit plutôt due à une hyperplasie compensatoire de la glande surrénale face à la liaison des polluants et de leurs métabolites sur le récepteur des glucocorticoïdes (RG) dans le cortex de la glande surrénale (Johansson, Nilsson et Lund, 1998). Effectivement, certains métabolites des BPCs et du DDT ont été démontrés comme étant des inhibiteurs du cytochrome P450 CYP11B1 et de la production de la corticostérone dans des cellules Y1 (cellules adrénocorticales de souris) (Johansson, Nilsson et Lund, 1998). De plus il a été démontré que des métabolites des BPCs agissent comme des antagonistes du récepteur des glucocorticoïdes dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) exprimant l'élément de réponse du récepteur des glucocorticoïdes (RG) humain (Johansson, Nilsson et Lund, 1998). Finalement, malgré qu'aucune étude n'a pu démontrer le mécanisme par lequel les polluants persistants retrouvés dans le mer Baltique affectent les niveaux d'hormones

thyroïdiennes et de vitamine A, il existe une corrélation entre les niveaux de BPC dans le sang et les effets sur les hormones thyroïdiennes et la vitamine A (Jenssen, 1996). Les conséquences biologiques d'une diminution des hormones thyroïdiennes sont importantes et comportent des effets sur le métabolisme, le développement et la croissance. Une diminution de la circulation de vitamine A peut, quant à elle, résulter en une diminution de la résistance aux infections et à un développement anormal des tissus épithéliaux (Brouwer, Reijnders et Koeman, 1989).

1.3.1.5 Les alligators du lac Apopka

Le lac Apopka, en Floride, contient des contaminants provenant de l'agriculture, des effluents municipaux ainsi que d'un déversement accidentel de pesticides organochlorés (principalement difocol et DDT) en 1980 (Guillette *et al.*, 1996). Dans les années suivant le déversement, la population d'alligators juvéniles a chuté de 90 %. De plus, des œufs d'alligators provenant de ce lac et cultivés en laboratoire ont démontré une faible viabilité (Woodward *et al.*, 1993) ainsi qu'un niveau élevé de pesticides et de leurs métabolites (*p,p'*-DDE, *p,p'*-DDD, trans-nonachlor, dieldrin, toxaphène, oxychlordan et plusieurs BPC et métaux) (Heinz, Percival et Jennings, 1991). Néanmoins, des niveaux significativement plus élevés en *p,p'*-DDE ont été observés dans les tissus gras des alligators juvéniles provenant du lac Apopka comparés aux niveaux dans les lacs témoins (Guillette *et al.*, 1996). Les effets biologiques induits incluent des malformations des gonades, une réduction de la taille du pénis chez les mâles, des niveaux anormaux de stéroïdes sexuels ; les femelles ayant une augmentation anormale des niveaux de 17 β -oestradiol tandis que les mâles présentent une diminution des niveaux de testostérone ainsi qu'une augmentation des niveaux de 17 β -oestradiol (Guillette *et al.*, 1994, Guillette *et al.*, 1996, Guillette *et al.*, 1999). De plus, Rooney, Bermudez et Guillette, (2003) relatent une augmentation du volume du cortex thymique chez les femelles du lac Apopka, indiquant une altération de la maturation des lymphocyte-T. Finalement, une augmentation de la masse osseuse des alligators femelles causée par la présence de polluants oestrogéniques a été démontrée par Lind *et al.*, (2004). Plusieurs hypothèses ont été formulées pour expliquer les effets de perturbations endocriniennes rencontrés chez

les femelles et les mâles du lac Apopka. Premièrement, il a été démontré par Vonier *et al.*, (1996) que plusieurs contaminants oestrogéniques dont certains métabolites du DDT, l'alachlore, le trans-nonachlore et l'atrazine retrouvés dans les œufs des alligators possèdent la capacité de lier le récepteur aux œstrogènes. Deuxièmement, il est aussi probable, selon Guillette *et al.*, (1996) que les effets physiologiques rencontrés soient dûs au caractère anti-androgénique du *p,p'*-DDE. En effet, ce métabolite du DDT démontre un potentiel antagoniste du récepteur aux androgènes dans des cellules CHO (Chinese Hamster Ovary) transfecté avec le récepteur aux androgènes (Roy *et al.*, 2004). Par contre, des doses très élevées sont nécessaires à la démonstration de l'effet anti-androgénique *in vivo* chez le rat (Kelce *et al.*, 1995). De plus, une altération de l'activité de l'enzyme aromatase (CYP19) responsable de l'aromatisation des androgènes en œstrogène est un mécanisme possible (Crain *et al.*, 1997). De fait, le *p,p'*-DDE a été démontré comme étant un inducteur de l'activité aromatase chez le rat (You *et al.*, 2001), provoquant ainsi une augmentation des niveaux en oestrogènes. Finalement, une altération de l'activité enzymatique hépatique responsable du métabolisme de la testostérone a été démontrée par Gunderson, LeBlanc et Guillette, (2001). En effet, au lac Apopka, il n'existe plus de dimorphisme sexuel normalement associé à la testostérone hydroxylase ainsi qu'à la testostérone oxydo-réductase, ce qui résulte en une augmentation du métabolisme de la testostérone chez les mâles. De plus, les enzymes UDP-glucuronosyltransférase et sulfotransférase, normalement également exprimées chez les mâles et les femelles sont dimorphiques au lac Apopka, c'est à dire plus exprimées chez les mâles et favorisant l'élimination de la testostérone.

1.3.1.6 Les xénoestrogènes induisent la synthèse hépatique de vitellogénine chez les poissons mâles

Les effets des perturbateurs endocriniens sur la reproduction des poissons ont alerté la communauté scientifique internationale et font l'objet de nombreuses recherches dans les pays industrialisés et ce, depuis la publication de Purdom, Hardiman et Bye en 1994, indiquant le caractère oestrogénique de certains effluents municipaux britanniques. Cette découverte a amené l'utilisation de l'induction de la synthèse hépatique de la VTG chez

les poissons mâles comme bio-marqueur d'une exposition aux composés oestrogéniques (Vos *et al.*, 2000). En effet, chez les espèces ovipares, l'œstradiol joue un rôle clef dans la différenciation et le fonctionnement des organes reproducteurs en intervenant le long de l'axe cerveau-hypophyse-gonades et en stimulant la production hépatique de VTG chez les femelles. Cette action est médiée via des récepteurs nucléaires spécifiques, les récepteurs aux œstrogènes et donc dépendante d'œstrogène. L'exposition de poissons mâles au 17 β -œstradiol ou encore à des composés capables de mimer l'œstrogène entraîne la synthèse hépatique de VTG à un degré comparable à celui des femelles (Crain *et al.*, 1998, Purdom, Hardiman et Bye, 1994). Dans cette étude britannique, les eaux usées domestiques se révèlent être les principaux responsables de la contamination oestrogénique (Purdom, Hardiman et Bye, 1994, Sumpter et Jobling, 1995). Jobling *et al.*, (1996) identifient les dérivés d'alkylphénols comme étant les principaux agents oestrogéniques de ces eaux. Par contre, une étude ultérieure démontre que la seule présence d'hormones naturelles (17 β -œstradiol et œstrone (E1)) et de synthèse (17 α -éthinyloœstradiol) dérivée des pilules contraceptives suffit à expliquer l'oestrogénicité des eaux (Desbrow *et al.*, 1998). Bien qu'il existe des différences de sensibilité entre les espèces sentinelles utilisées ainsi que différents types de polluants oestrogéniques, des cours d'eaux contaminés ont été identifiés dans plusieurs pays (Vos *et al.*, 2000). Outre la synthèse hépatique de VTG, des effets physiologiques au niveau de la reproduction sont observés chez des poissons mâles vivant dans des cours d'eaux contaminés en xénoœstrogènes. Ces effets incluent la présence simultanée de spermatozoïdes et d'ovocytes dans le testicule (intersex) (Jobling *et al.*, 1998), une réduction de l'indice gonado-somatique (Hassanin *et al.*, 2002), une diminution de la qualité des gamètes et une réduction de la fertilité (Jobling *et al.*, 2002a;b). Nous traiterons plus en détails des différentes sources de pollutions oestrogéniques, des mécanismes d'action ainsi que des effets physiologiques des ces composés sur les poissons aux chapitres 2 et 3.

En conclusion, il est ardu de déterminer les mécanismes d'action des toxiques retrouvés dans l'environnement. En effet, les effets toxiques peuvent résulter d'exposition ou de co-exposition à plus d'une substance qui affectent le système endocrinien par plus d'un mécanisme incluant : l'œstrogène, l'androgène, la thyroxine et les glucocorticoïdes.

1.3.2 Effets chez les humains

Il existe, chez l'humain, deux types d'évaluation des effets reliés à l'exposition aux substances modulatrices du système endocriniens. Premièrement, on note les **observations** d'écoulant d'exposition à des substances connues pour leurs capacités à interférer avec le système endocrinien comme les agents thérapeutiques tel le DES (diéthylstilbestrol). Deuxièmement, on parle d'expositions à de faibles doses pour une longue période donnant lieu à des **tendances** qui relatent des effets néfastes reliés au système endocriniens.

1.3.2.1 Les observations

Parmi les observations reliées à l'exposition à différents agents thérapeutiques, le cas le plus évident de modulation endocrinienne est sans aucun doute celui du DES.

1.3.2.1.1 Exposition *in utero* aux diéthylstilbestrol (DES)

Synthétisé par Charles Dodds, un biochimiste anglais, en 1938, le DES a été le premier oestrogène de synthèse utilisable par voie orale. En 1947, un laboratoire commercialisera le DES aux États-Unis dans le but de prévenir des fausses couches et des accouchements prématurés. Cette molécule fut vendue par des laboratoires sous 325 noms différents dans le monde et prescrite largement par les médecins à des millions de femmes enceintes dès les années 40 et, selon les pays, jusqu'à la fin des années 70. Après la publication, en 1971, d'une étude faisant état d'adénocarcinome des cellules claires du vagin chez des femmes exposées *in utero* au DES (1:1000) (Herbst, Ulfelder et Poskanzer, 1971), l'emploi de celui-ci fut banni au Canada et aux États-Unis (Barlow *et al.*, 1999). Chez les femmes exposées *in utero* au DES, outre l'adénocarcinome, des études relatent des anomalies congénitales du système reproducteur dans plus de 50 % des cas. On note entre autres, des adénoses, des anomalies cervico-vaginales, utérines et des trompes, de plus, des problèmes de fertilité surviennent chez plus d'un tiers des femmes exposées (grossesses extra-utérines, avortement spontané et prématurité) (Senekjian *et al.*, 1988).

Des effets néfastes du DES sont également rencontrés chez les hommes exposés *in utero*. En effet, une augmentation de l'incidence de cryptorchidie, d'hypospadias, de micropénis, de kyste de l'épididyme ainsi qu'une diminution de la concentration en spermatozoïdes sont des effets reliés au DES (Gill *et al.*, 1979). Fait important, la cryptorchidie représente un facteur de risque connu pour le développement d'un cancer des testicules (Barlow *et al.*, 1999).

1.3.2.2 Les tendances

Plusieurs tendances, malgré que quelquefois controversées, suggèrent des effets reliés à des expositions à des substances environnementales, telles que le cas du déclin spermatique, de l'augmentation de l'incidence de cryptorchidie et d'hypospadias et de l'augmentation de l'incidence de certains cancers.

1.3.2.2.1 Le déclin spermatique

Depuis les années soixante-dix, plusieurs articles ont été publiés concernant la qualité et la concentration en spermatozoïdes chez l'homme. Récemment, certains auteurs ont effectué une méta analyse des publications des 50 dernières années portant sur les caractéristiques du sperme de 14 947 hommes normaux (Carlsen *et al.*, 1992). Ces auteurs ont observé une baisse d'environ 50 % de la concentration en spermatozoïdes soit de 113 millions/mL en 1940 à 66 millions/mL en 1990 ainsi qu'une baisse du volume de l'éjaculat de 3,40 mL à 2,75 mL. Par contre, cette analyse fut commentée en plusieurs points par plusieurs auteurs dûs à la présence potentielle d'un biais de sélection, à la variabilité quant à la collecte du sperme, à la période d'abstinence ainsi qu'au sujet du modèle de régression linéaire employée pour le traitement des données (Bromwich *et al.*, 1994, Farrow, 1994, Olsen *et al.*, 1995). Toutefois, une ré-analyse plus approfondie utilisant un modèle de régression multiple permettant de corriger le temps d'abstinence, l'âge, la méthode de collection du sperme et l'emplacement géographique a permis d'établir qu'effectivement, une baisse de la concentration en spermatozoïdes s'est produite en Europe (moins de 3 % par an entre 1971 et 1990) et aux États-Unis (moins de

1,5 % par an entre 1938 et 1988) (Swan, Elkin et Fenster, 1997). Finalement, les opinions sont variées quant à savoir si ces observations découlent de l'exposition à des substances modulatrices du système endocrinien. En 1993, Sharpe et Skakkeback, ont suggéré que le déclin spermatique pouvait être dû à l'exposition à des substances capables de mimer l'œstrogène. Cette suggestion était basée sur l'observation des effets découlant de l'exposition *in utero* au DES ainsi que des conclusions tirées d'animaux exposés dans leur milieu naturel (Gill *et al.*, 1979). Par contre, ces auteurs n'excluent pas la possibilité que les effets oestrogéniques observés pourraient provenir de la consommation d'aliments contenant de l'œstrogène (phytoestrogène), de la faible clairance oestrogénique due à la diminution de la consommation de fibres ou encore de l'augmentation de la synthèse de l'œstrogène due à l'obésité de plus en plus fréquente.

1.3.2.2.2 L'augmentation de la fréquence de cryptorchidie et d'hypospadias

Le développement normal du système reproducteur mâle dépend de l'action des androgènes. L'androgène majeur chez les mammifères est la dihydrotestostérone (DHT). Celle-ci est produite dans les cellules cibles par la transformation de la testostérone libre par l'enzyme 5-alpha-réductase (Hadley, 1996). Conséquemment, une altération de la production de DHT ou une variation de sensibilité à l'hormone mâle conduit à des malformations de l'appareil génital. La cryptorchidie est caractérisée par une anomalie de descente des testicules qui normalement migrent sous l'influence de la dihydrotestostérone au cours des derniers mois de grossesse. L'hypospadias est une malformation congénitale du pénis : le méat urinaire se trouve sur la face ventrale, entre l'extrémité du pénis et les bourses, quelques fois même à l'intérieure de celles-ci.

Depuis les dernières décennies, plusieurs pays ont relaté une augmentation des cas de cryptorchidie et d'hypospadias. Malgré que cette augmentation diffère selon la situation géographique, une tendance à la hausse est observée dans plusieurs pays dont l'Angleterre, la Hongrie, la Suède, la Norvège, le Danemark et les États-Unis (Toppari, Kaleva et Virtanen, 2001). Lorsque les données de deux études anglaises sont comparées, une effectuée au cours de la fin des années cinquante et l'autre au cours des années

quatre-vingt, on constate que l'incidence de cryptorchidie a augmenté de 1,74 % à 5,2 % chez les garçons de 3 mois ayant un poids à la naissance inférieur à 2500 g et de 0,91 % à 1,61 % chez les garçons ayant un poids à la naissance supérieur à 2500 g (Radcliffe, 1992, Scorer, 1964). De plus, selon le BDMP (Birth Defects Monitoring Program), l'incidence d'hypospadias aurait doublée depuis les années soixante-dix pour atteindre pratiquement 40 cas par 10 000 naissances en 1993 aux États-Unis (Paulozzi, Erickson et Jackson, 1997). Bien que les androgènes représentent un facteur primordial à la mise en place du système reproducteur mâle, une inadéquation de l'action ou de la production des androgènes ne peut expliquer qu'une minorité des cas de cryptorchidie et d'hypospadias (Toppari, Kaleva et Virtanen, 2001). Il semble en effet que la prédisposition génétique et la modulation endocrinienne représentent les plus importants facteurs de risques de la cryptorchidie. Effectivement, des mutations dans les gènes *Insl3* (Insulin-like factor 3), responsable de la formation du gubernaculum, nécessaire à la descente des testicules ainsi que dans le gène HOXA 10, membre de la famille HOX (Homeobox) et important régulateur du développement des organes génitaux ont été identifiées (Kolon *et al.*, 1999, Tomboc *et al.*, 2000). Parallèlement, un traitement oestrogénique *in utero* altère la fonction du gène *Insl3* et cause la cryptorchidie chez la souris (Nef, Shipman et Parada, 2000). La modulation endocrinienne de la fonction des gènes HOX et *Insl3* représente donc une cause possible de l'augmentation de l'incidence de cryptorchidie et possiblement d'hypospadias. Finalement, ces deux pathologies sont associées à un risque accru de cancer des testicules et à une réduction de la qualité des spermatozoïdes (Toppari, Kaleva et Virtanen, 2001).

1.3.2.2.3 L'augmentation de la fréquence de certains cancers

Plusieurs formes de cancers hormono-dépendants ont vu leur fréquence augmenter avec le temps dans certaines régions du globe, incluant le cancer du sein, de la thyroïde et des testicules (Cocco, 2002). En effet, les hormones jouent un rôle important dans l'étiologie de certains cancers ; une stimulation hormonale excessive d'un organe peut éventuellement provoquer le développement d'un foyer cancéreux, de plus, certaines hormones provoquent la division cellulaire et augmentent le pouvoir de prolifération d'un

foyer initial. Parallèlement, plusieurs évidences démontrent que les ligands du récepteur Ah (Aryle Hydrocarbone) (AhR) et l'œstrogène peuvent conduire à la formation de tumeurs cancéreuses selon un processus dépendant du métabolisme de l'œstrogène par les cytochromes P450 1A1 et 1A2 via la formation de catéchols œstrogènes (Yager et Liehr, 1996).

Le cancer du sein est la forme la plus fréquente et représente la première cause de mortalité chez les femmes des pays industrialisés. On remarque une nette augmentation des cas de cancer du sein depuis l'industrialisation au courant des années quarante. Son apparition est clairement associée à l'œstrogène, conséquemment, plus la période d'exposition à l'œstrogène est importante, plus les risques sont élevés. La possibilité que des composés xéno biotiques et leurs métabolites agissant comme l'œstrogène puissent induire ou promouvoir le développement d'un cancer du sein est donc envisageable. De ce fait, une étude de cas effectuée en Colombie-Britannique rapporte un risque accru de cancer du sein chez les femmes (pré et post-ménopausées incluses) employées à la récolte de fruits et légumes et donc raisonnablement exposées à un éventail de pesticides (Band *et al.*, 1999). Plusieurs équipes ont concentré leurs investigations sur les risques associés à la dose interne de DDT. Les résultats de ces études demeurent encore conflictuels, certains affirment obtenir une augmentation du risque (Demers *et al.*, 2000) tandis que d'autres le démentent (Aronson *et al.*, 2000). Cette dernière affirmation est en accord avec le potentiel anti-androgénique du principal métabolite du DDT, le *o,p'*-DDE (Kelce *et al.*, 1995). De plus, un risque accru correspondant au double de l'incidence normale a été démontré pour l'exposition au dieldrin, tandis que l'exposition au DDT n'avait aucun effet (Hoyer *et al.*, 1998). Finalement, l'hypothèse selon laquelle l'exposition à des modulateurs du système endocrinien augmente le risque de développer un cancer du sein demeure à vérifier.

La sécrétion des hormones thyroïdiennes T4 (thyroxine) et T3 (triiodothyronine) est régulée par l'intermédiaire de l'hypothalamus qui sécrète la TRH (Thyreotropin-Releasing Hormone) et l'adénohypophyse qui sécrète la TSH (Thyroïd-Stimulating Hormone) ou thyrotropine. Celle-ci stimule la sécrétion des hormones thyroïdiennes qui par retro-

inhibition freinent la sécrétion de TRH et de TSH. Conséquemment, une réduction en T4 sérique entraîne une diminution de la rétro-inhibition négative sur l'hypophyse résultant en une hausse de la sécrétion de TSH et donc une surstimulation de la thyroïde (Sanders *et al.*, 1988). Cette surstimulation peut mener à une hyperplasie folliculaire, une hypertrophie de la glande et ainsi augmenter le risque de progression néoplasique (Cocco, 2002). Certains pesticides, dont l'acétochlore, augmentent indirectement l'incidence des cancers de la glande thyroïde par un mécanisme extra-thyroïdien par l'induction de la synthèse d'UDP-glucuronosyltransférase hépatique, résultant en une augmentation de la conjugaison et de l'élimination de la thyroxine, diminuant ainsi la concentration sérique en T4 (Hurley, 1998). Par ailleurs, certains pesticides ont été démontrés comme étant potentiellement directement cancérigènes à l'endroit de la thyroïde chez les rongeurs (Cocco, 2002). Par contre, un pouvoir mutagène a seulement été associé à l'acétochlore et à l'amitrole (Hurley, 1998).

Le cancer des testicules affecte plus fréquemment les hommes de 20 à 35 ans et représente l'une des formes de cancer possédant la plus haute incidence dans cette tranche d'âge. Le nombre de nouveaux cas de cancer des testicules a dramatiquement augmenté depuis les quarante dernières années (Toppari *et al.*, 1996). Des études épidémiologiques suggèrent le rôle de l'œstrogène dans l'étiologie de ce cancer. En effet, tout comme les effets reliés au DES, l'excès d'œstrogène maternel lors de la période critique de la gestation représente un facteur de risque connu pour le cancer des testicules (Barlow *et al.*, 1999). Effectivement, une étude canadienne révèle un risque de développer un cancer des testicules quatre fois supérieur suite à l'exposition aux xénoestrogènes pendant la gestation (Weir *et al.*, 2000). L'hypothèse selon laquelle l'exposition maternelle à des pesticides oestrogéniques contribuerait à l'augmentation du risque de développer un cancer des testicules a été testée lors d'une étude norvégienne. Cette étude relate une augmentation de l'incidence de cancer des testicules chez les fils de fermiers. Néanmoins, les auteurs attribuent cette augmentation à l'application de fertilisants plutôt qu'aux pesticides (Kristensen *et al.*, 1996).

Plusieurs autres cancers incluant le cancer de l'endomètre, des ovaires et de la prostate et dans lesquels les hormones influent sur l'induction ou la progression ont vu leur incidence augmenter avec le temps. Il n'existe pas de preuve établie sur l'influence des contaminants environnementaux sur l'apparition de ces cancers. De plus, l'amélioration des diagnostics ne doit pas être négligée (Doll et Peto, 1981).

1.4 Liste des substances perturbatrices du système endocrinien

Les substances énoncées dans la liste suivante sont reconnues pour leur potentiel à altérer le système endocrinien. Cette liste regroupe les pesticides, les composés industriels et les métaux lourds.

Tableau 1 : Substances perturbatrices du système endocrinien (modifié de Colborn, vom Saal et Soto, 1993)

<u>Composés</u>	<u>Système atteint</u>	<u>Références</u>
<u>Pesticides</u>		
Herbicides		
2,4-dichlorophénoxy acétique acide (2,4 D)	Thyroïde	Charles <i>et al.</i> , 1996, Gorzinski <i>et al.</i> , 1987,
2,4,5-trichlorophénoxy acétique acide (2,4,5-T) (Agent orange)	Thyroïde	Johnson <i>et al.</i> , 2001, Van den Berg <i>et al.</i> , 1991
Acétochlore	Thyroïde	Hurley, 1998
Alachlore	Thyroïde, Oestrogène et Progestérone	Arnold <i>et al.</i> , 1997, Vonier <i>et al.</i> , 1996, Wilson <i>et al.</i> , 1996
Amitrole	Thyroïde	Hurley, 1998, Mattioli <i>et al.</i> , 1994
Atrazine	Œstrogène, Testostérone, Thyroïde	Danzo, 1997, Gale, Patino et Maule, 2004, Kornilovskaya <i>et al.</i> , 1996, Vonier <i>et al.</i> , 1996
Linuron	Androgène	Cook <i>et al.</i> , 1993
Metribuzine	Thyroïde. Reproduction	Porter <i>et al.</i> , 1993
Nitrofène	Pancréas. Reproduction	Costlow <i>et al.</i> , 1983, Milman, Word et Chu, 1978
Trifluralin	Hypophyse (corticostéroïdes)	Rawlings, Cook et Waldbillig, 1998

Fungicides		
Benomyl	Reproduction	Spencer, Chi et Zhu, 1998
Hexachlorobenzène	Thyroïde, Progestérone, Reproduction	Arnold <i>et al.</i> , 1985, Foster <i>et al.</i> , 1992, Jarrell <i>et al.</i> , 1998, Smith <i>et al.</i> , 1987,
Mancozèbe	Thyroïde	Hurley, 1998
Manèbe	Thyroïde	Laisi <i>et al.</i> , 1985
Métiram	Thyroïde	Crisp <i>et al.</i> , 1998
Tributylétain	Androgène, Reproduction	Bettin, Oehlmann et Stroben, 1996, Harazono, Ema et Ogawa, 1996, Oehlmann <i>et al.</i> , 1996
Vinclozolin	Androgène	Gray, Ostby et Kelce, 1994, Gray <i>et al.</i> , 1999
Zinèbe	Thyroïde	Laisi <i>et al.</i> , 1985
Ziram	Reproduction	Giavini, Vismora et Broccia, 1983
Insecticides		
Aldrine	Reproduction	Castro, Bernardi et Palermo-Neto, 1992
Carbaryl	Oestrogène, Progestérone, Thyroïde, Reproduction	Klotz, Arnold et McLachlan, 1997, Sinha, Lal et Singh, 1991, Tripathi et Singh, 2003
Chlordane, Oxychlordane	Androgène	Cassidy <i>et al.</i> , 1994
Chlordécone (Képone)	Oestrogène	Smeets <i>et al.</i> , 1999
Dicofol	Thyroïde	Van den Berg <i>et al.</i> , 1991
Dieldrine	Androgène, Oestrogène, Progestérone	Andersen <i>et al.</i> , 2002, Ramamoorthy <i>et al.</i> , 1997, Scippo <i>et al.</i> , 2004
DDT et métabolites	Oestrogène, Androgène	Danzo, 1997, Fry et Toone, 1981, Smeets <i>et al.</i> , 1999, Vonier <i>et al.</i> , 1996,
Endosulfane	Oestrogène, Progestérone	Vonier <i>et al.</i> , 1996, Gale, Patino et Maule, 2004
Fenitrothion	Androgène	Sohohi <i>et al.</i> , 2001
Heptachlore	Oestrogène, Progestérone, Reproduction	Oduma <i>et al.</i> , 1995, Rani et Krishnakumari, 1995
Lindane (γ HCH) (Hexachlorohexane)	Androgène, Thyroïde, Reproduction	Chadwick <i>et al.</i> , 1988, Rawlings, Cook et Waldbillig, 1998, Simic <i>et al.</i> , 1991, Van den Berg <i>et al.</i> , 1991
Malathion	Thyroïde	Van den Berg <i>et al.</i> , 1991
Méthomyl	Oestrogène, Progestérone	Klotz, Arnold et McLachlan, 1997

Méthoxychlore	Oestrogène, Reproduction	Gray <i>et al.</i> , 1989, Smeets <i>et al.</i> , 1999, Swartz et Eroschenko, 1998
Mirex, Photomirex	Oestrogène, Thyroïde	Guillette, Vonier et McLachlan, 2002, Singh <i>et al.</i> , 1985
Parathion	Thyroïde	Rojas <i>et al.</i> , 1998
Toxaphène	Oestrogène, Thyroïde	Waritz <i>et al.</i> , 1996
Trans-nonachlore	Oestrogène	Vonier <i>et al.</i> , 1996
Nématocides		
Aldicarb	Oestrogène, Progestérone	Klotz, Arnold et McLachlan, 1997,
Dibromochloropropane	Reproduction	Meistrich <i>et al.</i> , 2003
1.3-Dichloropropène		
Composés industriels		
Alkylphénols (penta à nonyl)	Oestrogène	Danzo, 1997
Benzo-a-pyrène	Reproduction	Kristensen <i>et al.</i> , 1995
Bisphénol A	Oestrogène	Nagel <i>et al.</i> , 1997, Smeets <i>et al.</i> , 1999
Phtalates	Oestrogène	Jobling <i>et al.</i> , 1995
Polychlorobiphényles	Androgène, Thyroïde, Reproduction	Anbalagan <i>et al.</i> , 2003, Gray et Kelce, 1996, Meerts <i>et al.</i> , 2002.
Pentabromodiphényle	Thyroïde	Zhou <i>et al.</i> , 2002
Pentachlorophénol	Thyroïde, Reproduction	Beard et Rawlings, 1998, Ishihara <i>et al.</i> , 2003
2.3.7.8 Tétrachlorodibenzodioxine	Reproduction	Augustowska <i>et al.</i> , 2003
2.3.7.8 Tétrachlorodibenzofuranne	Reproduction	Augustowska <i>et al.</i> , 2003
Styrène (dimères et trimères)	Reproduction	Mishra <i>et al.</i> , 2003
Métaux lourds		
Cadmium	Oestrogène, Progestérone	Garcia-Morales <i>et al.</i> , 1994
Plomb	Reproduction, Thyroïde	Kristensen <i>et al.</i> , 1995, Ronis <i>et al.</i> , 1996
Mercure	Reproduction	Khan <i>et al.</i> , 2004

CHAPITRE 2

LES CONTAMINANTS OESTROGÉNIQUES ET LE MILIEU AQUATIQUE

2.1 Les contaminants oestrogéniques dans le milieu aquatique

Les évidences historiques de modulations endocriniennes chez la faune et l'humain ont permis de conclure que certaines substances exogènes à l'organisme possèdent la capacité de mimer l'action de l'hormone féminine 17β -oestradiol, on les nomme xénoestrogènes. En effet, un large éventail de substances, naturelles et de fabrication humaine, ont été démontrées comme étant faiblement oestrogéniques (Colborn, vom Saal et Soto, 1993). Parmi ces substances, on note, des phytoestrogènes, des métaux lourds, des composés industriels, certains pesticides, des composés plastiques ainsi que des produits de dégradation de surfactants (Vos *et al.*, 2000).

Plusieurs xénoestrogènes, de par les décharges municipales et industrielles, sont susceptibles de se retrouver dans le milieu aquatique. En effet, c'est dans ce milieu que l'on retrouve les exemples les plus saisissants de modulations endocriniennes. Dans la présente sous-section, nous allons définir les principaux composés oestrogéniques retrouvés dans le milieu aquatique suite aux déversements, dans l'environnement, des effluents municipaux, agricoles et provenant de l'industrie du papier. La détermination du caractère oestrogénique d'une substance est difficile à prédire seulement de par sa structure chimique dû au fait que certaines d'entre elles possèdent des structures très éloignées du noyau stéroïdien typique (Figure 1) (Tapiero, Ba et Tew, 2002). Néanmoins, l'évaluation du potentiel oestrogénique des eaux peut-être réalisée sur des cellules de cancer de sein humain (MCF-7). Cette méthode (E-Screen) évalue la prolifération de ces cellules possédant un récepteur aux oestrogènes et demeure une des méthodes les plus précises et les plus reproductibles à la détermination du caractère oestrogénique des polluants (Soto, Chung et Sonnenschein, 1994). De plus, d'autres méthodes telles l'emploi de levures transfectées avec le récepteur des oestrogènes humain (Vinggaard *et*

al., 2000b) ainsi que des lignées cellulaires ovariennes transfectées avec le récepteur aux oestrogènes humain permettent de déterminer l'oestrogénicité d'une substance ou d'un mélange (Rogers et Denison, 2000).

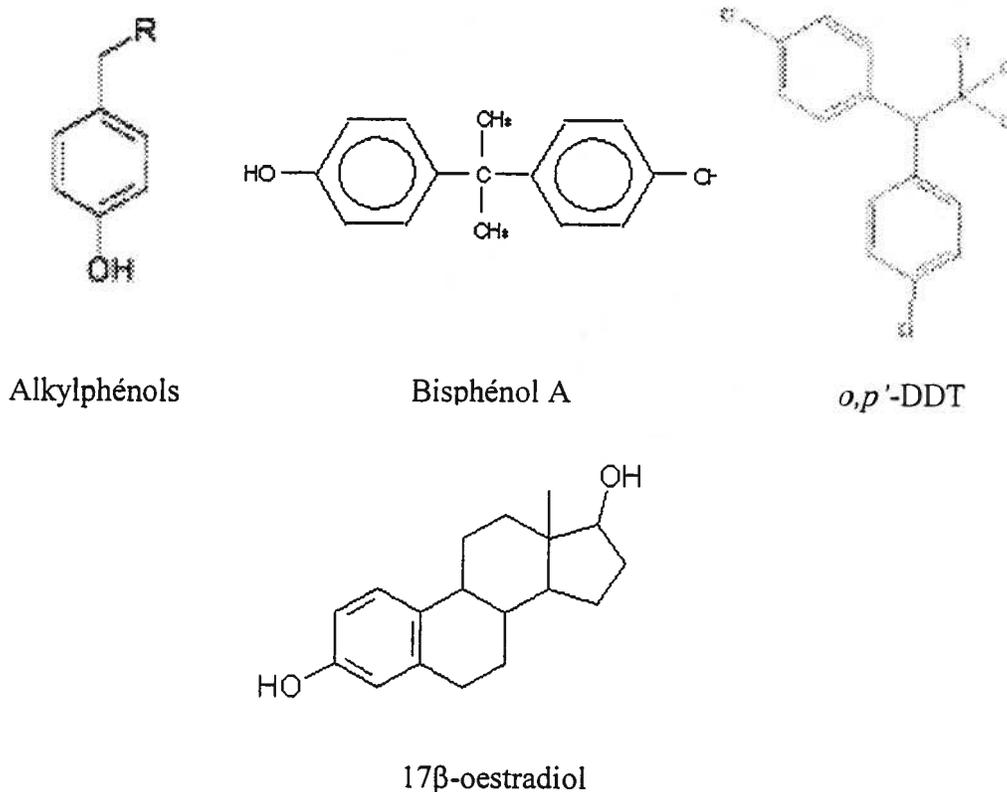


Figure 1 : Structures chimiques des alkylphénols, du Bisphénol A, du *o,p'*-DDT et du 17β-estradiol.

2.1.1 Les effluents municipaux

Les effluents municipaux, autant industriels que domestiques, représentent une source importante de modulateurs endocriniens dans le milieu aquatique. Dépendamment de la substance en cause, des effets oestrogéniques sur la faune aquatique sont perçus à des concentration aussi faibles que 0,01 ng/L pour l'éthinylœstradiol (Purdom, Hardiman et Bye, 1994). Lors d'une étude effectuée dans le sud-ouest de l'Allemagne, Spengler, Korner et Metzger, (2001) ont identifié la présence d'hormones naturelles et de synthèse

ainsi que de composés industriels tels que le bisphénol A, des phtalates ainsi que des composés de biodégradation microbienne de surfactants non-ioniques (4-nonylphénol diéthoxylé, acide 4-nonylphénoxyacétique, 4-nonylphénol). Les concentrations en bisphénol A et en nonylphénol dans les effluents municipaux rapportées dans la littérature varient grandement (ng/L à mg/L). Par contre, une étude effectuée récemment dans les tributaires de la Rivière Elbe, en Allemagne rapporte des concentrations en bisphénol A et en 4-*tert*-nonylphénol, évaluées à 4 à 92 et 0,5 à 120 ng/l respectivement (Stachel *et al.*, 2003). Par ailleurs, le Canada et l'Allemagne comptent parmi les pays où la concentration en œstrogène (naturel et de synthèse) dans les effluents est la plus élevée. Au Canada, elle s'étend d'en dessous de la limite de détection à 48 ng/l pour l'oestrone, à 64 ng/l pour l'oestradiol et à 42 ng/l pour l'éthinylestradiol dans 10 stations d'échantillonnages en Ontario (Ternes *et al.*, 1999). De plus, Sabik *et al.*, (2003) ont démontré des concentrations en alkylphénols dans les sédiments retrouvés dans le St-Laurent, en aval de la décharge municipale de la Communauté Urbaine de Montréal (CUM) de l'ordre du ppm, par rapport à des concentrations dans l'eau évaluées en ppt et ppb. La concentration minimale à l'induction de la VTG chez les truites arc-en-ciel mâles est de 1 µg/L pour le nonylphénol (Routledge *et al.*, 1998). Selon Routledge *et al.*, (1998), même dans le cas où les concentrations en alkylphénols sont en dessous des concentrations toxiques aiguë et chronique, lorsque mélangées, celles-ci demeurent parfois suffisantes pour causer des effets oestrogéniques. Ainsi, la présence des alkylphénols, leur capacité de bioconcentration et la présence potentielle d'un éventail de composés oestrogéniques en aval de la décharge municipale de la CUM semblent suffisamment importante pour causer des effets oestrogéniques chez les espèces aquatiques.

2.1.2 Les effluents provenant de l'agriculture

L'agriculture représente la première cause de pollution des eaux de surface. Lors d'une étude réalisée en 1991 et 1992, la U.S.Geological Survey (USGS) a déterminé que 100 % de l'eau potable des Grands Lacs était contaminée par au moins un herbicide (Anderson *et al.*, 1998). Au Canada, des millions de livres de pesticides sont employés annuellement et environ la moitié de ceux-ci sont classés dans au moins une des catégories suivantes :

carcinogène potentiel pour l'humain, toxicité aigue pour l'applicateur, toxicité aigue pour la faune, et modulateurs endocriniens potentiels. Dû à leur persistance dans l'environnement, les pesticides se retrouvent non seulement au site d'application mais aussi dans l'air ambiant, l'eau de pluie, les eaux de surface, les sédiments et les espèces aquatiques et terrestres. Les pesticides les plus fréquemment employés au Canada (plus de 10 000 kg annuellement) incluent l'insecticide organochloré endosulfane, le dieldrine, trois fongicides à base de carbamate (manèbe, mancozèbe, métirame), les herbicides à base de dinitroaniline (trifluralin), de triazine (Atrazine), de métoxychlore et l'acide 2,4 D ainsi qu'un nématocide hydrocarboné halogéné (1,3-dichloropropène) (Harris *et al.*, 2000a). Certains de ces pesticides ont été détectés au Québec, dans les tributaires du fleuve St-Laurent (Christin *et al.*, 2004) et incluent l'atrazine et le 2,4-D (Giroux, 2002). Les systèmes endocriniens atteints par ces différents composés sont décrits au Tableau 1. Étant donné que le potentiel toxique est testé pour une substance à la fois, peu de données existent quant aux effets du mélange de ces composés. Par contre, un synergisme des effets est associé à certains mélanges; les effets obtenus par le mélange de composés sont supérieurs à la somme des effets de chaque composé (Willingham, 2004). De plus, les pesticides contiennent des agents longtemps appelés «agents inertes» comme des solvants, des adjuvants, des surfactants, des émulsifiants ainsi que des stabilisants. L'emploi du terme agents inertes est maintenant critiqué dans la littérature du fait que plusieurs de ces agents possèdent eux-mêmes des effets de modulation endocrinienne, tel est le cas du nonylphénol (White *et al.*, 1994).

En plus de l'emploi de pesticides, l'élevage d'animaux de ferme provoque la présence de composés oestrogéniques dans le milieu aquatique. Non seulement ces animaux excrètent des quantités appréciables d'hormones naturelles mais les agents anabolisants employés pour l'élevage de troupeaux agricoles contribuent au caractère oestrogénique des eaux. Par exemple, la concentration en 17β -oestradiol dans l'urine de vache est estimée à 13 ng/L (Yin, Kookana et Ru, 2002) De plus, l'utilisation d'hormones naturelles et de synthèse représente une pratique courante dans l'élevage de bovins, de moutons, de porcs et de volailles. L'oestrogène naturel et de synthèse (Zeranole) sont les produits oestrogéniques les plus souvent employés (Lange, Daxenberger et Meyer, 2001). Par

contre, il semble que l'exposition humaine par la consommation de ces produits soit quasi nulle du au fait que les traitements hormonaux cessent longtemps avant l'abatage (Soto *et al.*, 2004). Néanmoins, le devenir des hormones naturelles et des agents anabolisants excrétés par les animaux dans l'environnement et l'épandage de fumier représente une source non négligeable d'œstrogène en mesure d'entrer dans le milieu aquatique. En effet, de l'estrogène naturel à une concentration de 3500 ng/L a été reporté dans les cours d'eau recevant les effluents de champs fertilisés avec du fumier de poulet (Nichols *et al.*, 1997). Le principal métabolite oestrogénique excrété par le bétail est le 17 α -estradiol. Par contre, celui-ci se retrouve dégradé par les microorganismes et l'oestrone est l'entité oestrogénique la plus commune dans les cours d'eaux et les sédiments. Le coefficient octanol-eau des œstrogènes démontre que ces hormones sont en mesure de se retrouver en plus grande concentration dans les sédiments que dans l'eau (Soto *et al.*, 2004).

2.1.3 Les effluents provenant de l'industrie du papier

Plusieurs études ont démontré que les effluents provenant des usines de pâte et papier contribuent à une série d'atteinte à la reproduction chez le poisson, notamment, une modification des concentrations plasmatiques des stéroïdes sexuels, une atrophie des gonades et un retard dans la maturité sexuelle (Lister et Van Der Kraak, 2001, Sepulveda *et al.*, 2003). Le potentiel oestrogénique des effluents découlant de la transformation de la pâte Kraft blanchie fut tout d'abord attribué à la présence de dibenzo-dioxine et de dibenzo-furannes, reconnu pour leurs capacités à altérer le système endocrinien (Kim Oanh *et al.*, 1999). Par contre, suite à l'introduction de procédés de blanchiment sans chlore, ce qui a grandement contribué à éliminer la production de ces composés, il demeure toujours des indices de modulations endocriniennes chez les poissons exposés à ces effluents (Fox *et al.*, 2001). Il est maintenant évident qu'un nombre inconnu de composés présents dans le bois et libérés au cours de la fabrication de la pâte possède une activité oestrogénique (Fox *et al.*, 2001). Parmi ces composés, les lignans, les alcools de triterpène, les résines et les stérols (β -sitostérol, stilbène), connus sous le nom de phytoestrogènes, possèdent un potentiel oestrogénique. De plus, plusieurs mycotoxines, produites par des espèces fongiques présentent dans le bois demeurent suspectes

concernant leur potentiel de modulateurs endocriniens (Mellanen *et al.*, 1996). De plus, une étude effectuée par Oakes, McMaster et Van Der Kraak, (2004) démontrent que les atteintes reproductrices observées chez les poissons exposés aux effluents des usines de pâte et papier pourraient provenir de dommages oxydatifs aux lipides membranaires originant de la formation de radicaux libres.

2.2 Modes d'action des xénoestrogènes

La signalisation endocrinienne est un processus complexe qui implique non seulement la synthèse, le transport et la liaison des hormones au récepteur membranaire ou nucléaire mais aussi le métabolisme de celles-ci et la régulation des enzymes nécessaires à la biosynthèse et au métabolisme. Conséquemment, les effets des xénoestrogènes sur le système endocrinien sont causés par différents mécanismes dont les principaux incluent leur capacité à mimer l'œstrogène sur son récepteur nucléaire ou membranaire, à antagoniser l'effet des hormones endogènes telles l'œstrogène et les androgènes, à leur liaison avec le récepteur Ah (Aryl hydrocarbure), à leur action sur la synthèse ou le métabolisme des hormones endogènes ou encore à altérer les niveaux de récepteur pour l'œstrogène.

2.2.1 Interaction directe par l'intermédiaire d'un récepteur

L'action moléculaire majeure d'une hormone stéroïdienne est produite via sa liaison avec un récepteur nucléaire. Ces récepteurs se retrouvent à l'intérieur des cellules cibles, dans le cytoplasme ou le noyau et agissent comme facteur de transcription dont l'action dépend de la liaison de leur ligand respectif. Chez les poissons, les récepteurs aux œstrogènes et aux androgènes se retrouvent dans le noyau (Gélinas et Callard, 1997). Suite à cette liaison, ce complexe hormone-récepteur se dirige vers un site de liaison spécifique sur l'ADN (acide désoxyribonucléique), un élément de réponse (HRE- Hormone Response Element), dans la région du promoteur de gènes réponses et active ou inhibe la transcription d'ARN (acide ribonucléique) messagers d'où découle ou non la production de protéine spécifique.

Les récepteurs nucléaires possèdent une structure et un mécanisme d'action semblable et appartiennent tous à la super-famille des récepteurs nucléaires. Les gènes de ces récepteurs et des hormones qui leur sont spécifiques sont hautement conservés et démontrent une expression spécifique aux tissus ainsi qu'à la période de développement (Kuiper *et al.*, 1996). Les récepteurs nucléaires peuvent être divisés en deux classes distinctes : les récepteurs des hormones stéroïdiennes et non stéroïdiennes. Les récepteurs des hormones stéroïdiennes incluent les récepteurs de l'oestrogènes (RE), des androgènes (RA), de la progestérone (RP), des glucocorticoïdes (RG) et des minéralocorticoïdes (RM) tandis que les récepteurs des hormones non stéroïdiennes incluent ceux des hormones thyroïdiennes (RT), de l'acide rétinoïque (RAR) et de la vitamine D (RVD) (Klinge, 2000).

Les récepteurs nucléaires sont composés d'un seul polypeptide comprenant six régions distinctes caractérisées par leur similitude en acides aminés à l'intérieur de la protéine (Figure 2) (Klinge, 2000). La région C, la plus conservée, représente le domaine de liaison du complexe sur une séquence spécifique d'ADN. Le site de liaison à l'ADN, situé dans la région 5' du promoteur des gènes réponses est nommé élément de réponse (HRE). Les HRE sont caractérisées par des séquences palindromiques; soit : 5'-TGTTCT-3' caractéristique des récepteurs des glucocorticoïdes, de la progestérone et des androgènes et 5'-TGACCT-3' caractéristique des récepteurs de l'oestrogène, des hormones thyroïdiennes et des rétinoïdes. La distance entre ces éléments caractérise la spécificité pour un récepteur. La nature palindromique des éléments de réponse sur l'ADN démontre la dimérisation de deux récepteurs nécessaires à l'activation transcriptionnelle (Umesono et Evans, 1989). Le domaine de liaison de l'hormone sur le récepteur (LBD) est situé à la lettre E, dans la région C-terminale de la protéine et représente la région responsable de l'activité transcriptionnelle dépendante du ligand ainsi que de la dimérisation des récepteurs (Fawell *et al.*, 1990). Les récepteurs nucléaires contiennent deux fonctions d'activation transcriptionnelle, les domaines AF-1 et AF-2. Le domaine AF-1, situé dans la région N-terminale de la protéine (A/B) est responsable de l'activité transcriptionnelle constitutive du récepteur tandis que le domaine AF-2, situé

dans la région E est responsable de l'activation transcriptionnelle dépendante de la liaison de l'hormone (Tora *et al.*, 1989).



Figure 2 : Représentation schématique des différentes régions des récepteurs nucléaires. A/B-Région N-Terminale, C-Domaine de liaison à l'ADN, D-Région charnière, E-Domaine de liaison du ligand, F-Région C-Terminale.

2.2.1.1 Activité oestrogénique via le récepteur des oestrogènes

Depuis la publication de Nelson, Struck et James en 1978 démontrant qu'un métabolite du DDT, le *o,p'*-DDT, inhibe compétitivement 50 % de la liaison de l'oestradiol sur son récepteur et ce à une concentration 2000 fois supérieure à celle nécessaire au DES pour produire le même effet, plusieurs études ont démontré que des substances environnementales interagissent par l'intermédiaire du RE. De ce fait, l'activation de celui-ci représente le mécanisme le plus connu et le plus important des xénoestrogènes. Le récepteur des oestrogènes, comme les autres membres de la super-famille des récepteurs hormonaux nucléaires, agit comme facteur de transcription contrôlant l'expression de gènes réponses en se liant à son élément de réponse dans la région promotrice des gènes. Le mécanisme le plus courant de l'activation du RE est l'activation dépendante de la liaison du ligand sur le LBD. Cette liaison induit un changement conformationnel du récepteur, sa dimérisation et sa liaison sur une ERE (McKenna et O'Malley, 2002). Les domaines de transactivation AF-1 et AF-2 participent conjointement à cette activation. De plus la liaison du ligand sur le récepteur induit une hyperphosphorylation de celui-ci (Klinge, 2000). La liaison du complexe ligand-récepteur à l'ADN conduit alors au recrutement de protéines coactivatrices pour former un complexe de coactivation transcriptionnelle qui assure les interactions nécessaires avec la machinerie transcriptionnelle et le remodelage de la chromatine (Klinge, 2000). Les protéines co-activatrices incluent celles reliées à la famille de p160 soit SRC-1, GRIPI/TIF2 et AIBI/RAC3/ACTR/p/CIP ainsi que les co-activateurs CBP/p300 (CREB-

binding protein) (McKenna, Lanz et O'Malley, 1999). Ces co-activateurs possèdent différentes activités enzymatiques telles l'acétylation des histones (HAT), la ligation de l'ubiquitine et la méthylation de l'ADN permettant le recrutement de l'ARN polymérase II (Graham *et al.*, 2000). En absence de ligand ou lors de la liaison d'un antagoniste, les récepteurs hormonaux nucléaires peuvent réprimer la transcription (Lavinsky *et al.*, 1998). La répression transcriptionnelle implique plusieurs mécanismes dont le plus important consiste au recrutement de co-répresseurs tels que SMRT (Silencing mediator for retinoic acid and thyroid receptors) et N-CoR (Nuclear receptor co-repressor) (Roby, Wolffe et Wahli, 2000). Lors de leur liaison au complexe RE-ERE, les co-répresseurs répriment l'ouverture de la chromatine et bloquent la transcription par le recrutement d'un complexe contenant des déacétylases d'histones (HDAC) (Roby, Wolffe et Wahli, 2000). En plus du mécanisme d'activation dépendante du ligand, l'activation de RE est possible d'une façon indépendante de la liaison d'un ligand et implique la phosphorylation du récepteur. Par conséquent, les activateurs de kinases, tels que les facteurs de croissance EGF (epidermal growth factor), TGF α (tumor growth factor α) et IGF-1 (insulin growth factor-1) favorisent l'activation oestrogène indépendante du RE (Coleman et Smith, 2001). Finalement, d'autres mécanismes d'activation indépendante de la liaison du ligand et n'impliquant pas forcément la phosphorylation du récepteur existent. En effet, la cycline D1 a la propriété d'activer RE en interagissant directement avec SRC-1 (Zwijsen *et al.*, 1998). De plus, les ERs modulent la transcription de façon ERE-dépendante en se liant à des éléments alternatifs tels que les sites AP-1 associés à Jun et Fos (Paech *et al.*, 1997) ainsi que dans des promoteurs riches en séquences GC, soit des sites Sp1, qui sont activés par le complexe RE-Sp1 (Safe, 2001).

Il existe plusieurs isoformes de REs chez les poissons (Rotchell et Ostrander, 2003) soit RE α , RE β et ER γ (Hawkins *et al.*, 2000). Il a été suggéré que ER γ origine d'une duplication de RE β , présent chez toutes les espèces de téléostéens (Bardet *et al.*, 2002). Contrairement aux gènes de REs humains qui contiennent 8 exons/7 introns, les gènes codants pour les REs des poissons contiennent 10 exons et 9 introns (Tanenbaum *et al.*, 1998). Par contre, les mécanismes d'activation des REs chez ces espèces demeurent à investiguer (Rotchell et Ostrander, 2003). Chez les vertébrés, RE α et RE β ne sont pas

toujours exprimés de façon équivalente et conjointe ce qui laisse suggérer que chaque RE possède des fonctions biologiques distinctes bien que parfois redondantes (Couse et Korach, 1999). Les deux types de REs se retrouvent conjointement dans le système nerveux central, le tissu mammaire, le tractus urogénital, les os et les tissus vasculaires. Cependant, RE α est l'isoforme prédominant dans certains tissus tels que le tissu mammaire, l'utérus et le vagin, tandis que la prédominance de l'expression de RE β est évidente dans les ovaires, la prostate, les testicules, les poumons, l'hypothalamus et le thymus (Couse et Korach, 1999). Ces différences d'expression des REs peuvent constituer des cibles importantes pour l'action des xénoestrogènes. Conséquemment, un composé peut être agoniste dans un tissu et antagoniste dans l'autre, tel est le cas du tamoxifène. De ce fait, le pouvoir oestrogénique d'une substance ne peut être attribué exclusivement à la substance mais aussi au contexte cellulaire. La localisation des ERs dans les gonades de poissons mâles et femelles a récemment été effectuée chez plusieurs espèces. Chez la truite arc-en-ciel mâle, RE α est présent tout au long du cycle reproductif annuel dans l'interstitium testiculaire (Bouma et Nagler, 2001). De plus, chez le tambour brésilien, les trois isoformes de REs (α , β et γ) ont été identifiées dans les testicules (Hawkins *et al.*, 2000). Il a aussi été démontré que RE α et RE β sont présents dans les cellules germinales et non germinales du testicule de barbu de rivière (Wu *et al.*, 2001). Chez les femelles, la présence des isoformes RE α et RE β a été identifiée chez plusieurs espèces dont le tilapia (Chang *et al.*, 1999) et le barbu de rivière (Xia *et al.*, 2000). Par contre, la truite arc-en-ciel est caractérisée par la seule présence de RE α dans les ovaires, plus particulièrement au dernier stade de la vitellogénèse (Nagler, Krisfalusi et Cyr, 2000).

Plusieurs xénoestrogènes possèdent le pouvoir de lier le récepteur aux œstrogènes avec une affinité approximativement 10^4 à 10^6 moins importante que l'oestradiol (Kirk *et al.*, 2003). Entre autres, l'insecticide Chlordécone interagit avec le récepteur aux œstrogènes utérins de rat (Hammond *et al.*, 1979). Certains BPCs ont la possibilité d'inhiber la liaison de l'oestradiol à son récepteur (Korach *et al.*, 1988). De plus, certains composés n'ayant aucune affinité pour RE en possèdent lorsqu'ils sont métabolisés. En effet, le dérivé diméthylé du méthoxychlore lie RE tandis que le méthoxychlore lui-même ne

possède aucune affinité pour RE dans les cytosols utérins de rats (Bulger, Muccitelli et Kupfer, 1978). Les alkylphénols sont une autre classe de composés qui inhibent la liaison de l'oestradiol à son récepteur, de plus, il a été démontré que ceux-ci sont en mesure de déplacer l'oestradiol préalablement lié à son récepteur (White *et al.*, 1994). En plus des composés de fabrication humaine, plusieurs phytoestrogènes lient RE et affectent la reproduction animale et humaine (Danzo, 1998). Finalement, il a récemment été démontré que les alkylphénols (4-*t*-octylphénol et 4-nonylphénol) possèdent une affinité plus importante pour le RE α du choquemort que pour le RE α humain (Urushitani *et al.*, 2003). Cette observation suggère une plus grande susceptibilité de ces espèces pour les xénoestrogènes.

2.2.1.2 Activité anti-androgénique via le récepteur des androgènes (RA)

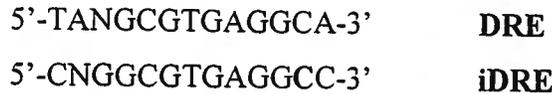
Certains xénoestrogènes agissant par l'intermédiaire de récepteurs nucléaires sont caractérisés par leur action antagoniste. Tel est le cas des composés qui antagonisent l'action du récepteur aux androgènes. La subséquente inhibition du récepteur peut être classifiée de compétitive dans le cas où l'agoniste endogène et l'antagoniste exogène compétitionnent pour un même site de liaison ou encore de non compétitive lorsque l'inhibiteur lie le récepteur ou le complexe ligand-récepteur sur un autre site de liaison. Conséquemment, la possibilité que des substances, identifiées pour leur caractère oestrogénique *in vivo* soient, en fait, des substances anti androgéniques a été suspectée par le groupe de Gray, Ostby et Kelce, (1994). Ces auteurs ont découvert qu'une variété de substances, plus particulièrement des pesticides, sont des anti-androgènes. Parmi les antagonistes du récepteur aux androgènes, on note le métabolite persistant du DDT (*o,p'*-DDE) (Danzo, 1997), les métabolites (M1 et M2) de la Vinclozolin (Gray, Ostby et Kelce, 1994, Gray *et al.*, 1999), l'herbicide Linuron (Cook *et al.*, 1993), l'herbicide Lindane (Simic *et al.*, 1991), le pesticide Fenitrothion (Sohohi *et al.*, 2001) et certains contaminants persistants tels les BPCs (Gray et Kelce, 1996). De plus, la Vinclozolin (Wong *et al.*, 1995) et le Fenitrothion (Sohohi *et al.*, 2001) possèdent des activités agonistes ou antagonistes, dépendamment du contexte hormonal. En effet, lorsque testées seules, ces substances agissent comme des agonistes du récepteur aux androgènes, par

contre, en présence de DHT, ils antagonisent l'androgène de façon compétitive. Deux isoformes du récepteur aux androgènes ont été caractérisées chez plusieurs espèces de poissons dont le tambour brésilien (Sperry et Thomas, 2000) et la truite arc-en-ciel (Takeo et Yamashita, 1999). Ces deux isoformes sont distribuées différemment à l'intérieur de ces espèces. RA1 (RA α) est exprimés dans plusieurs organes (branchies, cœur, reins, rate, foie, muscles, testicules et cerveau) et présentent une haute affinité pour la 11-kétotestérone et peu d'affinité pour différents anti-androgènes. Par contre, l'isoforme RA2 (RA β), présente plus spécifiquement dans les gonades et le cerveau, démontre une affinité plus large pour différents composés androgéniques et anti-androgéniques (Sperry et Thomas, 2000).

2.2.1.3 Activité anti-oestrogénique et liaison au récepteur Ah (Aryl Hydrocarbone) (AhR)

Le récepteur Ah constitue un déterminant essentiel de la médiation, à l'échelle moléculaire, de la toxicité de plusieurs polluants environnementaux. En effet, 250 ligands ont été identifiés dont 75 dioxines (Colborn, vom Saale et Soto, 1993). En contrepartie, aucun ligand endogène n'a été identifié. Son ADN complémentaire connu depuis 1992, révèle des domaines de forte homologie avec les protéines Per et Sim de *Drosophila melanogaster*. Le motif b-HLH-PAS (Basic Helix-Loup-Helix-Per-AhR-Sim) caractérise les membres d'une nouvelle super-famille de récepteurs nucléaires incluant Arnt (AhR nuclear translocator), partenaire d'hétérodimérisation de AhR (Klinge, Kaur et Swanson, 2000). En absence de ligand, AhR est présent sous forme quiescente, complexé à hsp90, dans le cytosol (Pratt, 1997). Cette protéine chaperon agit sur les segments b-HLH et PAS pour préserver la capacité d'interaction avec l'ADN, la fonctionnalité du site de fixation du ligand ainsi que la capacité d'hétérodimérisation avec Arnt (Coumailleau *et al.*, 1995). De plus, AhR est complexé à des protéines dont AIP (Ahr-interacting protein) et ARA9 (Ah-receptor activated), des immunophilines (Carver et Bradfield, 1997). Le domaine de fixation du ligand d'AhR est rendu fonctionnel par phosphorylation d'un résidu tyrosine. La liaison d'un ligand désunit AhR et hsp90 et permet la translocation du complexe dans le noyau cellulaire et le recrutement de co-activateurs. Sous sa forme

activée, AhR engage une hétérodimérisation nucléaire avec Arnt. Ce complexe, suivant la reconnaissance spécifique d'un motif DRE (Dioxin Response Element) ou iDRE (DRE inhibiteur) :



exerce une transactivation génique (Safe *et al.*, 1998). Les effets reliés au récepteur Ah sont essentiellement anti-oestrogéniques et impliquent une communication croisée entre celui-ci et le récepteur aux œstrogènes. La plupart des travaux effectués sur le potentiel anti-oestrogénique des ligands du récepteur Ah ont été effectués par le groupe de Safe dans la lignée cellulaire de cancer du sein (MCF-7). En effet, les dioxines et autres ligands de Ah inhibent les réponses cellulaires reliées à l'oestradiol telles la prolifération cellulaire, l'expression de la cathepsine D par l'inhibition de l'interaction entre RE et le facteur de transcription Sp1 (Krishnan *et al.*, 1995) et l'activation cellulaire du plasminogène (Safe, 1995). Ces effets sont associés à la liaison du complexe ligand-récepteur sur une DRE. Les effets reliés à la liaison sur une iDRE incluent l'inhibition de l'induction de pS2 et de c-fos par l'oestradiol (Safe *et al.*, 1998). De plus, les dioxines causent une rapide diminution des niveaux nucléaire de RE ainsi qu'une augmentation du métabolisme oxydatif de l'oestradiol par l'activation de l'activité monooxygénase (EROD : éthoxyrésorufine O-dééthylase) dépendante du cytochrome P450 1A1 (Safe *et al.*, 1998).

2.2.1.4 Action non génomique via des récepteurs stéroïdiens membranaires

Contrairement aux mécanismes relativement bien connus de l'action génomique des oestrogènes et des xénoestrogènes, l'action non génomique, plus particulièrement les mécanismes qui impliquent des récepteurs membranaires sont, quant à eux, moins bien connus. Les évidences d'une action non génomique ne faisant pas intervenir les récepteurs nucléaires RE α et RE β proviennent premièrement du temps de réponse considéré trop rapide pour donner place aux événements de transcription et de traduction. Ensuite, la signalisation non génomique provoque des réponses cellulaires qui sont réfractaires aux inhibiteurs de la transcription et de la traduction (Thomas, 2000). Des

récepteurs stéroïdiens membranaires ont récemment été identifiés dans une variété de tissu incluant le cerveau, l'hypophyse, les os, les reins, le foie, les gonades et les gamètes (Thomas, 2000). En 1999, une étude a démontré la liaison de plusieurs xénobiotiques oestrogéniques sur le récepteur membranaire du $20\beta,21$ -trihydroxy-4-pregn-3-one (20β -S). Ce progestogène est responsable de la maturation méiotique des ovocytes chez la courbine (Das et Thomas, 1999). Ces composés incluent le chlordecone, le *o,p'*-DDD, le méthoxychlore et plusieurs BPCs hydroxylés et démontrent une inhibition compétitive de 20β -S sur son récepteur. Ce récepteur est également présent sur les spermatozoïdes du tambour brésilien et les xénoestrogènes (chlordecone, BPC, *o,p'*-DDE) inhibent la motilité des spermatozoïdes induite par 20β -S (Thomas, 2000). Récemment, le récepteur 20β -S a été cloné et présente sept passages transmembranaires caractéristiques des récepteurs couplés aux protéine G (Zhu *et al.*, 2003). Reporté pour la première fois en 1977 par Pietras et Szego, le récepteur oestrogénique membranaire est associé à une mobilisation du Ca^{2+} intracellulaire, la génération d'AMP (Adénosine Mono-Phosphate) cyclique et l'activation de la cascade des MAP (Mitogen Activated Protein) Kinases (Zhang *et al.*, 2002). Ce récepteur a été identifié dans des testicules de tambour brésilien et l'œstrogène agit sur celui-ci de façon à réguler négativement de la production de 11-kétotestostérone stimulée par les gonadotrophines. Une variété de xénoestrogènes lie le récepteur oestrogénique membranaire chez cette espèce avec une affinité semblable à celle obtenue pour la liaison aux récepteurs nucléaires des oestrogènes (Loomis et Thomas, 2000). Chez l'humain, un récepteur aux œstrogènes a été identifié à la membrane plasmique des spermatozoïdes. Par contre, les xénoestrogènes bisphénol A et octylphénol ne provoquent aucune inhibition sur l'influx de Ca^{2+} intracellulaire (Luconi *et al.*, 2001). Finalement, la liaison membranaire des androgènes a été décrite dans les testicules, le foie et la prostate de rats mâles (Konoplya et Popoff, 1992) ainsi que dans les ovaires de tambour brésilien (Braun et Thomas, 2003). De plus, les métabolites de l'agent anti-fongique Vinclozoline (M1 et M2) dont l'activité anti-androgénique sur le récepteur nucléaire aux androgènes est bien connue, possèdent aussi une affinité pour le récepteur membranaire identifié dans les ovaires du tambour brésilien, ce qui suggère que plusieurs substances aux propriétés anti-androgéniques puissent agir de cette façon (Braun et Thomas, 2004).

2.2.2 Interaction indirecte avec le système endocrinien

Les mécanismes d'action des xénoestrogènes caractérisés par des actions indirectes sur le système endocrinien incluent des altérations aux niveaux des enzymes de biosynthèse, de métabolisme ou d'élimination de l'œstrogène. Aussi, certains xénoestrogènes produisent leurs effets néfastes par une modification de l'expression du récepteur de l'œstrogène ou des protéines de transport de celle-ci. De plus, le synergisme entre certains composés oestrogéniques représente un mécanisme important.

2.2.2.1 Altération de la synthèse ou du métabolisme de l'œstrogène

Un nombre important d'enzymes est impliqué dans la synthèse et le métabolisme de l'œstrogène. Certains xénoestrogènes modulent la concentration plasmatique en œstrogène en altérant la fonction de ces enzymes.

2.2.2.1.1 Les enzymes de biosynthèses des stéroïdes

Bien que plusieurs études relatent une modification du profil stéroïdien suite à l'exposition aux xénoestrogènes, peu d'études existent sur les mécanismes associés à l'altération de la stéroïdogénèse. Par contre, un des mécanismes les plus étudiés concerne les effets des xénoestrogènes sur l'expression de l'enzyme aromatase (CYP19). Le cytochrome P450 aromatase est une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'œstrogène. Elle catalyse la conversion des androgènes (C-19) en œstrogènes (C-18), l'étape finale de la biosynthèse des oestrogènes. Son expression est donc cruciale à la modulation de la concentration en oestrogènes et des processus contrôlés par ceux-ci. Plusieurs études ont démontré l'important rôle de l'aromatase dans la différenciation sexuelle et le développement des gonades. En effet, l'exposition à un inhibiteur non stéroïdien de l'aromatase (Fadrozole) résulte en une masculinisation des femelles boltis (Kwon *et al.*, 2000). Chez les poissons, le cytochrome P450 aromatase est préférentiellement exprimé dans les gonades et le système nerveux. De plus, deux

isoformes de l'aromatase ont été décrites chez ces vertébrés : P450 AromA (CYP19A) et B (CYP19B) (Tchoudakova et Callard, 1998). Chez le poisson rouge, P450 AromB est restreinte aux tissus nerveux (Tchoudakova et Callard, 1998) tandis que chez le bolitis (Kwon *et al.*, 2000) et le poisson zèbre (Kishida et Callard, 2001), cette isoforme est exprimée dans les tissus nerveux et les gonades. En accord avec le développement précoce du SNC (Système Nerveux Central) et des gonades, l'initiation de la transcription de ces deux isoformes se produit très tôt après la fécondation (12-24 heures) chez le poisson zèbre, par contre, au cours du développement, ces deux isoformes possèdent des profils d'expression différents (Kishida et Callard, 2001). La fonction spécifique de ces deux isoformes demeurent à déterminer, par contre, P450 AromA semble l'isoforme responsable de la médiation de la différenciation sexuelle (Kwon, McAndrew et Penman, 2001). De plus, des niveaux élevés de P450 AromA dans les ovaires de barbu de rivière sont retrouvés au cours du processus de vitellogénèse (Trant *et al.*, 1997) L'aromatase, tout comme les autres enzymes impliquées dans la biosynthèse des stéroïdes, est susceptible d'être la cible de modulateurs endocriniens. Tout comme les membres de la famille des cytochromes P450, la transcription de l'aromatase est induite par les composés exogènes d'une façon dépendante de la liaison de ces composés sur un récepteur. Ceux-ci incluent les récepteurs pregnane X et androstane, qui sont exprimés constitutivement à l'intérieur des organismes et affectent l'expression du gène CYP19 (Min, Lee et Gu, 2003). En effet, l'exposition de medaka japonais aux 17 β -oestradiol, nonylphénol et bisphénol A résulte en une augmentation des niveaux d'ARNm de CYP19 hépatique (Min, Lee et Gu, 2003). De plus, un traitement à des concentrations de 17 β -oestradiol susceptibles de se retrouver dans l'environnement cause une augmentation des niveaux de P450 AromB dans les gonades de tête-de-boule mâles et femelles (Halm *et al.*, 2002). Au niveau du SNC, l'exposition d'embryons de poissons zèbre aux 17 β -oestradiol, DES et bisphénol A cause une augmentation des niveaux de P450 AromB, la forme prédominante retrouvée au cerveau (Kishida *et al.*, 2001). D'un autre côté, certains fongicides (Vinclozolin, Tributylétain) ainsi que certains phytoestrogènes (isoflavones), présents dans l'environnement inhibent l'activité aromatase (Vinggaard *et al.*, 2000b) et provoquent une augmentation des concentrations d'androgènes.

Parmi les autres enzymes impliquées dans la biosynthèse des stéroïdes, les mécanismes étudiés incluent l'expression de la protéine StAR et les enzymes P450ssc (side chain cleavage), 3, 11, 17 β -HSD et CYP17 (17 α -hydroxylase). La protéine StAR (Steroidogenesis Acute Regulatory protein) régule le transfert du cholestérol dans la mitochondrie et représente l'étape limitante dans la synthèse des stéroïdes. Dans la lignée cellulaire cancéreuse de cellules de Leydig de souris (MA-10), Walsh et Stocco, (2000) ont démontré que l'isomère γ du HCH (Lindane) cause une diminution dose-dépendante de l'expression de la protéine altérant ainsi la synthèse de la testostérone. L'inhibition de l'expression de cette protéine par les xénoestrogènes est un mécanisme important du fait que cette protéine est exprimée en réponse à une stimulation hormonale et en quantité limitée. De plus, un traitement au méthoxychlore cause une inhibition de la production de testostérone par les cellules de Leydig de rats en inhibant l'enzyme P450ssc responsable de l'initiation de la stéroïdogénèse. Cette enzyme catalyse la formation de la prégnénolone à partir du cholestérol dans la mitochondrie (Akingbemi *et al.*, 2000). Par contre, l'exposition de truite arc-en-ciel mâle au 17 β -oestradiol affecte grandement le développement testiculaire mais aucun changement dans l'expression de P450ssc n'est observé (Govoroun *et al.*, 2001). Les enzymes hydroxystéroïdes dehydrogénases (HSD) catalysent la dehydrogénation des stéroïdes. Le traitement de truite arc-en-ciel mâle par le 17 β -oestradiol cause une diminution considérable des niveaux d'ARNm de 3 et 11 β -HSD. L'enzyme 3 β -HSD est impliquée dans la conversion de la prégnénolone en progestérone tandis que la 11 β -HSD catalyse la conversion du 11-hydroxytestostérone en 11-kétotestostérone, l'androgène majeur chez les téléostéens (Govoroun *et al.*, 2001). De plus, dans des microsomes de placenta humain, certains phytoestrogènes isoflavones inhibent les enzymes 3 et 17 β -HSD (conversion de l'oestrone en oestradiol) (Le Bail *et al.*, 2000). Finalement, l'inhibition de CYP17 (17 α -hydroxylase), responsable de l'hydroxylation de la prégnénolone et de la progestérone, par le nonylphénol a été rapportée dans des cellules de foie humain (Niwa *et al.*, 2002). Cette enzyme est également inhibée dans les testicules de truite suivant un traitement au 17 β -oestradiol (Govoroun *et al.*, 2001).

2.2.2.1.2 Les conjugaisons aux glucuronides et sulfates

Les mécanismes de détoxification de phase II servent généralement à augmenter l'hydrophilicité des xénobiotiques et des substances endogènes afin de faciliter leurs excréctions. Parmi ces mécanismes se retrouvent la glucuronidation et la sulfatation. Relativement peu d'études ont porté sur la glucuronidation des xénobiotiques chez les poissons. Néanmoins, l'expression de plusieurs isoformes d'UDP-glucuronosyltransférase a été démontrée chez la plie (Clarke, George et Burchell, 1992). De plus, Yokota, Miyashita et Yuasa, (2002) rapportent la présence du métabolite bisphénol A-glucuronide dans les intestins de carpes exposées au bisphénol A. Par contre, contrairement à l'étude de Coldham *et al.*, (1998) où des métabolites glucuronides du 4-nonylphénol ont été identifiés chez la truite arc-en-ciel, dans cette étude, l'exposition aux alkylphénols (octyl et nonylphénol) ne conduit pas à l'excrétion de conjugués glucuronides. Ceci suggère des différences inter espèces pour la biotransformation des xénoestrogènes et donc l'accumulation potentielle des alkylphénols chez la carpe. L'étude de Van den Hurk *et al.*, (2002) a de plus identifié les BPCs hydroxylés comme étant des inhibiteurs de la glucuronosyltransférase chez le barbu de rivière. Les auteurs mentionnent l'importance de cette inhibition sur la biodisponibilité et la toxicité des substances présentes avec les BPCs dans l'environnement.

La conjugaison à des résidus sulfates représente une route majeure de biotransformation et d'excrétion pour les xénobiotiques et les hormones stéroïdiennes et thyroïdiennes. Cette conjugaison est accomplie par les sulfotransférases (ST) cytosoliques qui catalysent le transfert d'un groupement sulfonate du 3'-phosphoadénosine-5'-phosphosulfonate (PAPS) sur un substrat hydroxyl ou amine (Harris *et al.*, 2000b). La sulfatation des oestrogènes est indispensable à la régulation de la quantité d'hormones circulantes. Cette étape représente la voie majeure d'élimination des oestrogènes et est responsable de la création de composés oestrone sulfates pouvant être reconvertis en oestrogènes dans les tissus périphériques. L'inhibition ou la compétition pour l'enzyme (s) oestrone sulfotransférase résulte en une augmentation des niveaux circulants d'oestrogènes. L'activité sulfotransférase a été identifiée chez plusieurs espèces de poissons incluant le

barbu de rivière (Tong et James, 2000), le poisson zèbre (Ohkimoto *et al.*, 2003) ainsi que le chevaine (Kirk *et al.*, 2003). En effet, Kirk *et al.* (2003) ont démontré la présence de deux STs conjuguant les stéroïdes oestrogéniques chez le chevaine. Dans cette étude, les alkylphénols inhibent la sulfatation de l'oestrone, ceux aux longues chaînes (octyl et nonylphénol) étant les plus puissants. De plus, chez le poisson zèbre, les xénoestrogènes (bisphénol A, 4-*n*-octylphénol et 4-*n*-nonylphénol) et les phytoestrogènes isoflavones inhibent la sulfatation des œstrogènes d'une façon compétitive (Ohkimoto *et al.*, 2003, 2004).

2.2.2.2 Variation des niveaux de récepteurs aux oestrogènes (RE)

En plus du mécanisme par lequel les xénoestrogènes induisent des effets par leur liaison avec le récepteur aux oestrogènes, certains de ces composés agissent par l'intermédiaire de celui-ci en modifiant les niveaux du récepteur lui-même. En effet, tel que mentionné plus haut, dans les cellules cibles, l'oestradiol et certains xénoestrogènes lient le récepteur aux oestrogènes. Ce complexe se dirige ensuite vers une ERE où il contrôle l'expression de gènes réponses. Conséquemment, une altération de l'expression de RE cause une modification de l'expression de gènes réponses. Il a été démontré que l'induction hépatique de VTG est dépendante des niveaux de RE chez la truite arc-en-ciel (Flouriot *et al.*, 1997). Étant donné la présence d'une ERE dans la séquence du promoteur de RE chez la truite arc-en-ciel, l'exposition à l'oestradiol ainsi qu'aux composés mimants l'oestradiol sur RE cause un changement dans l'expression de celui-ci (Flouriot *et al.*, 1997). De ce fait, l'exposition au 4-nonylphénol résulte en une augmentation dose-dépendante des niveaux de RE chez le saumon atlantique (Yadetic *et al.*, 1999). Dans le même ordre d'idée, Min, Lee et Gu, (2003) ont démontré une augmentation des niveaux d'ARNm de RE chez les mâles et les femelles medaka japonais exposés aux 17 β -oestradiol, nonylphénol et bisphénol A. Dans les lignées cancéreuses de cellules mammaires (T47D-dépendante d'E2 et BT20-indépendante d'E2), Cappellitti *et al.* (2003) ont observé une augmentation marquée de l'expression de RE β ainsi qu'une faible augmentation de l'expression de RE α suite à l'exposition au 17 β -oestradiol et aux xénoestrogènes (bisphénol A, 4-*tert*-octylphénol, 2-hydroxybiphényl, 4-

hydroxybiphényl). Ces résultats indiquent un rôle important pour RE β dans la médiation de la toxicité des xénoestrogènes. De plus, la régulation à la hausse de RE β se produisait uniquement en présence de RE α , ce qui suggère un rôle pour RE α dans la régulation de la transcription de RE β . Finalement, les hormones stéroïdiennes telles les oestrogènes et les glucocorticoïdes influent sur la stabilité des ARNm. En effet, la présence d'oestrogènes diminue la demi-vie des REs de 4 heures chez des cellules MCF-7 contrôles à 40 minutes pour les cellules traitées (Saceda *et al.*, 1998). Il est alors possible que le même phénomène se produise en présence de xénoestrogènes; la hausse de l'expression du récepteur serait alors un équilibre entre les produits de synthèse et de dégradation.

2.2.2.3 Liaison aux protéines de transport et biodisponibilité des stéroïdes

Chez la plupart des vertébrés, les stéroïdes sexuels sont transportés dans la circulation sanguine en association avec des protéines plasmatiques produites par le foie. La protéine SHBG (Sex-Hormone-Binding Globulin), dont la synthèse est induite par l'oestradiol, lie les stéroïdes avec grande affinité tandis que les protéines CBG (Corticosteroid-Binding Globulin) et l'albumine les lient avec moindre affinité. De plus, la protéine ABP (Androgen-binding Protein), produite par les cellules de Sertoli lie les androgènes et se retrouve principalement confinée dans les testicules et l'épididyme (Hammond et Bocchinfuso, 1995). Entre 97 et 99 % des stéroïdes sexuels sanguins sont liés aux protéines plasmatiques, la liaison à SHBG représente entre 40 et 70 % de ces liaisons (Tollefsen *et al.*, 2002). La liaison aux protéines plasmatiques assure non seulement le transport sanguin mais protège contre la dégradation métabolique et régule la fraction hormonale libre. En plus du rôle de transporteur qui leur est attribué, SHBG et ABP sont impliquées dans la signalisation cellulaire associée aux récepteurs nucléaires. En effet, un récepteur membranaire a été identifié et appartient à la classe des récepteurs associés aux protéines G et donc impliqué dans les mécanisme dépendant d'AMP cyclique tels la prolifération cellulaire (Joseph, 1994). Il a été démontré que certains xénoestrogènes lient SHBG et ABP (Danzo, 1997). Par conséquent, la liaison aux protéines plasmatiques et la liaison au récepteur SHBG et ABP procurent deux autres mécanismes d'action des

xénoestrogènes. En effet, la liaison de composés oestrogéniques sur ces protéines de transport peut provoquer l'activation ou l'inhibition de la cascade associée au récepteur. De plus, les xénoestrogènes liés n'étant pas disponibles pour la liaison au récepteur nucléaire, des effets moindres pourraient être attribués à ces substances. Par contre, la compétition entre l'hormone endogène et les xénoestrogènes pour les protéines plasmatiques résulte en une augmentation de la fraction hormonale libre. D'autres xénoestrogènes, tels le DES, ne lient pas SHBG et possèdent une biodisponibilité importante pour la liaison au récepteur nucléaire, ce qui explique partiellement l'important pouvoir oestrogénique de cette substance (Danzo, 1998). Chez le saumon atlantique, Tollefsen *et al.*, (2002) ont démontré que non seulement le di-n-butyl-phtalates ainsi que l'éthinylestradiol lient compétitivement SHBG mais provoquent une augmentation des niveaux circulants de la protéine. De plus, lors d'une étude portant sur la SHBG humaine, Dechaud *et al.*, (1999) ont démontré que plusieurs xénoestrogènes synthétiques dont 4-nonylphénol, 4-*tert*-octylphénol, bisphénol A et o-hydroxybiphényl ainsi que les phytoestrogènes genisten et naringenin lient SHBG de façon compétitive et réversible, augmentant ainsi les niveaux de testostérone et d'oestradiol libre dans le plasma.

2.2.2.4 Addition et synergisme entre xénoestrogènes

Malgré qu'il y ait plusieurs évidences qui suggèrent que les xénoestrogènes soient à l'origine d'effets néfastes chez la faune et les humains, il est difficile d'établir un lien direct entre les effets et l'exposition aux composés oestrogéniques dû au fait que les substances suspectes possèdent un faible pouvoir oestrogénique par rapport au 17 β -oestradiol. De plus, évaluer la toxicité sur la base d'un seul composé diffère de l'exposition normale dans l'environnement où des mélanges de plusieurs composés co-existent. Il est donc concevable que les contaminants environnementaux présents interagissent ensemble d'une façon à augmenter leur oestrogénicité. Les termes synergisme, additivité et antagonisme sont employés lors de la définition des effets d'un mélange de substances. Lorsque les effets observés excèdent les effets attendus, on parle de synergisme, en cas contraire, d'antagonisme. Lorsque les effets reflètent ceux

attendus, ils sont additifs (Hayes, 2001). Par contre, la conception qui veut que les effets d'un mélange égalent la somme des effets de chaque composé n'est vraie qu'en présence de substances démontrant une courbe dose-réponse linéaire, ce qui est rarement le cas pour les xénoestrogènes. En présence de courbe sigmoïdale, l'emploi de l'addition des concentrations représente le modèle le plus employé (Payne *et al.*, 2000) Une étude de Arnold *et al.*, (1996) indiquait un fort synergisme entre un mélange binaire de plusieurs pesticides faiblement oestrogéniques incluant l'endosulfane, le dieldrine, le toxaphène et le chlordane. Néanmoins, devant l'impossibilité par plusieurs laboratoires de confirmer ces résultats (Ramamoorthy *et al.*, 1997), cet article fut retiré de la littérature (McLachlan, 1997). Cependant, plusieurs études démontrent avec efficacité l'additivité et la synergie entre les composés d'un mélange. Soto, Chung et Sonnenschein, (1994) ont démontré la stimulation de la prolifération des cellules MCF-7 en présence d'un mélange de dix composés oestrogéniques à un niveau où chaque composé seul ne produisait aucun effet. Kristensen *et al.*, (1995) font état de synergisme entre le plomb et le benzo-a-pyrène sur l'atteinte à la fertilité chez des souris. Ils observent une augmentation du temps de gestation et une diminution du nombre de naissances lorsque les mères sont exposées au mélange. Vonier *et al.*, (1996) ont évalué la capacité de plusieurs contaminants environnementaux qui à eux seuls n'interagissent pas avec le récepteur de l'oestrogène de l'alligator à inhiber la liaison de l'oestradiol sur son récepteur. Un mélange de substances à des concentrations environnementales présentes dans le lac Apopka inhibe à soixante pourcent la liaison de l'oestradiol à son récepteur et ce, de façon synergique. Dans une étude utilisant une levure contenant le récepteur à l'estrogène humain, Payne *et al.*, (2000) ont évalué la réponse oestrogénique des composés : *o,p'*-DDT, génisten, 4-nonylphénol et 4-*n*-octylphénol. Après avoir caractérisé la courbe dose-réponse de chaque composé, ils ont prédit avec efficacité l'additivité des effets de ces quatre composés en mélange. Finalement, Rajapakse, Silva et Kortemkamp, (2002) ont attiré l'attention sur le fait que certains xénoestrogènes à une concentration où aucun effet n'est observé lorsque le composé est testé seul, possèdent la capacité, lorsque mélangés ensemble et avec l'oestradiol, d'augmenter l'impact de l'oestradiol de façon additive.

En conclusion, il existe plusieurs mécanismes par lesquels les xénoestrogènes peuvent exercer leurs effets, certains dépendent du contexte cellulaire ou de la période de développement. De plus, diverses espèces demeurent plus susceptibles que d'autres à un mécanisme en particulier. Finalement, l'effet du mélange de plusieurs composés ne doit pas être négligé.

CHAPITRE 3

PRINCIPAUX EFFETS D'UNE EXPOSITION AUX XÉNOESTROGÈNES SUR LE SYSTÈME REPRODUCTEUR DU POISSON

3.1 Endocrinologie reproductive du poisson

De par l'étendue de sa fonction, le système endocrinien est fondamentalement similaire chez tous les vertébrés. Par contre, certaines divergences existent et les différentes espèces de poissons, bien que quelquefois caractérisées par des différences, possèdent une endocrinologie semblable (Power, Ingleton et Clark, 2002). L'endocrinologie reproductive des poissons est gouvernée par des mécanismes qui impliquent une communication étroite entre les systèmes (Figure 3). Chez les espèces gonochoriques qui se reproduisent une fois l'an, un ensemble de facteurs hormonaux et physiologiques assure la survenue de la reproduction au temps opportun à la survie des petits. L'influence de facteurs environnementaux telles que la photopériode, la température et la disponibilité de nourriture sur l'hypothalamus provoquent la libération de GnRH (Gonadotropin releasing hormone). Celle-ci stimule l'hypophyse à libérer les gonadotrophines (GtH) qui induisent la synthèse des stéroïdes dans les gonades. Deux formes de GtH ont été identifiées chez certaines espèces dont le saumon coho (Swanson *et al.*, 1991). Ces gonadotrophines sont des hétérodimères composés d'une sous unité α et β . GtH1 et GtH2 sont les homologues de l'hormone folliculo-stimulante (FSH) et lutéinisante (LH) des mammifères. GtH1 est impliquée dans la gamétogenèse et la stéroïdogénèse tandis que GtH2 est impliquée dans la maturation finale des gamètes (Arukwe, 2001).

Chez les téléostéens, la croissance des ovocytes chez les femelles est normalement répartie en quatre stades : la croissance primaire, la formation de l'alvéole corticale, la vitellogénèse et la maturation finale (Arukwe et Goksøyr, 2003). Ces différentes étapes permettent la division mitotique des cellules germinales, la formation du follicule ovarien et l'entrée dans la cellule de l'apport nutritif nécessaire à l'embryon. Les ovocytes

primaires sont arrêtés en phases G2/M et l'aboutissement de la méiose résulte en ovocyte secondaire. La survenue de la seconde méiose permet l'obtention de l'œuf. Au niveau hormonal, les niveaux circulants de GtH1 augmentent au cours du développement de l'ovocyte et l'hormone se lie à des récepteurs sur la membrane des cellules thécales et de la granulosa du follicule. Au cours du processus de vitellogenèse, les cellules thécales sont responsables de l'entrée du cholestérol et de la synthèse de la testostérone qui traverse la lame basale pour atteindre la granulosa. Les cellules de la granulosa possèdent, dans leurs fractions microsomiales, une activité aromatasase qui catalyse la conversion de la testostérone en oestradiol et de l'androstènedione en oestrone (Cyr et Eales, 1996). Il a de plus été démontré que la triiodotyronine (T3) amplifie les effets de GtH1 sur la synthèse d'oestradiol par le follicule chez les truites arc-en-ciel (Cyr et Eales, 1988). Une fois sécrétée dans le plasma, l'oestradiol est transporté en association à SHBG, diffuse ensuite dans les cellules hépatiques et, par sa liaison à son récepteur nucléaire et la liaison du complexe sur une ERE, induit la synthèse de la VTG et des protéines chorioniques (*zona radiata et pellucida*) (ZRP) (Figure 4). Malgré qu'une ERE soit identifiée dans la séquence promotrice du gène de la VTG, aucune ERE n'a encore été identifiée dans la séquence des protéines zonas des téléostéens. Par contre, leur expression en réponse à l'oestradiol est similaire à celle de la VTG et il est possible que des éléments de réponses soient masqués ou encore subtilement différents (Arukwe et Goksøyr, 2003). Le processus de vitellogenèse implique plusieurs changements métaboliques et énergétiques chez la femelle dont l'augmentation du volume hépatique, la déposition de lipides, la déplétion du glycogène ainsi que l'augmentation du contenu en magnésium, calcium et phosphoprotéines (Arukwe et Goksøyr, 2003). Par ailleurs, les niveaux plasmatiques des hormones thyroïdiennes diminuent au cours de ce processus afin de circonscrire les réserves énergétiques au développement gonadique (Cyr *et al.*, 1988). La VTG est sécrétée dans le plasma et incorporée dans l'ovocyte par endocytose de son récepteur. À la fin du processus de vitellogenèse, les niveaux circulants de GtH1 diminuent alors que l'on observe une augmentation des niveaux de GtH2 qui stimule la synthèse de 20β -S, responsable de la maturation méiotique des ovocytes. Ce progestogène induit une inhibition de l'activité adénylate cyclase et une diminution

subséquentes des niveaux d'AMPc nécessaires à la maturation finale des ovocytes (Das et Thomas, 1999).

Chez les mâles, la progression de la spermatogenèse peut être divisée en six stades. Les testicules sont composés de kystes contenant les cellules germinales et d'espaces interstitiels composés de cellules myoïdes ou péricubulaires. La spermatogenèse se déroule au cours des stades deux à cinq où les kystes augmentent en volume et l'espace interstitiel s'amointrit. Le nombre de spermatogonies diminue dû à leur développement en spermatocytes. Finalement, les spermatocytes subissent une méiose et deviennent des spermatides et éventuellement des spermatozoïdes. Le dernier stade est celui de la spermiation (Bouma et Nagler, 2001). Au niveau hormonal, GtH1 est élevée tout au long de la spermatogenèse et diminue au moment du frai. Contrairement, GtH2 est maintenue à un faible niveau et augmente au cours du frai (Nagahama, 1994). De ce fait, chez les téléostéens, comme chez les autres vertébrés, la spermatogenèse est essentiellement régulée par les gonadotrophines et les stéroïdes sexuels. Les gonadotrophines stimulent la production des androgènes par les cellules de Leydigs et par le fait même la spermatogenèse (Nagahama, 1994). L'androgène majeur chez la plupart des espèces de téléostéens est la 11-kétotestostérone (Kime, 1999). De plus, 20β -S joue un rôle majeur dans le processus final de la maturation des spermatozoïdes, dans la spermiation ainsi que dans l'acquisition de la motilité des spermatozoïdes (Amer *et al.*, 2001, Miura *et al.*, 1991). Finalement, l'oestradiol, produite par les testicules ou par l'aromatization locale des androgènes exerce non seulement un rôle dans la régulation de l'axe hypothalamo-hypophyse-gonades mais aussi un rôle dans la maturation du testicule et/ou des gamètes (Amer *et al.*, 2001). En effet, la présence de plusieurs isoformes de REs dans les testicules et les gamètes de diverses espèces (Bouma et Nagler, 2001, Hawkins *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2001) suggèrent un rôle majeur pour l'oestradiol dans la progression de la spermatogenèse et le développement testiculaire.

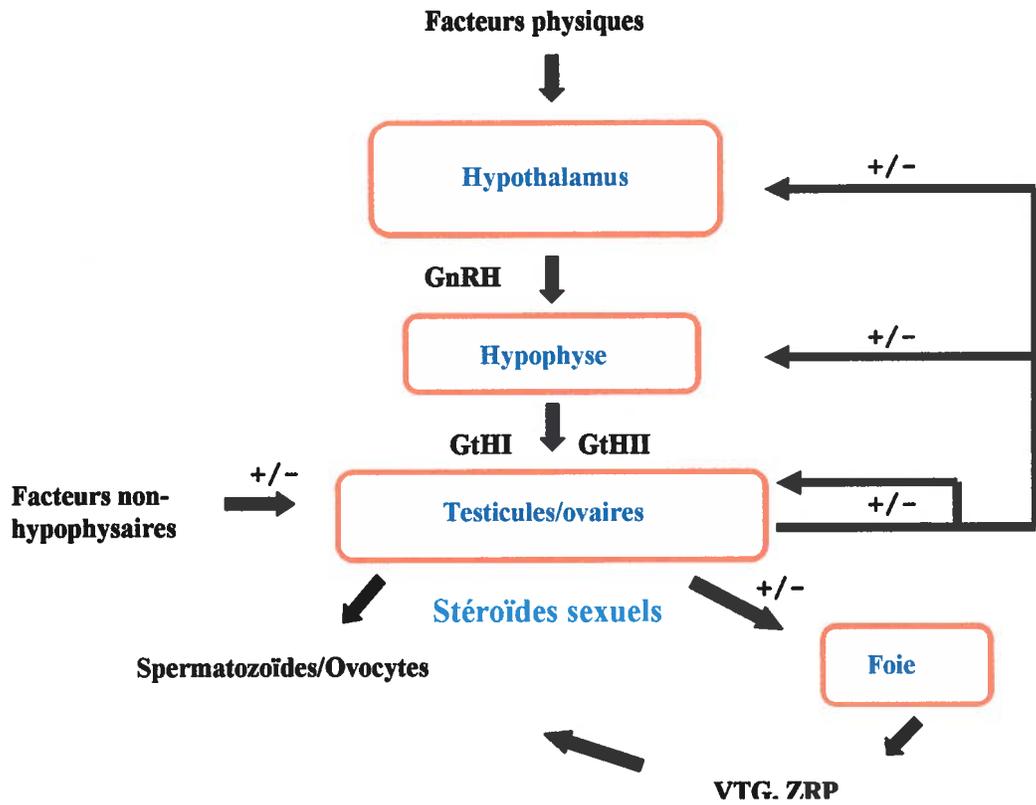


Figure 3 : Représentation schématique des mécanismes de stimulation (+) et d'inhibition (-) qui régulent l'endocrinologie reproductrice chez les téléostéens (Modifiée de Arukwe, 2001).

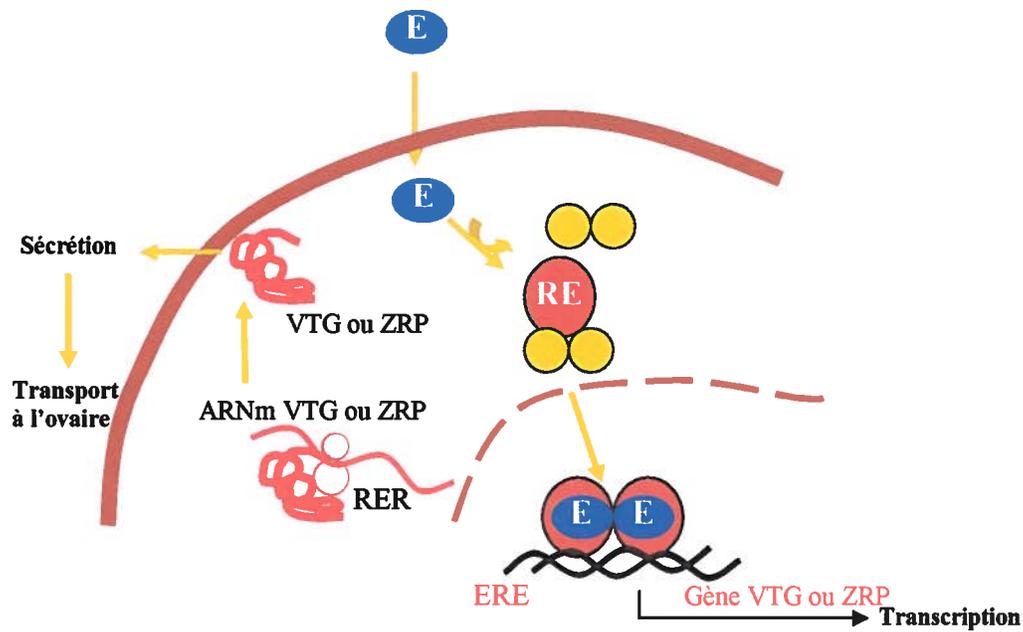


Figure 4 : Représentation schématique simplifiée de la stimulation de la production de VTG et des protéines chorioniques hépatiques. L'oestradiol, produite par le follicule ovarien en réponse à GtH1 est transportée au foie et diffuse dans les cellules hépatiques. Sa liaison au récepteur nucléaire des oestrogènes (RE) dissocie les protéines chaperones et provoque la dimérisation de deux REs et la liaison de ce complexe sur une ERE dans la région du promoteur des gènes réponses (VTG, ZRP). Cette liaison provoque une activation de la transcription des gènes VTG et ZRP. Les ARNm sont traduits et les protéines sont sécrétées et transportées à l'ovaire où elles sont incorporées à l'ovocyte.

3.2 Les effets des xénoestrogènes sur la reproduction

Le développement du système reproducteur des téléostéens est un processus impliquant plusieurs étapes et dont la poursuite se déroule au cours de la vie entière. Conséquemment, les xénoestrogènes sont susceptibles d'atteindre le système reproducteur à chacune des étapes incluant la fécondation, le développement embryonnaire, la différenciation sexuelle, l'ovogenèse et la spermatogenèse, l'ovulation et la spermiation ainsi que le frai. Les effets observés au niveau du système reproducteur par l'un ou l'autre des mécanismes mentionnés au chapitre précédent originent soit de la liaison du composé au tissu cible, d'une modification de la concentration hormonale ou encore de la modulation de l'axe hypothalamo-hypophyse-gonades.

3.2.1 Les effets des xénoestrogènes sur l'axe hypothalamo-hypophyse gonades

Plusieurs études ont démontré que les androgènes aromatisables et les oestrogènes augmentent les niveaux d'ARNm de GtHII (Dickey et Swanson, 1998. Querat, Hardy et Fontaine, 1991). En effet, la présence d'une ERE dans la région du promoteur de GtHII a été identifiée (Xiong *et al.*, 1994). De plus, l'oestradiol exerce un rétro-contrôle négatif sur la production de GtHI hypophysaire (Dickey et Swanson, 1998). Suivant cette optique, les composés mimant l'oestradiol sont en mesure de produire des effets néfastes sur la reproduction non seulement par leur action directe sur les gonades mais en modulant la synthèse et la sécrétion des gonadotrophines. Effectivement, Yadetie et Male, (2002), ont identifié, chez des saumons atlantiques juvéniles, une augmentation dose-dépendante des niveaux d'ARNm hypophysaires de GtHII suivant une injection de nonylphénol ou d'oestradiol. Néanmoins, cette augmentation était significative seulement chez les femelles juvéniles et aucune différence dans les niveaux hypophysaires de GtHI n'a été observée. De plus, des évidences suggèrent que les xénoestrogènes affectent le système reproducteur des téléostéens indirectement par leurs effets sur l'hypothalamus. En effet, le nonylphénol est en mesure de traverser la barrière hémato-encéphalique chez le saumon atlantique (Arukwe *et al.*, 2000) et donc peut mimer l'oestradiol à ce niveau. Les stéroïdes gonadiques et possiblement les xénoestrogènes induisent les niveaux

hypothalamiques de GnRH chez le saumon masou (Amano *et al.*, 1994). De plus, il a été démontré que la GnRH exerce un contrôle positif sur les niveaux hypophysaires de GtHII chez le bar rayé (Hassin *et al.*, 1998).

3.2.2 La vitellogénine et les protéines chorioniques

Chez les ovipares, l'accumulation au cours de l'ovogenèse de vitellus dans l'ovocyte est un processus majeur de la reproduction. En effet, la VTG représente la source principale de nutriments de l'œuf en développement. Les protéines qui forment le vitellus originent du clivage enzymatique de la VTG et de LDL (lipoprotéine de faible densité) (Tyler *et al.*, 1996). La VTG est une phospholipoglycoprotéine qui est définie comme étant une protéine dépendante d'œstrogène, produite dans le foie, sécrétée et transportée par le sang à l'ovaire où elle est incorporée dans l'ovocyte (Tyler *et al.*, 1996). L'incorporation de la VTG par le follicule en développement se produit par endocytose dépendante de la liaison de la protéine à un récepteur spécifique. Ce récepteur spécifique à la VTG est membre de la super-famille des récepteurs aux LDLs (Davail *et al.*, 1998). Ils sont groupés dans les puits recouverts de clathrine et le manteau protéique fusionne avec les lysosomes du Golgi qui contiennent la cathepsine D qui clive la VTG en protéines de l'œuf, la phosvitine et la lipovitelline (Carnevali *et al.*, 1999).

L'enveloppe qui entoure l'œuf est un second facteur important pour la reproduction. Elle forme une interface entre le sperme et l'œuf et protège l'œuf en développement du milieu externe. En effet, cette enveloppe est un déterminant structural majeur de l'œuf chez les téléostéens et les protéines qui la composent sont la zona radiata interne et la zona pellucida externe (Rotchell et Ostrander, 2003). L'enveloppe qui entoure l'œuf des téléostéens contient un micropyle qui accorde l'accès à seulement un spermatozoïde, de ce fait, les zonas préviennent la polyspermie (Arukwe et Goksøyr, 2003). Ces protéines sont synthétisées par le foie en réponse à l'oestradiol chez la plupart des téléostéens incluant la truite arc-en-ciel (Oppen-Berntsen, Gram-Jensen et Walther, 1992) et le saumon de l'Atlantique (Oppen-Berntsen *et al.*, 1999). Elles sont ensuite sécrétées et transportées par le sang à l'ovaire où elles sont intégrées à l'ovocyte. Par contre, certaines

espèces, dont la raie torpille sont caractérisées par la synthèse de ces protéines dans l'ovaire (Prisco *et al.*, 2002).

3.2.2.1 Les effets des xénoestrogènes sur la synthèse des protéines de l'œuf chez les mâles

Les substances en mesure d'affecter la production de la VTG et des protéines chorioniques altèrent par le fait même la reproduction des téléostéens. En effet, les mâles autant que les femelles possèdent les gènes de la VTG et des protéines chorioniques. Dans des conditions normales, ces gènes ne sont exprimés qu'à de faibles niveaux chez les mâles, jamais équivalant à celui des femelles (Rotchell et Ostrander, 2003). Les niveaux hépatiques et plasmatiques de ces protéines chez les mâles et les juvéniles représentent maintenant des bio-marqueurs populaires de l'exposition aux xénoestrogènes dans le milieu aquatique. Étant donné l'absence de site de déposition de ces protéines chez les mâles, l'élimination de ces protéines est relativement longue. Il a été récemment démontré que les niveaux retournent à la normale suite à l'exposition au 17β -oestradiol mais qu'ils demeurent élevés chez les menés tête-de-mouton exposés au *p*-nonylphénol (Hemmer *et al.*, 2002). L'accumulation de cette protéine dans les reins et le foie est fréquemment associée à des nécroses (Herman et Kincaid, 1988). De plus, le processus énergétique impliqué dans la synthèse de ces protéines chez les mâles ou encore chez les femelles à une période non-reproductrice conduit à une diminution de l'énergie allouée à d'autres processus tel la croissance (Arukwe et Goksøyr, 2003).

Plusieurs études ont employé l'induction de ces protéines comme indicateur de l'oestrogénicité de substances environnementales. En effet, une étude *in vivo* sur des saumons atlantique juvéniles traités à différentes doses de nonylphénol révèle une augmentation dose dépendante des niveaux plasmatiques de ZRP et VTG (Arukwe, Knudsen et Goksøyr, 1997). De plus, selon certaines études, l'induction significative de ZRP se produit à des doses plus faibles de nonylphénol et d'oestradiol que celles nécessaires à l'induction de la VTG (Arukwe, Knudsen et Goksøyr, 1997). Néanmoins, l'emploi de l'induction de la VTG est quantitativement plus employé comme bio-

indicateur de contamination. Un nombre important d'études ont investigué le caractère oestrogénique de substances environnementales par l'induction de la synthèse de la VTG chez différentes espèces. De ce fait, les alkylphénols, les phtalates (Jobling *et al.*, 1995, Christiansen, Korsgaard et Jespersen, 1998), le *o,p'*-DDT (Smeets *et al.*, 1999) ainsi que le bisphénol A (Van den Belt, Verheyen et Witters, 2003) induisent la synthèse hépatique de VTG. De plus, la capture de spécimens dans leur milieu naturel et l'exposition de poissons en cages dans des sites suspects ont révélé une contamination oestrogénique dans plusieurs régions du globe. Plus spécifiquement, Harries *et al.*, (1997) ont démontré une importante contamination oestrogénique dans cinq rivières de la Grande-Bretagne à l'aide de l'induction de la VTG chez des truites arc-en-ciel mâles en cages. Au Minnesota, des carpes mâles capturées en aval d'une décharge municipale présentaient des niveaux élevés de VTG ainsi qu'une baisse considérable de la concentration en testostérone (Folmar *et al.*, 1996). Dans cette étude, les carpes capturées à un second site d'échantillonnage dans une région à forte activité agricole présentaient une importante baisse des niveaux de testostérone mais aucun effet sur les niveaux de VTG, ce qui suggère des effets anti-androgéniques et suscite la prudence lors de la qualification de site non contaminé.

3.2.3 Les effets des xénoestrogènes sur les gonades

La plupart des études portant sur les effets des xénoestrogènes sur le système reproducteur des poissons ont concentré leurs efforts sur le potentiel féminisant de ces substances sur les mâles et des conséquences de cette féminisation sur la fertilité. De fait, les effets néfastes associés aux xénoestrogènes tendent à être associés aux mâles étant donné leurs faibles niveaux endogènes d'oestrogènes.

3.2.3.1 Mâles

La détermination sexuelle des téléostéens est un processus génétique où le sexe hétérogamétique (XY) est masculin. Par contre, la différenciation des gonades est dépendante des stéroïdes sexuels (oestrogène, androgène) (Yamamoto et Nagahama,

1969). Chez la plupart des espèces gonochoriques, les cellules germinales des gonades indifférenciées sont bipotentes, c'est-à-dire qu'elles ont le potentiel de se développer en spermatozoïdes ou en ovocytes (Kobayashi, Aida et Stacey, 1991). Au cours de la période critique de différenciation des cellules germinales, une altération des niveaux hormonaux peut causer une inversion du sexe phénotypique, indépendamment du sexe génétique. En effet, l'exposition de poissons zèbres mâles à l'éthinylestradiol au cours de cette période critique induit une féminisation complète (Andersen *et al.*, 2003). Ainsi, l'exposition à des substances oestrogéniques retrouvées dans l'environnement au cours de cette période peut provoquer l'inversion sexuelle complète ou partielle, on parle alors d'intersex.

L'intersex est caractérisé par le développement de cellules germinales mâles et femelles dans la même gonade (Jobling *et al.*, 1998). Dans le cas des modulateurs endocriniens oestrogéniques, l'intersex est le développement d'ovocytes et même la mise en place de l'oviducte chez les mâles téléostéens. *In vivo*, plusieurs études ont démontré l'induction d'intersex suite à l'exposition de poissons mâles à des composés oestrogéniques et anti-androgéniques. En effet, les substances oestrogéniques tels que l'éthinylestradiol (Andersen *et al.*, 2003, Metcalfe *et al.*, 2001), le 17 β -oestradiol (Gimeno *et al.*, 1996, Krisfalusi et Nagler, 2000, Metcalfe *et al.*, 2001), le 4-*tert*-pentylphénol (Gimeno *et al.*, 1996), le nonylphénol (Gray et Metcalfe, 1997) ainsi que le bisphénol A (Metcalfe *et al.*, 2001) induisent l'intersex chez différentes espèces de poissons. De plus, l'agent antifongique Vinclozoline, dont le mécanisme est anti-androgénique, induit l'intersex chez le medaka japonais (Kiparissis *et al.*, 2003). Dans plusieurs régions du monde, les concentrations en xénoestrogènes dans les cours d'eau sont suffisamment importantes pour causer ce phénomène. En effet, des gardons capturés dans des rivières britanniques recevant des quantités importantes d'effluents démontrent une incidence d'intersex qui atteint 100 % à certains endroits (Jobling *et al.*, 1998). De plus, une incidence d'intersex atteignant 45 % a été observée chez des baretts du lac Ontario. Cependant ce phénomène était unique à cette espèce, ce qui démontre une différence de sensibilité pour les composés oestrogéniques entre les espèces (Kavanagh *et al.*, 2004). Le même phénomène est présent en Allemagne où une espèce marine, la loquette d'Europe, ainsi que deux

espèces d'eau douce, l'épinoche et la carpe démontrent de l'intersex (Gercken et Sordyl, 2002). Finalement, des esturgeons du lac St-Louis (USA) (Harshbarger, Coffey et Young, 2000), des plies de la Baie de Tokyo au Japon (Hashimoto *et al.*, 2000) ainsi que des barbeaux d'Italie (Vigano *et al.*, 2001) possèdent des gonades où des ovocytes sont présents à l'intérieur du testicule. Malgré que les contaminants responsables de cette féminisation des poissons mâles ne sont que rarement identifiés avec certitude, un lien existe entre le degré de féminisation des poissons et la proximité des décharges d'effluents municipaux (Jobling *et al.*, 2002a;b).

Outre les effets sur la différenciation sexuelle des gonades, les xénoestrogènes peuvent exercer des effets sur la maturation normale des gamètes. La spermatogenèse est le processus par lequel les cellules germinales se différencient en spermatozoïdes. Les spermatozoïdes des téléostéens sont immobiles au moment de l'éjaculation et deviennent motiles au contact de l'eau. La durée de motilité est brève et donc le spermatozoïde doit être en mesure de nager rapidement et directement vers le micropyle (Kime, 1999). Il a été suggéré qu'il existe une relation directe entre la motilité des spermatozoïdes et leur capacité de fécondation (Billard et Cosson, 1992). De plus, Warner (1997) suggère que les téléostéens libèrent une quantité minimale de spermatozoïdes nécessaire à la fécondation. Conséquemment, une diminution de la quantité, de la motilité ou de la qualité des spermatozoïdes provoque des effets directs sur la capacité de fécondation. Plusieurs études *in vivo* ont relaté une altération de la maturation des gamètes mâles suite à l'exposition à différents composés oestrogéniques. De ce fait, certains auteurs démontrent une diminution de la production de spermatozoïdes. Ainsi, des carpes mâles exposées au 4-*tert*-pentyphénol et au 17 β -oestradiol ont une concentration réduite en cellules germinales matures ainsi qu'un rétrécissement du diamètre du tubule séminifère (Gimeno *et al.*, 1998). De plus, l'exposition de mâles guppies à des concentrations environnementales de bisphénol A et de TBT produit une diminution significative de la concentration en spermatozoïdes. Les auteurs associent cette diminution à une altération de la fonction des cellules de Sertoli (Haubruge, Petit et Gage, 2000). De même, l'injection de 17 β -oestradiol et de nonylophénol chez des loquettes d'Europe mâles provoque une réduction de l'indice gonado-somatique ainsi que des effets néfastes sur les

cellules de Sertoli. Ces effets néfastes sont mis en évidence par une réduction de l'activité γ -glutamyl-transpeptidase (Christiansen, Korsgaard et Jespersen, 1998). L'activité de cette enzyme représente un bon marqueur de l'intégrité de ces cellules (Christiansen *et al.*, 2000). D'autres études ont démontré le potentiel des xénoestrogènes à inhiber la progression de la spermatogenèse. En effet, l'exposition de poissons zèbres au cours de la période cruciale de développement, c'est-à-dire, au cours de la différenciation sexuelle et du début de la gamétogenèse, au nonylphénol (max 100 $\mu\text{g/L}$) et à l'oestradiol (max 1ng/L) cause une inhibition dose-dépendante de la progression de la spermatogenèse (Weber, Hill et Janz, 2003). Le traitement de mâles guppys aux composés oestrogéniques 4-*tert*-octylphénol, bisphénol A ainsi qu'aux composés anti-androgéniques *p,p'*-DDE et flutamide induit une réduction des kystes contenant les cellules germinales caractérisée par une inhibition de la mitose menant aux spermatozoïdes. Cependant, contrairement à l'étude de Weber, Hill et Janz, (2003), les concentrations d'oestradiol employées ne semblent pas affecter le déroulement de la spermatogenèse mais plutôt le nombre de cellules de Sertoli hypertrophiées (Kinnberg et Toft, 2003). Par conséquent, les différents effets relatés *in vivo* par les composés oestrogéniques dépendent de la substance, de la concentration utilisée, de la durée et de la période d'exposition ainsi que de l'espèce.

Dans des environnements naturels, des muets du lac Supérieur, qui reçoit une quantité importante d'effluents provenant de l'industrie papetière, démontrent une baisse des niveaux de testostérone, du poids des testicules ainsi que de la motilité des spermatozoïdes (McMaster *et al.*, 1992). De plus, une étude effectuée par le groupe de Hassanin *et al.*, (2002) sur des carpes capturées dans des rivières contaminées du Japon démontre une diminution de l'indice gonado-somatique ainsi qu'un délai dans la progression de la spermatogenèse par rapport aux carpes provenant d'une rivière contrôlée.

Au niveau des effets des xénoestrogènes sur le pouvoir de fécondation des mâles, la plupart des études ont porté sur des modèles d'exposition *in vivo* (en laboratoire). Une seule étude a démontré les effets d'une contamination environnementale sur la fertilité de

spécimens dans leur milieu naturel; lorsque des poissons zèbres mâles sont exposés à des concentrations de 5 à 25 ng/L d'éthinylestradiol, l'indice gonado-somatique est significativement réduit et le nombre de femelles non exposées qui, mises en contact avec ces mâles, pondent normalement est diminué (Van den Belt, Verheyen et Witters, 2001). L'exposition de truites arc-en-ciel mâles à l'éthinylestradiol (100 ng/L) cause une réduction du poids des testicules ainsi qu'une mortalité évaluée à 50 % des embryons issus de la fécondation d'œufs de femelle non traités (Schultz *et al.*, 2003). Un taux de fécondation diminué a également été démontré pour des mâles medaka japonais exposés à l'octylphénol (2-50 µg/L) et à l'oestradiol (100 ng/L) (Knörr et Braunbeck, 2002). De plus, des femelles mises en contact avec des mâles medaka japonais exposés à l'octylphénol montrent une ponte réduite de l'ordre de 50 % (Gronen *et al.*, 1999). Par ailleurs, la progéniture (F1) de truites arc-en-ciel mâles et femelles exposées à 10 µg/L de nonylphénol pour une période de 10 jours par mois pendant 4 mois démontre un haut taux de mortalité (Schwaiger *et al.*, 2002).

La seule évidence publiée jusqu'à ce jour concernant l'effet de la féminisation des poissons par les xénoestrogènes sur la capacité reproductrice de spécimens dans leur milieu naturel provient des études de Jobling *et al.*, (1998; 2002a;b) réalisées sur des cours d'eaux britanniques recevant une grande quantité d'effluents. Dans ces études, le degré d'intersex atteint parfois 100 % des gardons échantillonnés et lorsque les gardons mâles provenant de rivières contaminées sont examinés au milieu du cycle reproductif (à l'automne), la spermatogenèse et le développement des testicules sont retardés. De plus, au printemps (spermiation), la proportion des mâles capables de frayer est de moitié moins importante que celle des mâles provenant du site contrôle. Les gardons mâles présentant de l'intersex démontrent non seulement une réduction du volume du sperme mais aussi une diminution de la motilité des spermatozoïdes et de la capacité à féconder les œufs des femelles-contrôles. L'augmentation du degré d'intersex de la gonade est négativement liée à la qualité des gamètes. De plus, la survie des embryons est diminuée lorsque des mâles provenant de sites contaminés sont croisés avec des femelles-contrôles. Le degré d'intersex est également négativement lié à la capacité de fécondation et à la survie des embryons.

3.2.3.2 Femelles

Malgré la tendance à explorer les effets des xénoestrogènes chez les mâles, une attention a toutefois été portée, au cours des dernières années, sur les effets reproducteurs chez les femelles. Des études *in vivo* ont premièrement démontré les effets d'une exposition à l'éthinylestradiol et à l'oestradiol chez les femelles. En effet, l'exposition de poissons zèbres femelles à l'éthinylestradiol réduit de façon dose dépendante le nombre de femelles qui fraient, une dose de 25 ng/L entraînant une inhibition complète de celle-ci. De plus, dans cette étude, les femelles inhibées avaient des ovaires plus petits à la ponte ainsi qu'une absence d'ovocytes matures (Van den Belt, Verheyen, et Witters, 2001). Par ailleurs, une diminution du nombre d'œufs produits et une diminution de la survie de ceux-ci ont été observées chez les menés tête-de-mouton femelles exposés à ce même composé oestrogénique (Zillious *et al.*, 2001). L'exposition de femelles medaka japonais à l'oestradiol entraîne, quant à elle, une inhibition du frai suite à une exposition à une dose de 27.2 ng/L (Shioda et Wakabayashi, 2000). Deuxièmement, des études *in vivo* ont été effectuées sur les effets des xénoestrogènes sur la reproduction des femelles téléostéens. Ainsi, l'exposition de truites arc-en-ciel femelles au xénoestrogène nonylphénol pour une période de 18 mois à des concentrations de 85.6 µg/L entraîne un arrêt complet de la reproduction par l'inhibition de l'entrée de la VTG dans l'ovocyte (Harris *et al.*, 2001). Les auteurs ont de plus observé une réduction hypophysaire et plasmatique des niveaux de GtH1, responsable de la maturation des ovocytes et du recrutement de la VTG. De plus, des études de fertilité où des poissons zèbres mâles et femelles ont été exposés au nonylphénol (10 et 100 µg/L) révèlent une diminution significative du nombre d'œufs viables ainsi que du nombre d'œufs éclos (Hill et Janz, 2003). La même équipe a aussi démontré que le traitement au nonylphénol à des concentrations de nonylphénol de 10 à 100 µg/L entraîne un délai dose dépendant dans la progression de la gamétogenèse chez les mâles et les femelles et que, même suivant 240 jours dans un environnement sans nonylphénol, les femelles présentaient une atresie des ovocytes pour le traitement à 100 µg/L (Weber, Hill et Janz, 2003) Lors de la célèbre étude britannique sur les gardons capturés dans des rivières recevant des quantités

importantes d'effluents municipaux, une haute incidence d'atrésie des ovocytes a été identifiée par rapport aux gardons capturés dans des sites témoins, par contre, malgré qu'affecté, le développement des ovocytes n'apparaissait pas significativement inhibé (Jobling *et al.*, 2002b). En addition aux composés qui inhibent le développement des ovocytes et le frai par des processus hormonaux, certains composés tels le mercure affectent directement l'ovocyte. Le mercure, par son effet toxique sur le micropyle prévient l'entrée des spermatozoïdes dans l'œuf (Khan et Weis, 1993). De plus, il a été démontré que plusieurs xénoestrogènes sont évacués de la femelle jusqu'à l'œuf en développement. Malgré que ce processus diminue la toxicité associée au composé chez la femelle, il augmente l'exposition de l'embryon à un stade crucial de son développement. Étant donné l'imperméabilité de l'œuf après le frai, les effets associés au développement sont probablement dus à l'apport de la mère plutôt qu'au milieu environnant (Kime, 1999).

3.2.4 Les effets des xénoestrogènes sur le comportement reproducteur

Chez les mammifères, le comportement sexuel typique à chaque sexe est acquis au cours d'une brève période du développement et est exprimé plus tard à la puberté. Par contre, chez les poissons, la présence de cette période de sensibilité à l'acquisition d'un comportement sexuel typique est inconnue et pourrait être, comme chez les mammifères, présente tôt au cours du développement ou encore suivre la différenciation des gonades. Le comportement sexuel des poissons implique une communication chimique entre les deux sexes par la libération de phéromones dans le milieu environnant. Ces phéromones, sécrétées par les gonades des femelles permettent aux mâles de reconnaître les femelles prêtes à pondre. Une communication adéquate comprend l'habileté des femelles à libérer ces phéromones ainsi que celle des mâles à les reconnaître et à acquérir une réponse typique. Ces réponses incluent la production de sperme et un comportement spécifique aux mâles de son espèce. En effet, l'acquisition d'un comportement spécifique comprend la construction et la garde du nid chez certaines espèces ainsi que l'élaboration de caractéristiques secondaires dépendantes des androgènes tels le rougissement du ventre chez les épinoches. Une de ces phéromones est la prostaglandine F_{2α} qui cause non

seulement la rupture du follicule et l'ovulation chez les poissons rouges femelles mais aussi, lorsque relâchée par les femelles dans le milieu, un comportement sexuel favorable à la reproduction chez les mâles (Sorensen et Scott, 1994). Les xénoestrogènes sont en mesure d'exercer des effets au niveau de ce comportement chez les poissons. De ce fait, des medakas japonais mâles exposés à l'octylphénol ont un comportement sexuel diminué (Gray, Teather et metcalfe, 1999b). De plus, des poissons rouges mâles exposés à l'oestradiol démontrent une absence du comportement sexuel typique (Bjerselius *et al.*, 2001). Lorsque des medaka japonais mâles et femelles sont soumis à un mélange de TBT et BPC, l'inhibition du frai est associée, selon les auteurs, à une réduction du comportement sexuel des mâles (Nirmala *et al.*, 1999). Finalement, plus récemment, Oshima *et al.* (2003), ont exposé des couples (mâles/femelles) medaka japonais à l'oestradiol et ont noté une baisse de la fécondation ainsi qu'une suppression dramatique du comportement sexuel mâle lorsque la ponte était induite chez des femelles non traitées. Ces effets au niveau du comportement sexuel affectent non seulement directement le frai mais aussi, à plus long terme, la dynamique de la population

Finalement, les conséquences immédiates de l'exposition aux xénoestrogènes peuvent être profondes et altérer la reproduction de ces animaux de plusieurs manières qui tendent à atténuer leur capacité reproductive.

CHAPITRE 4

LE FLEUVE ST-LAURENT ET LE QUEUE À TACHE NOIRE

4.1 Le fleuve St-Laurent

Le fleuve St-Laurent est composé de plusieurs masses d'eau aux caractéristiques physico-chimiques distinctes. Les principales masses d'eau sont les eaux des Grands-Lacs, les eaux de la rivière des Outaouais, les eaux mélangées des rivières des Outaouais et l'Assomption, les eaux mélangées des tributaires de la Rive-Sud et des Grands-Lacs ainsi que des eaux de la région de Québec. Dans la grande région de Montréal, les Grands-Lacs et la rivière des Outaouais contribuent en moyenne, à 80 % et 16 % des apports en eau du St-Laurent. De plus, lors des crues printanières, la rivière des Outaouais peut contribuer jusqu'à 50 % des apports en eau du fleuve (Centre St-Laurent, 1996).

Les eaux usées sont acheminées à la station d'épuration de la Communauté Urbaine de Montréal (CUM) par un système d'intercepteurs. Les procédés de traitement incluent des procédés physiques tels qu'une série de grilles servant à l'élimination de résidus en suspension ainsi qu'un dessablage permettant d'éliminer les particules de faible dimension. Suite aux traitements physiques, l'utilisation d'un coagulant permet la réduction des phosphates et des matières en suspension. Les eaux traitées sont subséquemment dirigées vers des bassins de décantation ou elles séjournent avant leur entrée dans le fleuve (Purenne, 2002). La station d'épuration est localisée à la pointe Est de l'île et reçoit la totalité des eaux usées de la ville de Montréal ainsi qu'une proportion importante des eaux pluviales (Purenne, 2002). Les eaux traitées par des procédés physico-chimiques sont rejetées dans le fleuve St-Laurent à un point unique situé à l'extrémité Nord-est de l'île, l'Île aux Vaches, par un tunnel d'une longueur de 4 km. Les eaux ainsi rejetées forment un panache concentré au centre du fleuve (Dagenais, Boulay et Boulay, 1999, Purenne, 2002). Ainsi, les eaux usées d'une population environnant les 1,8 millions d'habitants entrent dans le fleuve St-Laurent à un seul endroit.

Les rejets provenant de la station d'épuration de la CUM constituent un mélange complexe de toxiques et de colonies biologiques dont la variabilité provient des milieux résidentiel, public ou commercial, industriel, de l'infiltration souterraine et du ruissellement de surface (White et Rasmussen, 1998). En effet, les effluents municipaux sont reconnus pour contenir un éventail de composés toxiques pour les organismes incluant des hydrocarbures polyaromatiques, des pesticides, des métaux lourds ainsi que des contaminants modulateurs du système endocrinien (Ternes *et al.*, 1999). Une étude effectuée par Gagnon et Saulnier, (2003) sur la distribution des métaux lourds aux alentours de l'île de Montréal révèle des niveaux de contamination métallique relativement bas (traces) mise à part la présence de cadmium et de zinc à une distance inférieure à 1 Km du point de décharge de la station d'épuration. De plus, Sabik *et al.*, (2003) ont démontré la présence d'alkylphénols, de nonylphénol éthoxylé ainsi que d'octylphénol dans le St-Laurent aux alentours de l'île de Montréal. Par ailleurs, la capacité de biocentration de ces substances dans les sédiments et les moules a aussi été investiguée par ce groupe. Les résultats révèlent la présence d'alkylphénols polyéthoxylés dans l'eau (ppt et ppb), les sédiments (ppm) ainsi que dans les moules (ppm). De plus, les concentrations observées étaient plus importantes lorsque les échantillons provenaient d'un site en aval de la décharge municipale, suggérant le contenu important en alkylphénols des effluents municipaux.

4.2 Le Queue à tache noire

Le Queue à tache noire, aussi connu sous le nom de *Notropis hudsonius* est une espèce commune du bassin des Grands-Lacs et du fleuve St-Laurent. Il fait partie de l'infraclasse des téléostéens et de la famille des *cyprinidae*. C'est une espèce relativement petite d'une longueur variant entre 50 et 144 mm et d'un poids entre 10 et 20 g. La tache noire au milieu de la base de la nageoire caudale permet de le distinguer dans son milieu naturel. La coloration de son dos varie d'argent à olive pâle, ses côtés sont argent, son ventre blanc et ses nageoires sont pâles. Aucune différence phénotypique n'existe entre les sexes male et femelle. On le retrouve à des profondeurs atteignant 13 mètres en été et 31 mètres en hiver et ce, à des températures supérieures à 13 °C (LaRue et Robert, 1974). De plus,

les Queues à tache noire les plus gros et les plus âgés tendent à se tenir dans des eaux plus profondes que les plus jeunes; la température supérieure en eaux moins profondes facilite la croissance rapide tandis que les eaux profondes protègent des prédateurs. Ils se nourrissent principalement de larves d'insectes, d'œufs de poissons, de zooplancton, de pontoporeia et de sphaerie striée (LaRue, 1980). Les Queues à tache noire sont sexuellement matures seulement suivant l'atteinte d'une longueur d'environ 68 mm (LaRue et Robert, 1974). La période de reproduction dépend de la température mais se produit généralement en juin ou juillet. Le frai se déroule de manière pélagique; les œufs sont déposés sur des surfaces découvertes sablonneuses (NY sport fishing and aquatic resources education program, 2000). Il ne semble pas y avoir de comportement sexuel typique ou encore de rituel de reproduction associé à cette espèce. Les femelles produisent environ 700 œufs de deux différents types : blancs immatures et jaunes matures. De plus, le nombre d'œufs produits est dépendant de la taille de la femelle. Les principaux prédateurs des Queues à tache noire sont le bar blanc, l'achigan à petite bouche, le brochet et le maskinongé. Cependant, les grenouilles sont considérées comme des prédateurs importants des œufs et des juvéniles. La durée de vie moyenne du Queue à tache noire est de 5 ans (Jenkins et Burkhead, 1994). Finalement, de par son caractère sédentaire et son abondance dans le fleuve St-Laurent, cette espèce représente un modèle idéal pour l'étude des effets des modulateurs endocriniens dans le milieu aquatique aux alentours de l'île de Montréal.

SECTION 2 :

LES ARTICLES

CONTRIBUTION PERSONNELLE AUX ARTICLES

Cet article a dû être retiré en raison de restrictions liées au droit d'auteur.

[Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners \(Notropis hudsonius\).](#)

Aravindakshan J, Paquet V, Gregory M, Dufresne J, Fournier M, Marcogliese DJ, Cyr DG.

Toxicol Sci. 2004 Mar;78(1):156-65. Epub 2003 Dec 2.

Pour le premiers article : *Consequences of Xenoestrogens Exposure on Male Reproductive Function in Spottail Shiners (Notropid hudsonius)*, j'ai contribué à l'échantillonnage de l'année 2002 ainsi qu'aux dissections. J'ai effectué la détermination des stades de spermatogenèse, identifié l'incidence d'intersex et analysé les résultats. Finalement, j'ai écrit l'article en collaboration avec le co-auteur. J.P. Aravindakshan.

Dans le second article : *Estrogenic Contamination of the Ottawa River and the Effects of this Contamination on Spottail Shiners (Notropis hudsonius)*. j'ai contribué à l'échantillonnage des années 2002 et 2003 ainsi qu'aux dissections. J'ai effectué la détermination des niveaux de contaminations oestrogéniques à l'aide de la quantification des niveaux d'ARNm hépatique de VTG. J'ai aussi déterminé l'incidence d'intersex, analysé les résultats et écrit toutes les sections de l'article.

Dans le troisième article : *Identification of a Y chromosome marker in Spottail shiner (Notropis hudsonius) Using Amplified Fragment Length Polymorphism*, j'ai déterminé la non-spécificité au sexe mâle des gènes SRY et ZFY chez le Queue à tache noire. J'ai réalisé l'identification d'un marqueur spécifique au sexe mâle de cette même espèce à l'aide de la technique des AFLP. J'ai analysé les résultats et écrit toutes les sections de l'article.

Finalement, les résultats de la détermination de l'incidence d'inversion sexuelle dans le fleuve St-Laurent à l'aide du marqueur du chromosome Y chez le Queue à tache noire viendront s'ajouter ultérieurement à ce dernier article.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

CONSEQUENCES OF XENOESTROGEN EXPOSURE ON MALE REPRODUCTIVE FUNCTION IN SPOTTAIL SHINERS (*NOTROPIS HUDSONIUS*)

Il existe peu d'informations quant aux conséquences physiologiques associées à une exposition aux xenoestrogènes dans un environnement naturel. L'objectif de cette étude était de déterminer la présence de contaminants oestrogéniques dans le fleuve St-Laurent et leur effet sur le système reproducteur mâle du Queue à tache noire (*Notropis Hudsonius*). Les niveaux hépatiques d'ARNm de vitellogénine (VTG) chez les Queues à taches noires immatures indiquent une importante contamination oestrogénique qui s'étend sur environ 50 Km en amont et en aval de l'île de Montréal. Les stades de spermatogenèse ont été déterminés chez des poissons capturés à différents sites démontrant des niveaux de contamination oestrogéniques variés. Au site témoin, 95 % des poissons capturés avaient des testicules aux stades IV (50%) ou V (45%) de spermatogenèse. À l'Île Dorval, où les niveaux hépatiques de VTG étaient modérés, les testicules des poissons étaient aux stades III (38%) et IV (45%), seulement 15 % étaient au stade V. Par contre, à l'Îlet Vert et à l'Île Beaugard, où les niveaux hépatiques de VTG étaient élevés, aucun testicule de Queue à tache noire n'était au stade V et 8% demeuraient au stade II de spermatogenèse. La concentration en spermatozoïdes et plusieurs paramètres reliés à la motilité étaient significativement diminués à l'Îlet Vert par rapport à l'Îles de la Paix (site témoin). Des analyses histologiques des testicules ont révélé que plus d'un tiers des poissons capturés dans les sites où la contamination oestrogénique était la plus importante démontrent de l'intersex, une condition représentée par des follicules ovariens qui se développent dans les testicules. Ces résultats indiquent qu'il existe une contamination oestrogénique significative dans le fleuve St-Laurent et que celle-ci est associée à des altérations de la fonction reproductrice des poissons mâles.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

ESTROGENIC CONTAMINATION OF THE OTTAWA RIVER AND THE EFFECTS OF THIS CONTAMINATION ON SPOTTAIL SHINERS (*NOTROPIS HUDSONIUS*)

Nous avons démontré, au cours d'une étude précédente, une importante contamination oestrogénique dans le fleuve St-Laurent, en amont et en aval du point de décharge des effluents municipaux. La rivière des Outaouais est l'un des tributaires les plus importants du fleuve St-Laurent dans la région de Montréal. Afin de comprendre la contamination oestrogénique observée dans le fleuve St-Laurent, en amont du point de décharge des effluents municipaux, nous avons échantillonné des Queues à tache noire dans la rivière des Outaouais, en amont et en aval des villes de Gatineau et Ottawa. Les niveaux hépatiques d'ARN messagers de vitellogénine chez les Queues à tache noire immatures démontrent une contamination en xénoestrogènes en amont et en aval de Gatineau/Ottawa. Des analyses histologiques sur des testicules mâles matures ont été effectuées sur des poissons capturés à des sites possédant différents niveaux de contamination. En 2002, 44 % des poissons provenant de Deep River, situé en amont des villes de Gatineau/Ottawa, démontraient de l'intersex comparés à 6,5 % des poissons provenant de Fer à cheval, situé en aval. En 2003, aucun des poissons capturés au site témoin (Lac Témiscamingue) ne démontrait de l'intersex tandis que 50 % des poissons provenant de Fer à cheval, 44 % provenant de Rivière Blanche (aval) et 18 % provenant de Deep River démontraient de l'intersex. De plus, dans cette étude, les hauts niveaux d'intersex sont corrélés avec les niveaux hépatiques de vitellogénine. Ces résultats démontrent qu'il existe une contamination en composés oestrogéniques dans la rivière des Outaouais qui suffit, au moins en partie, à expliquer la contamination en amont de la décharge municipale de la CUM dans le St-Laurent. De plus, cette contamination est associée à une féminisation des Queues à tache noire males.

**ESTROGENIC CONTAMINATION OF THE OTTAWA RIVER AND THE
EFFECTS OF THIS CONTAMINATION ON SPOTTAIL SHINERS
(*NOTROPIS HUDSONIUS*)**

Valérie Paquet, Henri Fournier, Richard Parizeau and Daniel G. Cyr

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, QC, H9R 1G6
and Société de la Faune et des parcs du Québec, Gatineau, QC, J8Y 3R7

Address for Correspondence :

Dr. Daniel G. Cyr
INRS-Institut Armand-Frappier
Université du Québec
245, Hymus Boulevard
Pointe-Claire, Québec, H9R 1G6
Tel. (514) 630-8833
Tel. (514) 630-8850
e-mail: daniel.cyr@INRS-IAF.quebec.ca

1.0 ABSTRACT

We have previously demonstrated a significant estrogenic contamination in the St. Lawrence River both upstream and downstream from the municipal discharge point and that some of this contamination originates from the Ottawa River. The Ottawa River represents a major tributary of the St. Lawrence River in the Montreal area. To understand the estrogenic contamination observed in the St. Lawrence River upstream of the municipal discharge point, spottail shiners were captured in the Ottawa River, upstream and downstream of the city of Gatineau/Ottawa. Hepatic VTG mRNA levels in immature spottail shiners indicate an estrogenic contamination located both upstream and downstream of Gatineau/Ottawa. Histological analysis of mature male testis were performed in fish captured at sites having varying levels of contamination. In 2002, 44 % of male fish from Deep River located upstream of the city of Gatineau/Ottawa exhibited intersex as compared with 6.5 % from Fer à cheval located downstream. In 2003, no fish had intersex in the reference site (Lac Témiscamingue), while 50 % of the fish from Fer à cheval, 44 % of the fish from Rivière Blanche (downstream) and 18 % of the fish from Deep River displayed intersex. Moreover, the high incidence of intersex is correlated with VTG induction. These results indicate an estrogenic contamination in the Ottawa River that can in part explain the contamination found in the St. Lawrence River. Furthermore, this contamination is associated with feminization of male spottail shiners.

2.0 INTRODUCTION

It is now well established that many man-made chemicals in the environment possess the ability to interfere with normal endocrine function. Much of the focus on endocrine disrupting chemicals (EDCs) has been targeted towards chemicals that have estrogen-mimicking activity. These include certain widely distributed organic pollutants such as pesticides, alkylphenols as well as natural and synthetic estrogens such as 17β -estradiol and estrone (Soto *et al.*, 1995). Several studies have reported the presence of estrogenic substances in aquatic ecosystems (Folmar *et al.*, 1996, Harries *et al.*, 1997, Spengler, Korner et Metzger, 2001). There has been considerable attention in assessing the potential adverse effects of exposure to estrogenic chemicals on fish populations (Harries *et al.*, 1997, Jobling *et al.*, 1998, Purdom, Hardiman et Bye, 1994). Exposure to estrogenic compounds can be assessed by measuring circulating levels of vitellogenin (VTG) in mature male or immature fish. The expression of VTG is under estrogenic regulation and both males and females possess the VTG gene. Under normal conditions, this gene is expressed only at low levels in males, never equivalent to that of females (Rotchell and Ostrander, 2003). Both hepatic and plasma levels of VTG in males and immature fish represent useful bio-marker to assess exposure of fish to xenoestrogens.

Sexual development in fish is characterised by two distinct phases: sexual determination and differentiation. Sexual determination represent events that occur before the gonads have been committed to a specific developmental pathway, despite the absence of distinguishing characteristics (Krisfalusi and Nagler, 2000). Sex differentiation is the process whereby the gonadal phenotype is expressed, structure and function of the cells changes (Hayes, 1998). Yamamoto and Nagahama, (1969) proposed that sex steroids may be natural inducers of sex determination in fish. Since then, several studies have demonstrated that exposure to exogenous estrogens during critical periods of gonadal development can overcome sex determining mechanisms in the developing embryo and induce phenotypic sex reversal (Andersen *et al.*, 2003, Kobayashi, Kajiura-Kobayashi and Nagahama, 2003, Yamamoto and Kajishima, 1968). Recently, studies have shown that exposure to EDCs that mimic estrogen action may influence sexual differentiation and determination and alter normal

gonadal development in fish (Gimeno *et al.*, 1998, Gray and Metcalfe, 1997). The most commonly observed reproductive effects in wild-caught fish are: abnormally elevated levels of vitellogenin in the plasma of fish and intersexed gonads (Gronen *et al.*, 1999, Lye *et al.*, 1997). Histological analyses of fish gonads provide a useful tool to detect and characterize biological end point of xenoestrogens contamination. In a study from a wide range of rivers throughout the British Isles, Jobling *et al.*, 1998, demonstrated a high incidence of intersex and a pronounced increase in plasma VTG levels.

We have previously demonstrated a significant estrogenic contamination in the St. Lawrence River spanning almost 50 kms both upstream and downstream from the Island of Montreal (Aravindakshan *et al.*, 2004). The municipal effluent generated by the Montreal Urban Community (MUC) are discharged into the St. Lawrence River at a single point near the eastern tip of the island and contribute to the estrogenic contamination of the St. Lawrence downstream of Montreal. Nevertheless, the environmental contamination upstream from the MUC discharge point remains unclear. This contamination may originate from other industries and sources or from overflow release of municipal effluent upstream from the main discharge point; this can occur when the system is saturated or following heavy rainfall. However, previous studies by Aravindakshan *et al.*, (2004) indicate that the estrogenic contamination may originate from the Ottawa River as indicated by significant VTG mRNA levels in male fish captured at the mouth of the Ottawa River.

To date, there have been no published studies attempting to assess whether or not estrogenic compounds are present in the Ottawa River. The objectives of this study were to determine whether or not estrogenic substances were found in the Ottawa River and to assess whether or not these are sufficient to induce effect on sexual development in spottail shiners testis.

3.0 MATERIALS AND METHODS

3.1 *Study area*

Sampling sites in the Ottawa River were established both upstream and downstream of the cities of Gatineau/Ottawa. The downstream sites were Fer à cheval, Rivière Blanche and the upstream sites were Deep River, Lac Témiscamingue (reference).

3.2 *Animal Sampling*

Spottail shiners were captured in autumn (10/2002 and 09/2003) from each site by electrofishing. Stunned fish were placed in aerated river water and transported to the shore. Fish were euthanized using a solution of 0.1% tricaine methansulfonate (MS222, Boreal, Ontario, Canada) and liver and testes were collected. All protocols used in this study were followed according to the guidelines of the Canadian Council for Animal Care Committee.

3.3 *Condition Factor*

Fork length and body weight were recorded for each fish. Condition factors were calculated using the equation: $K = [\text{body weight (g)} \times 100] / \text{fork length}^3 \text{ (cm)}$.

3.4 *Hepatic VTG mRNA levels*

Spottail shiners were captured at Deep River (n=5) and Fer à cheval (n=5) in autumn 2002 and at all sites in autumn 2003 (Lac Temiscamingue n=5, Deep River n=5, Fer à cheval n=5, Rivière Blanche n=5). Total RNA was extracted from livers of immature spottail shiners using Qiagen RNA extraction kit (Qiagen, Mississauga, Ontario, Canada). Following RNA extraction, RT-PCR was performed to determine VTG mRNA levels as described by Aravindakshan *et al.*, (2004). PCR was performed in a 50 μ l reaction volume with a final concentration of 1.5 mM 10X PCR buffer, 0.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 2.5 U Taq DNA polymerase, 0.5 μ M forward and 0.5 μ M reverse primer. Amplification was carried out with 40 cycles (linear amplification) at

94 °C for 1.0 min 30 sec, 55 °C for 1 min 30 sec, and 72 °C for 2.0 min for VTG and 16 cycles (linear amplification) at 94 °C for 30 sec, 55 °C for 1.0 min, and 72 °C for 1.0 min for the 28S. Aliquots of 10 μ l of the PCR products were then analysed on a 1% agarose gel containing ethidium bromide. Gels were then scanned using a Bio-Rad Fluor Image analyzer and quantified using the integrated area under the curve for each band.

3.5 Intersex

Male spottail shiners were collected using electrofishing at different site in autumn 2002 and 2003 along the Ottawa River: Lac Témiscamingue (n=6, 2003), the reference site, and at sites both upstream and downstream of Gatineau/Ottawa: Rivière Blanche (n=9, 2003), Fer à cheval (n=17, 2002, n=7, 2003), Deep River (n=10, 2002, n=12, 2003). Testes were removed, fixed in Bouin's solution, dehydrated through a graded series of ethanol, cleared with xylene, and embedded in paraffin. Sections (5 μ m) were mounted on glass slides and stained with hematoxylin and eosin. Testes were analysed for the presence of developing oocytes. Oocytes were identified according to staining pattern, size of the cell, and the presence of multivesicular bodies in the cytoplasm.

3.6 Statistical analysis

The data were analysed for normality using the Kolmogorov-Smirnov test. Statistical differences between sites were determined using ANOVA followed *a posteriori* by a Student-Newman-Keuls test for multiple comparisons. A Dunn's test was done if normality failed. Correlations between hepatic VTG mRNA levels and intersex were done using a Pearson Product Moment Correlation Test. All analyses were done using the SigmaStat computer software (Jandel Scientific Software, San Rafael, CA). Significance for each of these tests was established at $p < 0.05$. Analyses of covariance for length, weight, and condition factor of the fish between sites were determined using the Statistica software (Statsoft, Tulsa, OK). All data are presented as the mean \pm SEM, unless otherwise indicated.

4.0 RESULTS

4.1 Size and condition factor

External examination of the fish showed no gross pathological differences between sites. The length, weight and condition factor were not significantly different between sites (data not shown).

4.2 Hepatic VTG mRNA levels

In 2002, VTG mRNA levels were significantly higher at Deep River located upstream of Gatineau as compared with Fer à cheval located downstream (Fig. 2a). To include a reference site in the Ottawa River, we expanded the sampling the following year by including new sites in order to determine if the contaminations observed were site-specific. In the 2003 sampling campaign, the highest concentration of hepatic VTG mRNA were observed at Rivière Blanche and Fer à cheval, both located downstream of the Gatineau city (Fig. 2b). Nevertheless, the differences observed between Deep River and the 2 downstream sites (Rivière Blanche, Fer à cheval) were not significant. Moreover, hepatic VTG mRNA levels observed in fish from Rivière Blanche were significantly higher as compared to the reference site Lac Témiscamingue.

4.3 Intersex

Intersex gonads are comprised primarily of testicular tissue, but with one or more oocytes located randomly within the testicular tissue. In this study, spottail shiners intersex was characterized by the presence of testicular tissue and oocyte undergoing atresis (Fig. 3). Intersex was determined for fish sampled at each of the four sampling sites for the two sampling campaigns (Figure 1). In autumn 2002, 44% of male fish from Deep River exhibited intersex as compared with 6.5 % from Fer à cheval (Fig.4a). In autumn 2003, no fish had intersex in our reference site (Lac Témiscamingue). On the other hand, spottail shiners from Fer à cheval exhibited 50 % of intersex, while 44% of the fish from Rivière Blanche and 18 % of the fish from Deep River displayed intersex (Fig. 4b).

5.0 DISCUSSION

Estrogenic contamination of the St. Lawrence River in the proximity to Montreal has been previously described (Aravindakshan *et al.*, 2004, Sabik *et al.*, 2003). In this study, we investigate the potential contribution of the Ottawa River in the contamination located upstream from the MUC. The Ottawa River is a major tributary of the St. Lawrence River that represents approximately 16 % of the water inputs in normal condition and up to 50 % during the spring floods (Centre St-Laurent, 1996).

In this study, the length, weight and condition factor were not significantly different between spottail shiners captured at the different site in the Ottawa River suggesting that the fish were not overly affected by exposure to xenoestrogens. The results of hepatic VTG mRNA levels in Spottail Shiners captured in the Ottawa River suggest that estrogenic chemicals are present both upstream and downstream from the cities of Gatineau/Ottawa. Indeed, in the 2002 sampling campaign, significantly higher hepatic VTG mRNA levels were found at Deep River located upstream of Gatineau/Ottawa as compared with Fer à cheval located downstream (Fig. 2a). On the other hand, in the 2003 sampling, no significant differences were observed between the upstream (Deep River) and the downstream (Fer à cheval, Rivière Blanche) sites, but significantly higher hepatic VTG mRNA were present at Rivière Blanche as compared with the reference site (Lac Témiscamingue) (Fig 2b). The difference in results between the 2 sampling campaigns is difficult to interpret but may originate from sporadic contamination in 2002 in Deep River.

Histological examination of spottail shiner testes revealed severe effects of this xenoestrogens contamination on gametogenesis. In fact, for the 2003 sampling campaign, a correlation can be made between the incidence of intersex and the induction of hepatic VTG mRNA levels. Intersex gonads were found at all sites except for the reference site and ranged from 0 % (Lac Témiscamingue) to 50 % at Fer à cheval (2003) (Fig.4). These results are similar to observations in St. Lawrence River in which intersex gonads in spottail shiners ranged from 2.7 % at the reference site to 31 % at the most contaminated site (Aravindakshan *et al.*, 2004). Interestingly in this study, intersex is characterized by the presence of atretic follicles (Fig. 3). Atretic oocyte degradation is a degenerative process by which ovarian follicles lose

their integrity and are eliminated prior to ovulation (Janz *et al.*, 1997). It represents the last stage of oocyte maturation, after the spawning period (Sarasquete *et al.*, 2002). In spottail shiners, the spawning period depends on temperature but usually takes place between June and July (NY sport fishing and aquatic resources education program, 2000). Although the two sampling periods in this study took place in autumn and can explain the atretic condition of the oocyte in the male intersexed gonads, it as been shown that certain components of bleached kraft pulp mill effluent increase ovarian follicular apoptosis in fish (Janz *et al.*, 1997). Whether or not the atretic follicles observed in the intersexed gonads occur as a result of estrogenic contamination remains to be established.

In this study, the development of intersex in males and the induction of VTG in immature fish indicate the presence of xenoestrogens in the Ottawa River. Bouma and Nagler, (2001) reported the localization of ER- α protein in the testis of rainbow trout in the precursor of Leydig cells during the early stages of the reproductive cycle and in fully differentiated Leydig cells. Therefore, the histological effects of xenoestrogens on spottail shiners testis present in the Ottawa River could be explained by a potential binding site for xenoestrogens to the ER in testicular cells.

Little is known about the implications of intersex on fecundity. However, a correlation between the degree of intersex and a reduced fertility has been reported (Jobling *et al.*, 2002). Despite the lack of causal links between reduce fertility and pollution-related population reduction (Arukwe, 2001), the high incidence of intersex observed in spottail shiners from the Ottawa River suggests impaired reproductive success and a possible population decline.

In conclusion, the estrogenic contamination observed upstream from the MUC in the St. Lawrence can in part be explained by the contamination found in the Ottawa River. This study is the first to demonstrate estrogenic contamination in the Ottawa River present both upstream and downstream of Gatineau/Ottawa. This xenoestrogenic contamination is correlated with a high incidence of intersexuality. Finally, further studies will be needed to determine the effects of this contamination

on other periods of the reproductive process as well as spermatogenesis, fecundity and fry survival.

6.0 REFERENCES

- ANDERSEN, L., H. Holbech, A. Gessbo, L. Norrgren, and G. I. Petersen. 2003. «Effects of Exposure to 17alpha-Ethinylestradiol During Early Development on Sexual Differentiation and Induction of Vitellogenin in Zebrafish (*Danio Rerio*)». Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, vol. 134, no. 3, p. 365-74.
- ARAVINDAKSHAN, J., V. Paquet, M. Gregory, J. Dufresne, M. Fournier, D. J. Marcogliese, and D. G. Cyr. 2004. «Consequences of Xenoestrogen Exposure on Male Reproductive Function in Spottail Shiners (*Notropis Hudsonius*)». Toxicol Sci, vol. 78, no. 1, p. 156-65.
- ARUKWE, A. 2001. «Cellular and Molecular Responses to Endocrine-Modulators and the Impact on Fish Reproduction». Mar Pollut Bull, vol. 42, no. 8, p. 643-55.
- BOUMA, J. and J. J. Nagler. 2001. «Estrogen Receptor-Alpha Protein Localization in the Testis of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) During Different Stages of the Reproductive Cycle». Biol Reprod, vol. 65, no. 1, p. 60-5.
- CENTRE SAINT-LAURENT. 1996. Rapport-Synthèse sur l'État du Saint-Laurent. Volume 1: L'écosystème du Saint-Laurent. Environnement Canada-Région du Québec, Conservation de l'environnement. Montréal. Éditions MultiMondes.
- FOLMAR, L. C., N. D. Denslow, V. Rao, M. Chow, D. A. Crain, J. Enblom, J. Marcino, and L. J. Guillette Jr. 1996. «Vitellogenin Induction and Reduced Serum Testosterone Concentrations in Feral Male Carp (*Cyprinus Carpio*) Captured Near a Major Metropolitan Sewage Treatment Plant». Environ Health Perspect, vol. 104, no. 10, p. 1096-101.
- GIMENO, S., H. Komen, S. Jobling, J.P. Sumpter, and T. Bowmer. 1998. «Demasculinisation of Sexually Mature Male Common Carp, *Cyprinus Carpio*, Exposed to 4-Tert-Pentylphenol During Spermatogenesis». Aquatic Toxicol, vol. 43, no. 2-3, p. 93-109.
- GRAY, M.A., and C.D. Metcalfe. 1997. «Induction of Testis-Ova in Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) Exposed to p-Nonylphenol». Environ Toxicol Chem, vol. 16, no. 5, p. 1082-1086.
- GRONEN, S., N. Denslow, S. Manning, S. Barnes, D. Barnes, and M. Brouwer. 1999. «Serum Vitellogenin Levels and Reproductive Impairment of Male Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) Exposed to 4-Tert-Octylphenol». Environ Health Perspect, vol. 107, no. 5, p. 385-90.
- HARRIES, J.E., D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, P. Neall, J.P. Sumpter, T. Taylor, and N. Zaman. 1997. «Estrogenic Activity in Five U.K. Rivers Detected by Measurement of Vitellogenesis in Caged Male Trout.» Environ Toxicol Chem, vol. 16, no. 3, p. 534-542.

- HAYES, T. B. 1998. «Sex Determination and Primary Sex Differentiation in Amphibians: Genetic and Developmental Mechanisms». J Exp Zool, vol. 281, no. 5, p. 373-99.
- JANZ, D.M., M.E. McMaster, K.R. Munkittrick, and G. Van der Kraak. 1997. «Elevated Ovarian Follicular Apoptosis and Heat Shock Protein-70 Expression in White Sucker Exposed to Bleached Kraft Pulp Mill Effluent.» Toxicol Appl Pharmacol, vol. 147, no. 2, p. 391-398.
- JOBLING, S., M. Nolan, C.R. Tyler, G. Brighty, and J.P. Sumpter. 1998. «Widespread Sexual Disruption in Wild Fish.» Environ Sci Technol, vol. 32, no. 17, p. 2498-2506.
- JOBLING, S., S. Coey, J. G. Whitmore, D. E. Kime, K. J. Van Look, B. G. McAllister, N. Beresford, A. C. Henshaw, G. Brighty, C. R. Tyler, and J. P. Sumpter. 2002. «Wild Intersex Roach (*Rutilus Rutilus*) Have Reduced Fertility». Biol Reprod, vol. 67, no. 2, p. 515-24.
- KOBAYASHI, T., H. Kajiura-Kobayashi, and Y. Nagahama. 2003. «Induction of XY Sex Reversal by Estrogen Involves Altered Gene Expression in a Teleost, Tilapia». Cytogenet Genome Res, vol. 101, no. 3-4, p. 289-94.
- KRISFALUSI, M. and J. J. Nagler. 2000. «Induction of Gonadal Intersex in Genotypic Male Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Embryos Following Immersion in Estradiol-17Beta». Mol Reprod Dev, vol. 56, no. 4, p. 495-501.
- LYE, C.M., C.L.J. Frid, M.E. Gill, and D. McCormick. 1997. «Abnormalities in the Reproductive Health of Flounder, *Platichthys Flesus*, Exposed to Effluent from Sewage Treatment Works.» Mar Poll Bull, vol. 34, p. 34-41.
- NY SPORT FISHING AND AQUATIC RESOURCES EDUCATION PROGRAM (SAREP) DEPARTMENT OF NATURAL RESOURCES. 1980. Minnow family, Cyprinidae.
- PURDOM, C.E., P.A. Hardiman, and V. J. Bye. 1994. «Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works.» Chem Ecol, vol. 8, p. 275-285.
- ROTCHHELL, J. M. and G. K. Ostrander. 2003. «Molecular Markers of Endocrine Disruption in Aquatic Organisms». J Toxicol Environ Health B Crit Rev, vol. 6, no. 5, p. 453-96.
- SABIK, H., F. Gagne, C. Blaise, D. J. Marcogliese, and R. Jeannot. 2003. «Occurrence of Alkylphenol Polyethoxylates in the St. Lawrence River and Their Bioconcentration by Mussels (*Elliptio Complanata*)». Chemosphere, vol. 51, no. 5, p. 349-56.
- SARASQUETE, C., S. Cardenas, C. M. de Gonzalez, and E. Pascual. 2002. «Oogenesis in the Bluefin Tuna, *Thunnus Thynnus* L.: a Histological and Histochemical Study». Histol Histopathol, vol. 17, no. 3, p. 775-88.

SOTO, A. M., C. Sonnenschein, K. L. Chung, M. F. Fernandez, N. Olea, and F. O. Serrano. 1995. «The E-SCREEN Assay As a Tool to Identify Estrogens: an Update on Estrogenic Environmental Pollutants». Environ Health Perspect. vol. 103 Suppl 7, p. 113-22.

SPENGLER, P., W. Korner, and J. W. Metzger. 2001. «Substances With Estrogenic Activity in Effluents of Sewage Treatment Plants in Southwestern Germany. 1. Chemical Analysis». Environ Toxicol Chem. vol. 20, no. 10, p. 2133-41.

YAMAMOTO, K. and Y. Nagahama. 1969. «Ultrastructure and Reproductive Function of the Adenohypophysis in Teleostei». Horumon To Rinsho. vol. 17, no. 6, p. 512-21.

YAMAMOTO, T. and T. Kajishima. 1968. «Sex Hormone Induction of Sex Reversal in the Goldfish and Evidence for Male Heterogamity». J Exp Zool. vol. 168, no. 2, p. 215-21.

7.0 FIGURES

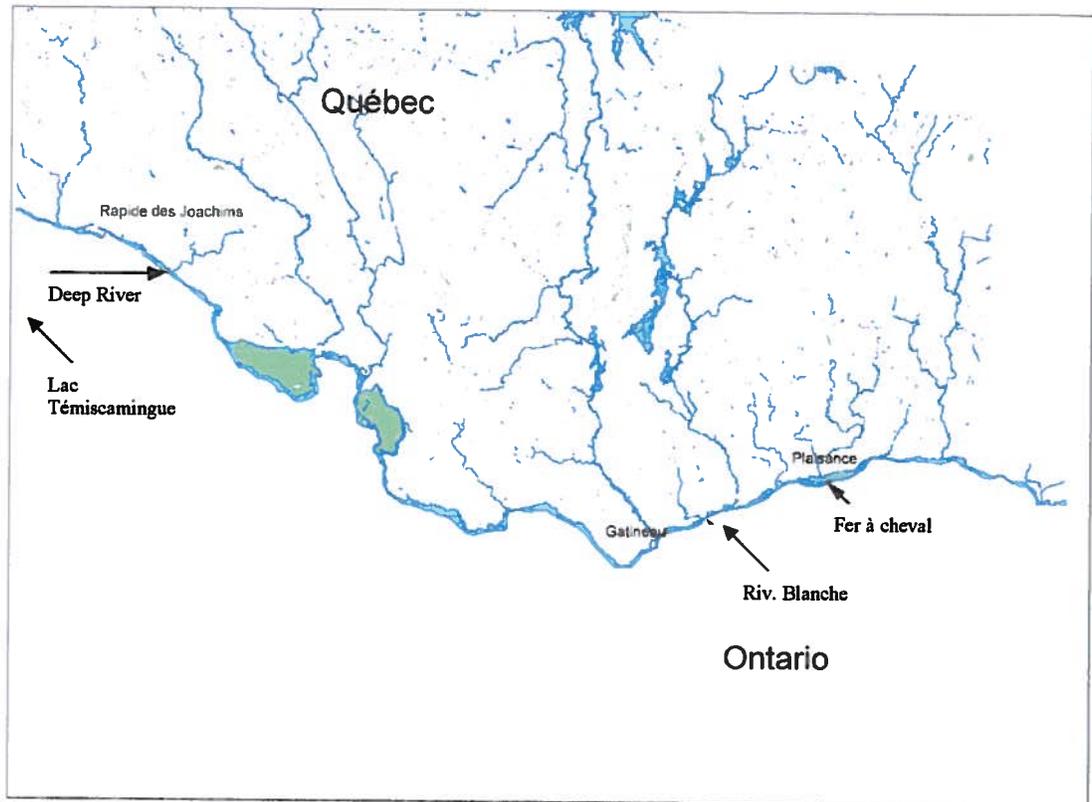


Figure 1 : Sampling sites in the Ottawa River: the downstream sites were Fer à cheval and Rivière Blanche and the upstream sites were Deep River and Lac Témiscamingue.

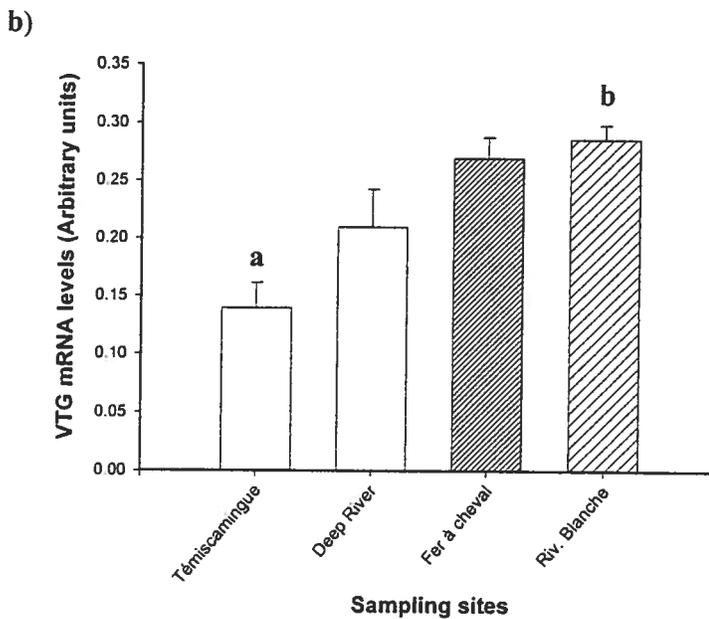
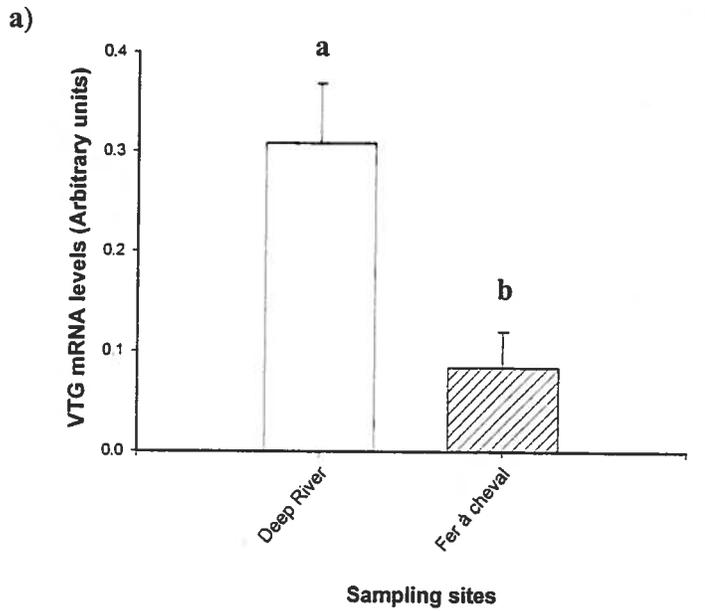


Figure 2: VTG mRNA levels in immature spottail shiners captured at different sites along the Ottawa River in a) 2002 and b) 2003. Total cellular RNA was extracted from the liver and subjected to RT-PCR with specific primers for VTG. Data was standardized by amplification of 28S rRNA transcripts. Data are expressed as the mean \pm SEM. Different superscripts indicate a significant difference between groups (at $p < 0.05$; ANOVA).

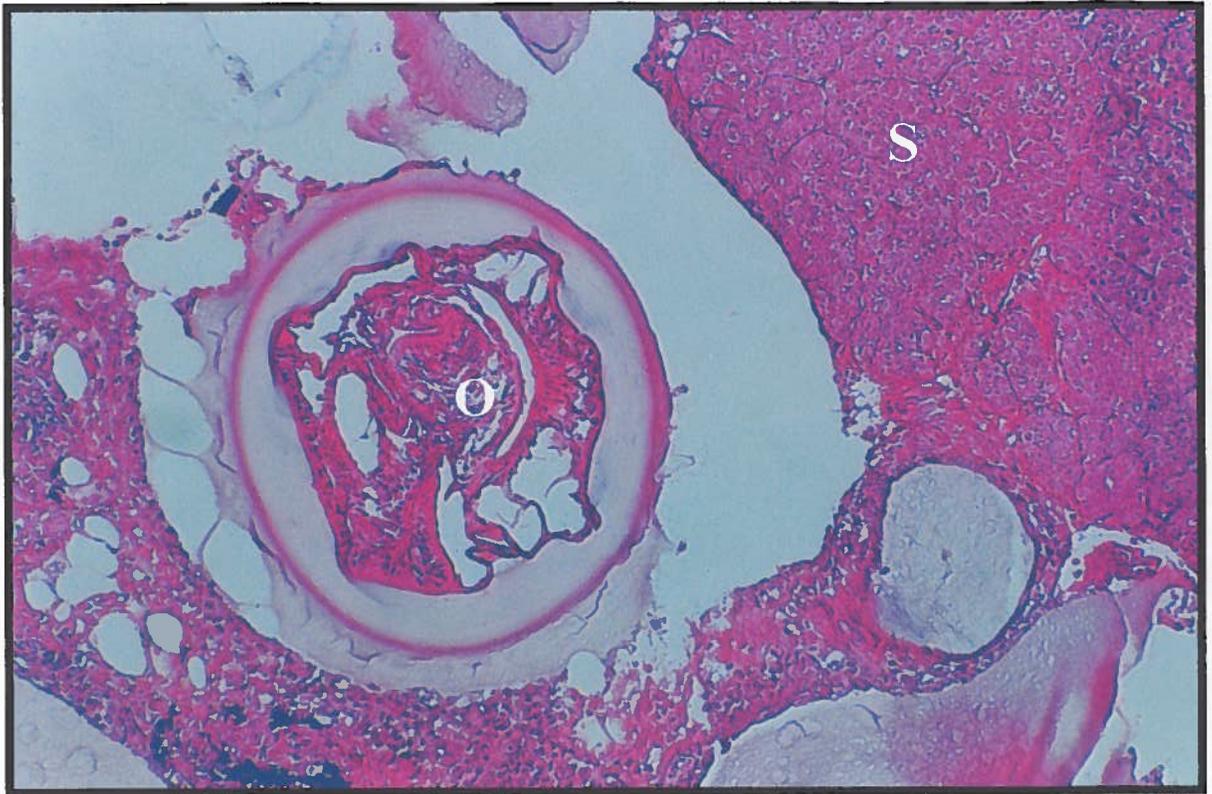


Figure 3 : Photomicrograph at the light microscope level of an intersex spottail shiner testis in the Ottawa River containing testicular tissues and atretic oocytes.
S (sperm cells), O (oocyte)

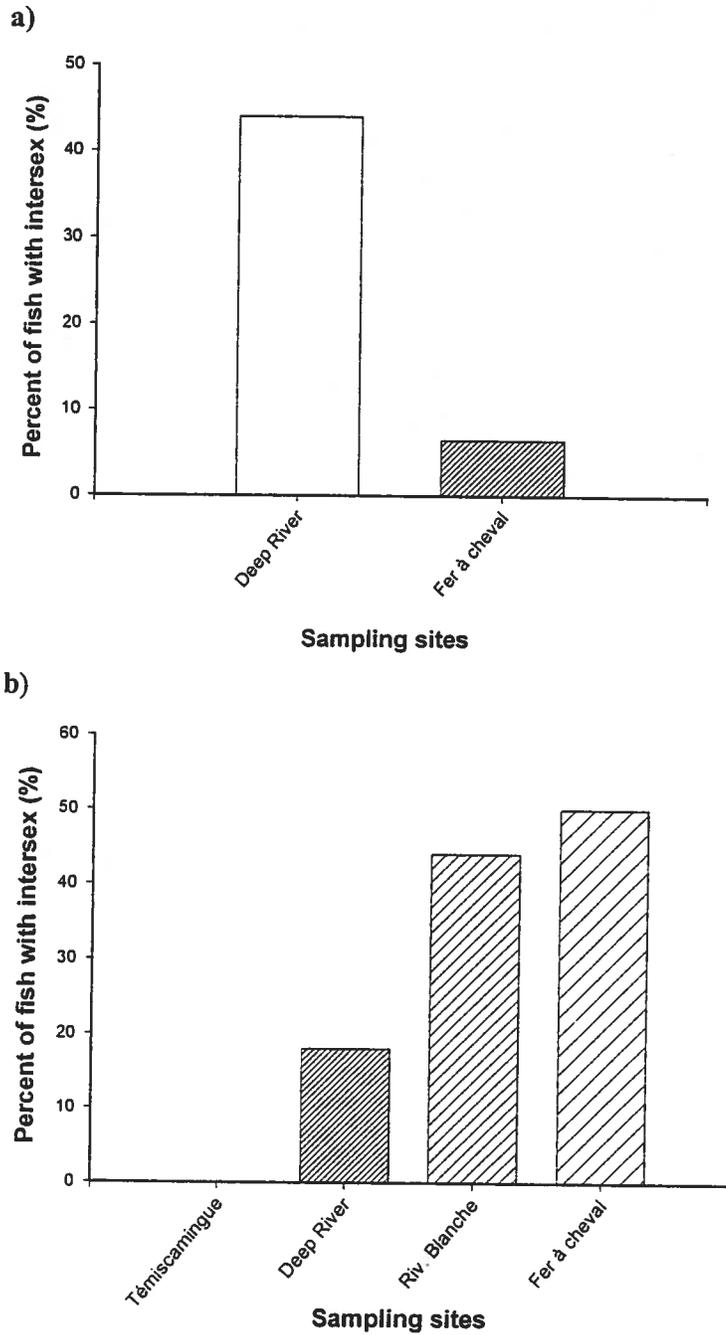


Figure 4: Percent of ovotestis in male spottail shiners from different sites along the Ottawa River captured in a) 2002 and b) 2003.

RÉSUMÉ DE L'ARTICLE

IDENTIFICATION OF A Y CHROMOSOME MARKER IN SPOTTAIL SHINERS (*NOTROPIS HUDSONIUS*) USING AMPLIFIED FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM

Le génome de la plupart des espèces de poissons possède des chromosomes sexuels indifférenciés. Conséquemment, le sexe génétique des poissons est difficilement identifiable. Chez les mammifères, des gènes tels que SRY et ZFY sont localisés sur le chromosome Y et sont spécifiques au phénotype mâle. La présence ainsi que la spécificité au sexe mâle de ces séquences ont été déterminées chez le Queue à tache noire dans le but d'identifier un marqueur spécifique du sexe génétique mâle de cette espèce. Néanmoins, ces séquences sont retrouvées chez les deux sexes chez le Queue à tache noire ; aucune de ces séquences n'est spécifique au sexe mâle. Ce résultat indique que les gènes SRY et ZFY ne sont pas impliqués dans la détermination sexuelle chez le Queue à tache noire. Nous avons donc employé la technique des Polymorphismes de Longueurs de Fragments Amplifiés (AFLP) pour identifier une séquence d'ADN spécifique au sexe mâle du Queue à tache noire. À l'aide de cette méthode, nous avons isolé 5 séquences spécifiques au sexe génétique mâle. L'analyse par Southern Blot des marqueurs 5,1/2 et 5,3/3, identifiés par AFLP, démontre la présence de plusieurs copies de ces séquences dans le génome du Queue à tache noire. Par contre, par Southern Blot, aucune de ces séquences n'est spécifique au sexe génétique mâle du Queue à tache noire. Étant donné notre incapacité à terminer les analyses par AFLP, celle-ci sera ultérieurement employée directement afin de vérifier l'incidence d'inversion sexuelle dans des sites contaminés par des xénoestrogènes dans le fleuve St-Laurent.

**IDENTIFICATION OF A Y CHROMOSOME MARKER IN SPOTTAIL
SHINERS (*NOTROPIS HUDSONIUS*) USING AMPLIFIED FRAGMENT
LENGTH POLYMORPHISM**

Valérie Paquet and Daniel G. Cyr

INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, QC, H9R 1G6

Address for Correspondence :

Dr. Daniel G. Cyr
INRS-Institut Armand-Frappier
Université du Québec
245, Hymus Boulevard
Pointe-Claire, Québec, H9R 1G6
Tel. (514) 630-8833
Tel. (514) 630-8850
e-mail: daniel.cyr@INRS-IAF.quebec.ca

1.0 ABSTRACT

The genome of most fish species has morphologically undifferentiated sex chromosomes. Therefore, genotypic sex identification is problematic in fish. In mammals, genes such as SRY and ZFY are located on the Y chromosome and associated with the differentiation of male sexual phenotype. These genes were studied in the spottail shiners in order to identify a sex-specific marker. However, none were sex-specific in spottail shiners: homologs of these genes were present in both male and female. These results indicate that SRY and ZFY are not involved in sexual determination in spottail shiners. We used Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) analyses to identify a male-linked DNA marker in spottail shiner. We successfully isolated 5 male specific sequences. Southern Blot analysis of 5,1/2 and 5,2/3 markers revealed that these sequences are present in multiple copies in the spottail shiner genome. Nevertheless, Southern Blot analyses indicate that none of these sequences were male-specific in spottail shiners. While we were unable to complete the AFLP analysis, this method will subsequently be used directly to verify the incidence of sex-reversal in spottail shiners living in xenoestrogens contaminated sites of the St.Lawrence River.

2.0 INTRODUCTION

Sexual determination in teleosts is a genetic process in which heterogametic sex chromosomes (XY) results in the male phenotype. On the other hand, gonadal differentiation depends on sex steroids (Yamamoto and Nagahama, 1969). There appears to be a critical period of time in which the development of fish is highly susceptible to sex-reversal by exposure to estrogens (Nagler *et al.*, 2001). For example, Edmunds, McCarthy and Ramsdell, (2000) reported that a single *o,p'*-DDT injection early after fertilisation can lead to a complete, permanent and functional sex-reversal in Medaka. Moreover, Nagler *et al.*, (2001) reported an unusually high proportion of wild Chinook salmon from the Colombia River that appear to have been sex-reversed by exposure to estrogenic chemicals originating from pulps mills early in development.

The genome of many fish species have morphologically undifferentiated sex chromosomes (Griffiths *et al.*, 2000). Therefore, genotypic sex identification is problematic in fish. It can be determined using a DNA test but this is only an option if a sex-specific marker is available. Since 1959, when the Y chromosome was shown to be necessary for male sexual determination in human and mice, several candidate genes on the Y chromosome have been proposed as having roles in male sex determination (Welshons and Russel, 1959). One of them, SRY (sex determining region of the Y chromosome) was identified near the pseudoautosomal pairing region of the human Y chromosome, the area of normal X-Y interchange. This gene is conserved and male-specific in mammals (Tiersch *et al.*, 1992). The SRY gene was found to be expressed for only a short period of time, immediately preceding the first appearance of the Sertoli cells (Koopman *et al.*, 1991). It is known to be comprised of a single exon within which lies 237 base pairs that encode an evolutionary highly conserved group of 79 amino acids known as the HMG box. The SRY gene acts as a transcription factor; its translated protein recognises the specific DNA sequence AACAAAT to which it binds (Harley *et al.*, 1994). In fish, Tiersch *et al.*, (1992) found the presence of an SRY gene in channel catfish but sex-specificity was not associated with the fragment. Another gene, discovered in 1980 and localized to the distal portion of the Y chromosome (Yp), immediately adjacent to the pseudoautosomal region, is designated ZFY. Here, a 140 Kb interval was identified to encode a protein

with multiple zinc finger domains (Koopman *et al.*, 1989). The hypothesis that this was the gene for testicular determination had to be abandoned when XX male with Y-X crossovers lacked the portion of the Y chromosome that carries the ZFY region (Koopman *et al.*, 1989, Palmer *et al.*, 1989).

Hadrys, Balick and Schierwater, (1992) suggested that sex-specific markers may be easily identified, even in complex and relatively unknown genomes, by PCR (Polymerase Chain Reaction) amplification using single primers of random sequence composition. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) has been described by Vos *et al.*, (1995) and has been used by several groups for the identification of sex-specific markers in unknown genomes (Griffiths and Orr, 1999, Griffiths *et al.*, 2000, Lebel-Hardenack *et al.*, 2002). It consists in digesting genomic DNA with two restriction enzymes. Following digestion, adaptors are ligated to the ends of each fragment and PCR is performed using primers complementary to the adaptors, but extending three bases pairs into the genomic fragment. Different primer pairs are used in separate reactions to amplify distinct regions of the genome.

Estrogenic responses have been observed in fish exposed to municipal effluents in many countries, including Canada. The St. Lawrence River, in the Montreal area, contains a sizeable estrogenic contamination which originates from various sources including municipal sewage effluents. This contamination has been demonstrated by our laboratory using the induction of estrogen-dependant protein (vitellogenin) in spottail shiners. At the most contaminated sites, high incidence of intersex was found, which is characterized by the presence of primarily testicular tissue, but with one or more oocytes located randomly within the testicular tissue. The high incidence of intersex in the St. Lawrence River suggests the potential for complete sex-reversal (Aravindakshan *et al.*, 2004). As most sex-reversed male fish including Japanese Medaka (Edmunds, McCarthy and Ramsdell, 2000) and zebrafish (Andersen *et al.*, 2003) are sexually viable, they contribute to the Y-chromosome-bearing eggs, which when fertilized with Y-chromosome-bearing sperm will generate an abnormal genotypic YY individual (Nagler *et al.*, 2001). Thus, the most significant implication of sex-reversal consists in a reduction of genotypic females in the population within each successive generation.

The objective of this study was to assess the sex specificity of the SRY and ZFY genes in spottail shiners and to identify a sex-specific marker by AFLP. This marker could subsequently be used to verify the incidence of sex-reversal in spottail shiners living in the contaminated sites in the St. Lawrence River. Spottail shiners are a sedentary fish species common in the St. Lawrence River that have been used to identify site-specific effects of estrogenic contamination (Aravindakshan *et al.*, 2004).

3.0 MATERIALS AND METHODS

3.1 *Study Area*

We previously established sampling sites in the St Lawrence River upstream and downstream of the MUC (Municipal Urban Community) discharge area. The downstream sites were Îlet Vert and Île Beauregard and the upstream sites were Îles de la Paix and Île Dorval. Fish from Îles de la Paix were selected as reference for this study as this site is relatively non-contaminated.

3.2 *Animal Sampling*

Spottail shiners were captured in June 2002 from Îles de la Paix using a beach seine. Fish were placed in aerated river water and transported to the laboratory. Fish were euthanized using a solution of 0.1% tricaine methansulfonate (MS222, Boreal, Ontario) and tissue samples were collected and snapped frozen at -80°C until use. All protocols used in this study were conformed to the Canadian Council for Animal Care Committee guidelines.

3.3 *Isolation of genomic DNA*

Genomic DNA was isolated from mature male and female spottail shiner muscles using the protocol described by Sambrooke and Russel (2001). For each fish, 100 mg of muscle was placed in liquid nitrogen and ground to a powder. Suspensions were placed in ten volumes of lysis buffer (10 mM Tris-HCl, 0.1 mM EDTA, 0.5 %SDS, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A) and incubated at 37°C for 1h. Proteinase K (20 mg/ml) was added to the lysate to a final concentration of 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ and the lysate was incubated

at 50 °C for 3h. DNA was extracted three times with phenol (equilibrated with 0.1 M Tris-HCl pH=8.0) and then dialysed against 4L of TE buffer overnight at 4 °C. Extracted DNA was stored at -20 °C until used.

3.4 *SRY/ZFY PCR analysis*

Based on the conserved region of the mammalian SRY and ZFY sequences, we designed PCR primers named SRY-F (5'-CTCCGGAGAAGCTCTTCCTT-3'), SRY-R (5'-ATTCTTGAGTGYGTGGCTTT-3') and two overlapping regions of the ZFY gene designed short (S) and long (L) ZFYL-F (5'-TGSRAARAARTTTCGCTCG(A)-3'), ZFYS-F (5'-CTGARCARGGGCTAYTGAAC-3') ZFY-R (5'-CTKYACYRTGCTTASTCTTG-3'). A 0.25 µg aliquot of genomic DNA from male and female spottail shiners was subjected to PCR amplification. PCR was performed in a 50 µl reaction volume with a final concentration of 1.5 mM 10X PCR buffer, 0.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 0.75 U Taq DNA polymerase, 0.5 µM forward and 0.5 µM reverse primer. The amplification protocol involved: denaturation at 94 °C for 30s, annealing at 53.5 °C for 35s and primer extension at 72 °C for 1min. Thirty-eight cycles were performed with final extension of 7min at 72 °C. PCR products were visualized on 2% agarose gel containing ethidium bromide and analysed by densitometry using a computerized analysis system (Bio-Rad, Multi-Analyst, version 1,1). Bands were excised and purified from the agarose gel using QIAEX II Gel Extraction Kit (QIAEX, Mississauga, Ontario).

3.5 *AFLP*

AFLP was performed using AFLP Analysis system 1 (Invitrogen, Burlington, Ontario) on ten histologically sexed spottail shiners (5 males:5 females) from the control site. DNA was cut with *EcoRI* and *MseI* restriction enzymes and specific adaptor sequences were ligated to the *EcoRI* and *MseI* restriction extremities. Preselective PCR amplification with primers specific to adaptors except for an additional 3' preselective nucleotide was used as template for the preselective amplification. Selective amplification was performed using selective primers: E-nnn (radiolabelled with [γ -³³P]dATP (Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, Québec) and

M-nnn containing three randomly selected bases at the 3' end. PCR products were separated on a 6% denaturing polyacrylamide gel. The gels were dried (Bio-Rad Laboratory, Mississauga, Ontario) and subjected to autoradiograph using an X-ray film (Kodak) for 72h at -80 °C. The AFLP markers were excised from the acrylamide gel, extracted following the protocol by Sambrooke and Russel, (2001) and reamplified using the same primer combinations.

3.6 Cloning and sequences analysis

PCR products for SRY and ZFY amplification and AFLP markers were cloned into the pCR2.1-TOPO vector (Invitrogen, Burlington, Ontario) and used to transfect *Escherichia coli*. Plasmids were amplified and purified from individual colonies using the Qiagen Plasmid Purification Kit (Qiagen, Mississauga, Ontario) according to the manufacturer's instructions. Identity of the cloned fragments was confirmed by restriction digest with EcoRI (Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, Quebec) and then sequenced using an automated sequencer (Sheldon Biotechnology Centre, McGill University, Montreal, Quebec).

3.7 Southern Blotting

Ten micrograms of genomic DNA from male and female spottail shiners from the control site were digested with *EcoRI* and *MseI* and separated on 0.8% agarose gel. DNA was transferred onto a nylon membrane (Gene Screen Plus, Perkin Elmer, Boston) by vacuum transfer (Bio-Rad Laboratory, Mississauga, Ontario). The recombinant plasmids pCR2.1-TOPO (Invitrogen, Burlington, Ontario) containing the AFLP markers (5,1/2 and 5,2/3) were digested with *EcoRI* and separated on 1% agarose. The male-specific markers were extracted from the agarose (QIAEX II, Gel extraction kit, Mississauga, Ontario) and radiolabelled with [α -³²P]dCTP (Ready-to-go, DNA labelling kit, Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, Quebec) and used as a probe to hybridize the membrane. Following the hybridization, the membranes were washed at 50 °C two times in 2X SSC for 20min and in 2X SSC/1% SDS for 15min, fixed at 80 °C for 45min and exposed for 72h to phosphor screen and scanned using a

Molecular Dynamics Phosphorimager (PhosphorImager, SI™ Molecular Dynamics/Amersham Biosciences, Baie d'Urfe, Quebec).

4.0 RESULTS

4.1 SRY/ZFY PCR analysis

The amplified PCR products for spottail shiners SRY and ZFY (long and short) resulted in multiple fragments and showed similar patterns in both male and female shiners (Fig. 2). Even if these products did not show any sex-specificity for male spottail shiners, the nucleotide sequence from these amplification products was obtained after cloning and sequencing. GenBank Blast (NCBI) analyses of the 448 bp product of SRY amplification confirmed that this was the in spottail shiner SRY transcript. From the multiple fragments amplified with primers specific for 2 conserved overlapping region of the ZFY gene, we failed to identify the ZFY gene. Blast analyses (GenBank) indicated that the 427 bp transcript had an homology with the mammalian ZFX, the ZFY homologue on the X chromosome (ZFX).

4.2 Identification of sex-specific markers in spottail shiners using the AFLP technique

Comparative AFLP analysis was performed on pre-sexed male versus female spottail shiners captured at the reference site. Five sex-specific AFLP markers were found in 5 males individuals. With the primer combinations E-AGG/M-CAC, two male specific bands were amplified. Most of the AFLP products separated on the polyacrylamide gel were monomorphic (Fig. 3a) as they were present in all individuals, while some products were polymorphic (Fig. 3b) or sex-specific. Consequently, this suggests that spottail shiners are a heterogametic species where males have different sex chromosome.

4.3 Cloning and sequence analysis of the AFLP markers

The five sex-specific markers identified by AFLP were excised from the dried polyacrylamide gel, re-amplified, cloned and sequenced (Fig. 4). The full-length

nucleotide sequences of the 5 markers were determined and submitted to GenBank (NCBI) for comparison with known sequences using the BLAST analyses. Both the DNA and predicted amino-acid sequences showed no significant homology with any known sequences in GenBank with the exception of marker 3/3 that was homologous with 2 novel genes identified in Zebrafish and that are similar to PDE6A (c-GMP-specific phosphodiesterase 6A alpha) and PERC (PGC-1-related estrogen receptor alpha coactivator) and two GpC island (Accession number: AL645792.7).

4.4 Southern Blotting

The male-specific markers (5,1/2 and 5,2/3) were used as probes in an attempt to develop a simple genotypic sex test as well as search for homologous sequences in the genome of spottail shiners. Southern Blot analysis of 5,1/2 (right) and 5,2/3 (left) resulted in strong hybridization signals in both male and female DNA digested with *EcoRI* and *MseI* (Fig. 5). Both probes produced multiple bands indicating that these sequences are present in multiple copies in the genome. Nevertheless, none of the probes produced a male-specific pattern.

5.0 DISCUSSION

Estrogenic contamination of the St. Lawrence River in the proximity of Montreal has been previously described (Aravindakshan *et al.*, 2004). This contamination was demonstrated by the induction of vitellogenin, an estrogen-dependant protein in Spottail shiners, and correlated with a high incidence of intersex. This finding suggests the potential for complete sex-reversal. The identification of a Y-chromosome marker in spottail shiners represents a unique tool to determine the prevalence of male-specific genetic markers in phenotypic female in the St. Lawrence River, which would suggest that they have undergone sex reversal.

The ability to carry out DNA sex identification on a species depends on gender determination. Sex determination is controlled by genes present on the Y chromosome. Consequently, any individual who contains this chromosome must possess a male phenotype. In only some fish species, sex chromosome are well-differentiated and less than 1 % of the species tested showed gender-specific

karyotypes (Kovacs *et al.*, 2000). In most of the fish species, sex chromosomes are moderately differentiated and impossible to distinguish karyotypically. Moreover, even if a Y chromosome is present, much of the DNA on this chromosome is not unique and occurs elsewhere in the genome (Griffiths and Orr, 1999). Furthermore, genomic analysis of fish sex chromosomes is complicated by the fact that in some species, environmental or social factors can override genetic sex determination (Yamamoto and Nagahama, 1969). Because of the difficulty in karyotyping sex chromosomes, genotypic sex identification can be achieved using tools that focus on specific DNA sequences of the Y-chromosome. Several genes have been hypothesised as sex-determining factors in fish. To our knowledge, the only sex-linked genes reported in the literature are DMRT1, specific to male gender in Medaka (Volf, Kondo and Scharl, 2003) and GPI-B in channel catfish (Liu *et al.*, 1996). These genes do not show sex-specificity in other fish species.

In order to obtain a sex-specific marker in spottail shiners, we investigated the sex-specificity of two master sex-determining genes in male mammals, SRY and ZFY. Neither of these genes were found to be male specific in spottail shiners. We characterized a portion of 448 bp of spottail shiners SRY gene. This gene, like others of the Sox gene family, revealed a high degree of diversity with the exception of the well conserved HMG Box (Spotila *et al.*, 1994). The spottail shiners homologue is identical to the HMG conserved region of the monkey SRY gene. The SRY gene was not sex-specific in channel catfish (Tiersh *et al.*, 1992) suggesting that fish may have evolved before the sex-determining property of the SRY gene arose in mammals. In spottail shiners, multiple fragments were amplified with specific primers for the conserved DNA region of SRY. This situation is similar to the experiment of Tiersh *et al.*, (1992) in the channel catfish and of Gubbay *et al.*, (1990) in the mouse who obtained multiple fragments of this transcript. This can be explained by the conserved HMG-Box present in the members of the Sox gene family. Following PCR amplification with 2 sets of primers specific for conserved region of mammalian ZFY gene, only one band from the multiple fragments present on the agarose gel show a small degree of homology (5%) with the ZFX gene, a ZFY homologue on the X chromosome. Sequences homologous to the mammalian ZFY gene were found to be present in both sexes in reptiles (Bull, Hillis and O'Steen, 1988, Spotila *et al.*, 1994), sturgeon and trout (Ferreiro, Medrano and Gall, 1989). Moreover, Tiersh *et al.*,

(1992), using primers specific for conserved regions of ZFY and ZFX genes, were not able to distinguish between the two in male and female channel catfish suggesting that the Y-chromosome diverged from an ancestral autosomal pair of chromosome in which the Y-chromosome lost part of its genetic material to become the master sex-determining gene.

Due to the absence of known male-specific genes in spottail shiners, we used AFLP to isolate a Y-chromosome marker. This technique does not require preliminary knowledge of the genome and allows a great number of primer pairs. AFLP amplifications are performed under conditions of high selectivity that permit the elimination of artefacts (Mueller et Wolfenbarger, 1999). This approach has been applied in the isolation of sex-linked markers in both animals and plants (Griffiths and Orr, 1999, Griffiths *et al.*, 2000, Peil *et al.*, 2003). Using different primer pairs, we successfully isolated 5 male-specific markers in spottail shiners. Moreover, the AFLP technique allows the visualization of monomorphic markers as well as polymorphic and sex-specific markers. Thus, it can be used not only in DNA sex identification but in population analysis as well as mutation screening (Van den Braak *et al.*, 2004).

Southern Blot hybridization using the AFLP markers 5,1/2 and 5,2/3 against genomic DNA digested with *EcoRI* and *Mse I* produced multiple bands suggesting the presence of several copies of these markers in the spottail shiner genome. These results are consistent with the fact that much of the DNA present on the Y-chromosome is not unique and occurs elsewhere in the genome (Griffiths et Orr., 1999). Interestingly, differences were not detected between sexes, although polymorphisms in certain bands were observed (Fig. 5). The low sensitivity of the Southern Blot method to detect low copy number of small molecular weight AFLP markers may not have allowed us to observe male-specific pattern. Moreover, Southern Blot analysis involves the digestion of large amount of genomic DNA. The absence of male-specific band on the blots may be explained by the incomplete restriction digestion of genomic DNA. Consequently, the AFLP method will subsequently been used directly to identify of sex-reversal in spottail shiners exposed to estrogenic contamination in the St. Lawrence River.

Finally, these results indicate that SRY and ZFY are not involved in sex determination and that they cannot be used for the identification of genotypic sex in spottail shiners. AFLP results allowed us to conclude in a male heterogametic sex in spottail shiners and may provide a tool for genomic sex identification in spottail shiners as well as the possibility to verify the incidence of sex-reversal in the estrogen contaminated sites in both the St. Lawrence River and Ottawa River.

6.0 REFERENCES

- ANDERSEN, L., H. Holbech, A. Gessbo, L. Norrgren, and G. I. Petersen. 2003. «Effects of Exposure to 17alpha-Ethinylestradiol During Early Development on Sexual Differentiation and Induction of Vitellogenin in Zebrafish (*Danio Rerio*)». Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, vol. 134, no. 3, p. 365-74.
- ARAVINDAKSHAN, J., V. Paquet, M. Gregory, J. Dufresne, M. Fournier, D. J. Marcogliese, and D. G. Cyr. 2004. «Consequences of Xenoestrogen Exposure on Male Reproductive Function in Spottail Shiners (*Notropis Hudsonius*)». Toxicol Sci, vol. 78, no. 1, p. 156-65.
- BULL, J. J., D. M. Hillis, and S. O'Steen. 1988. «Mammalian ZFY Sequences Exist in Reptiles Regardless of Sex-Determining Mechanism». Science, vol. 242, no. 4878, p. 567-9.
- EDMUNDS, J. S., R. A. McCarthy, and J. S. Ramsdell. 2000. «Permanent and Functional Male-to-Female Sex Reversal in D-RR Strain Medaka (*Oryzias Latipes*) Following Egg Microinjection of O,p'-DDT». Environ Health Perspect, vol. 108, no. 3, p. 219-24.
- FERREIRO, C., J.F. Medrano, and G.A.E. Gall. 1989. «Genomic Analysis of Rainbow Trout and Sturgeon with Restriction Enzymes and Hybridization with a ZFY Gene Derived Probe to Identify Sex.» Aquaculture, vol. 81, no. 3-4, p. 245-251.
- GRIFFITHS, R. and K. Orr. 1999. «The Use of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) in the Isolation of Sex-Specific Markers». Mol Ecol, vol. 8, no. 4, p. 671-4.
- GRIFFITHS, R., K.J. Orr, A. Adam, and I. Barber. 2000. «DNA sex identification in the Three-Spined Stickleback.» J Fish Biol, vol. 57, p. 1331-1334.
- GUBBAY, J., J. Collignon, P. Koopman, B. Capel, A. Economou, A. Munsterberg, N. Vivian, P. Goodfellow, and R. Lovell-Badge. 1990. «A Gene Mapping to the Sex-Determining Region of the Mouse Y Chromosome Is a Member of a Novel Family of Embryonically Expressed Genes». Nature, vol. 346, no. 6281, p. 245-50.
- HADRYIS, H., M. Balick, and B. Schierwater. 1992. «Applications of Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) in Molecular Ecology». Mol Ecol, vol. 1, no. 1, p. 55-63.
- HARLEY, V. R., R. Lovell-Badge, and P. N. Goodfellow. 1994. «Definition of a Consensus DNA Binding Site for SRY». Nucleic Acids Res, vol. 22, no. 8, p. 1500-1.
- KOOPMAN, P., J. Gubbay, J. Collignon, and R. Lovell-Badge. 1989. «Zfy Gene Expression Patterns Are Not Compatible With a Primary Role in Mouse Sex Determination». Nature, vol. 342, no. 6252, p. 940-2.
- KOOPMAN, P., J. Gubbay, N. Vivian, P. Goodfellow, and R. Lovell-Badge. 1991. «Male Development of Chromosomally Female Mice Transgenic for Sry». Nature, vol. 351, no. 6322, p. 117-21.

- KOVACS, B., S. Egedi, R. Bartfai, and L. Orban. 2000. «Male-Specific DNA Markers From African Catfish (*Clarias Gariepinus*)». Genetica, vol. 110, no. 3, p. 267-76.
- LEBEL-HARDENACK, S., E. Hauser, T. F. Law, J. Schmid, and S. R. Grant. 2002. «Mapping of Sex Determination Loci on the White Campion (*Silene Latifolia*) Y Chromosome Using Amplified Fragment Length Polymorphism». Genetics, vol. 160, no. 2, p. 717-25.
- LIU, Q., C. A. Goudie, B. A. Simco, and K. B. Davis. 1996. «Sex-Linkage of Glucosephosphate Isomerase-B and Mapping of the Sex-Determining Gene in Channel Catfish». Cytogenet Cell Genet, vol. 73, no. 4, p. 282-5.
- MUELLER, U. G. and L. L. Wolfenbarger. 1999. «AFLP Genotyping and Fingerprinting». Trends in Ecology and Evolution, vol. 14, no. 10, p. 389-94.
- NAGLER, J. J., J. Bouma, G. H. Thorgaard, and D. D. Dauble. 2001. «High Incidence of a Male-Specific Genetic Marker in Phenotypic Female Chinook Salmon From the Columbia River». Environ Health Perspect, vol. 109, no. 1, p. 67-9.
- PALMER, M. S., A. H. Sinclair, P. Berta, N. A. Ellis, P. N. Goodfellow, N. E. Abbas, and M. Fellous. 1989. «Genetic Evidence That ZFY Is Not the Testis-Determining Factor». Nature, vol. 342, no. 6252, p. 937-9.
- PEIL, A., H. Flachowsky, E. Schumann, and W. E. Weber. 2003. «Sex-Linked AFLP Markers Indicate a Pseudoautosomal Region in Hemp (*Cannabis Sativa L.*)». Theor Appl Genet, vol. 107, no. 1, p. 102-9.
- SAMBROOKE, J and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual: 3th edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- SPOTILA, L. D., N. F. Kaufer, E. Theriot, K. M. Ryan, D. Penick, and J. R. Spotila. 1994. «Sequence Analysis of the ZFY and Sox Genes in the Turtle, *Chelydra Serpentina*». Mol Phylogenet Evol, vol. 3, no. 1, p. 1-9.
- TIERSCH, T. R., B. A. Simco, K. B. Davis, and S. S. Wachtel. 1992. «Molecular Genetics of Sex Determination in Channel Catfish: Studies on SRY, ZFY, Bkm, and Human Telomeric Repeats». Biol Reprod, vol. 47, no. 2, p. 185-92.
- VAN DEN BRAAK, N., G. Simons, R. Gorkink, M. Reijans, K. Eadie, K. Kremers, D. van Soolingen, P. Savelkoul, H. Verbrugh, and A. van Belkum. 2004. «A New High-Throughput AFLP Approach for Identification of New Genetic Polymorphism in the Genome of the Clonal Microorganism *Mycobacterium Tuberculosis*». J Microbiol Methods, vol. 56, no. 1, p. 49-62.
- VOLFF, J. N., M. Kondo, and M. Schartl. 2003. «Medaka DmY/Dmrt1Y Is Not the Universal Primary Sex-Determining Gene in Fish». Trends Genet, vol. 19, no. 4, p. 196-9.
- VOS, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. van de Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper, and M. Zabeau. 1995. «AFLP: a New Technique for DNA Fingerprinting». Nucleic Acids Res, vol. 23, no. 21, p. 4407-14.

WELSHONS, W.J., AND L.B. Russel. 1959. «The Y chromosome as the bearer of male-determining factor in the mouse.» Proc Nat Acad Sci (USA), vol. 45, p. 560-566.

YAMAMOTO, K. and Y. Nagahama. 1969. «Ultrastructure and Reproductive Function of the Adenohypophysis in Teleostei». Horumon To Rinsho, vol. 17, no. 6, p. 512-21.

7.0 FIGURES

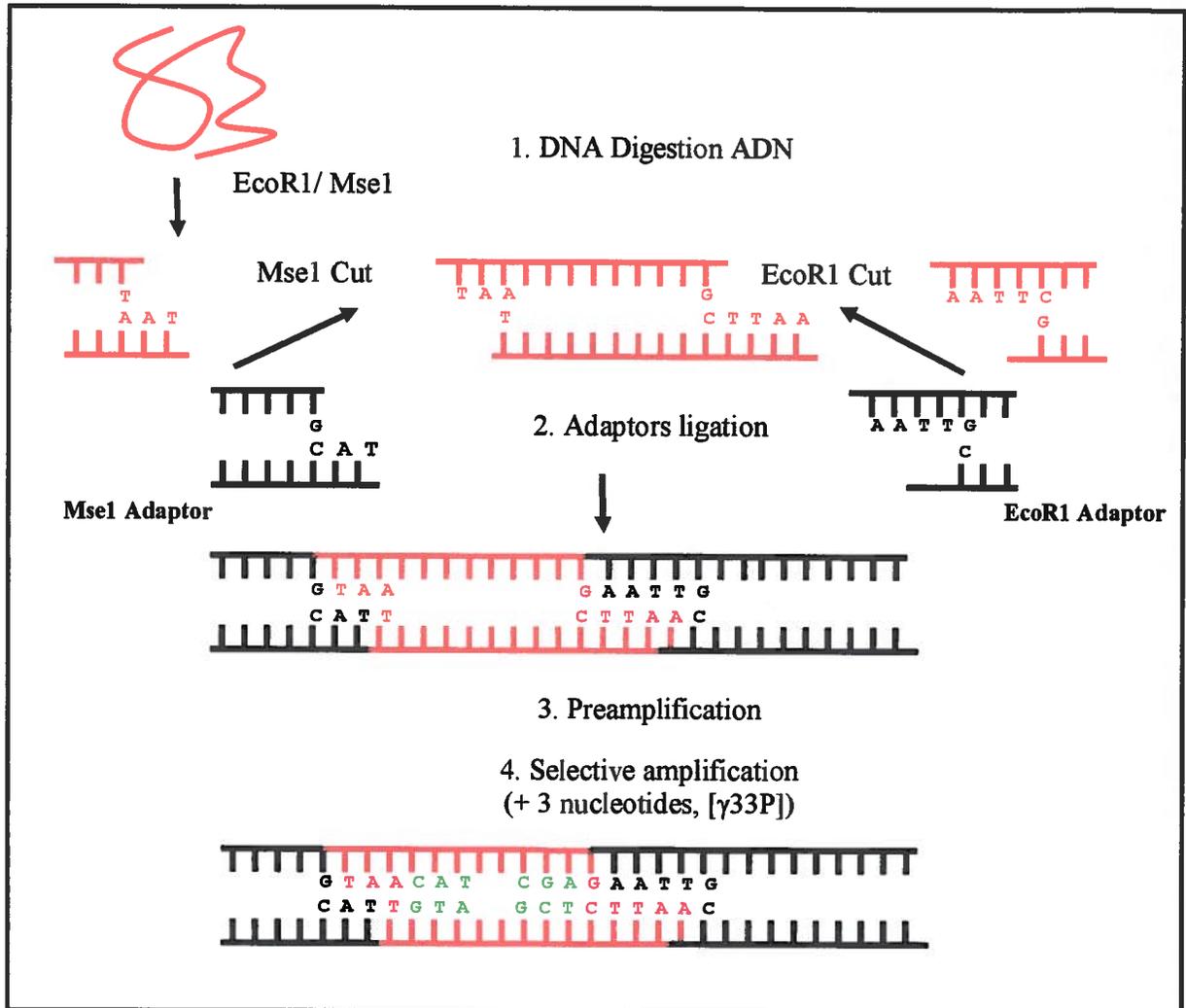


Figure 1 : Diagrammatic presentation of the AFLP technique. Genomic DNA is digested with two restriction enzymes (*EcoRI* and *MseI*) (1), and AFLP adaptors are ligated to the DNA ends (2). Preamplification (3) is performed with primers specific to the two adaptors ligated in step (2) except for an additional 3' preselective nucleotide. Selective amplification is then carried out with PCR primers specific to the adaptors but three further 3' selective nucleotides are added and the *EcoRI* primers are end-labelled with gamma $[\gamma^{33}\text{P}]$ dATP. The PCR products are separated on a polyacrylamide gel.

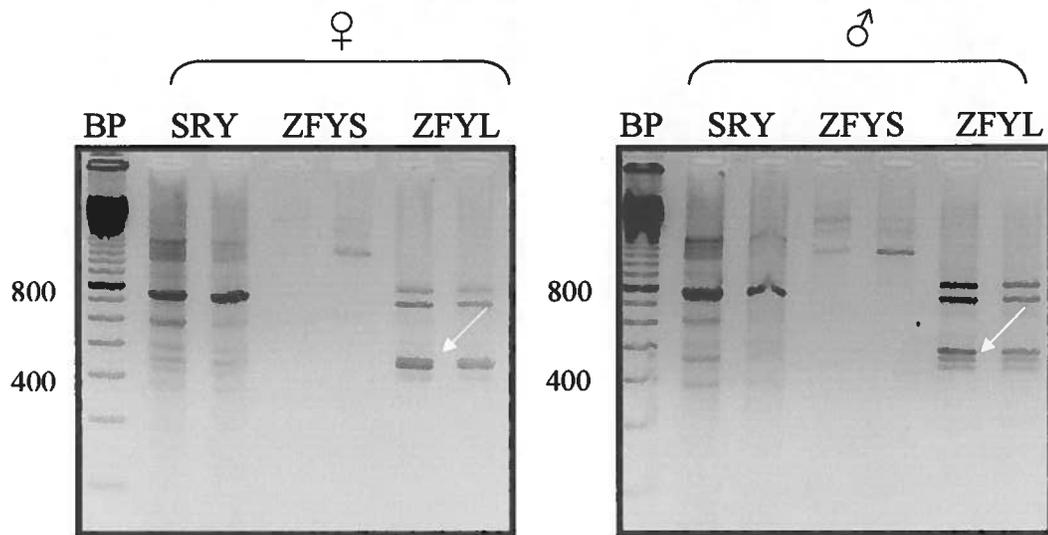


Figure 2: PCR amplification of SRY and two regions of the ZFY (long and short) genes in female (left) and male (right) spottail shiners. The multiple bands obtained were cloned and sequenced. PCR products represented by an arrow were identified as SRY and ZFX and were not sex-specific in spottail shiners as they were present in both male and female (BP=Number of base pairs).

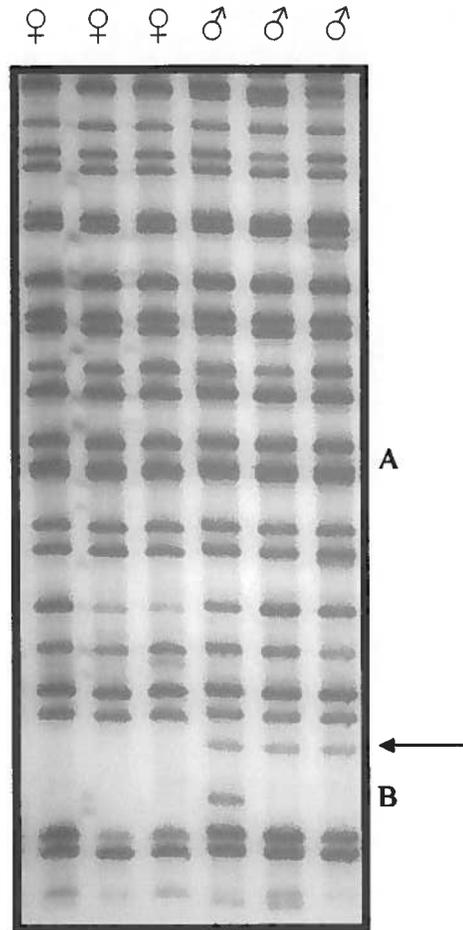


Figure 3: Typical AFLP profiles generated by 3 females (left) and 3 males (right) spottail shiners using primer combination E-AGG/M-CAC. Most of the bands present on the polyacrylamide gel were monomorphic (A), some were polymorphic (B) or sex-specific (arrow).

Markers	Sequences
2/1	GACTGCGTACCAATTCACACTGGAAGGAAACCGTACAAGTGCTC ACACTGTGGAAAGAGTTTCCACTTACCAGCTGTTCAACGGAACC ATACAAAAAAAAAAAAACATTGTCCGAAGTTGTCTAAAAGTCTATG TTCTGATCAAGCGGCAACATTCTAATCTGAAAGCTGAAGCCTAC CCGGAAGTGCGAAAACTGCAATACAACCTCAAATCCGCTAGAG GGCGGTCCCAAAGGGAGTAAATATCCATAGACGTCATGTTACT CAGGACTCATCA
3/3	CTTGATGAGTCCTGAGTAACTTACAAAATTGCCAGGAATTTACA GGATCAAAGAGTATTATTTTACACACAAAAAATGACTGTAGTC AGAAATGTGTGAAATGGTCATCCTGGGTCATTTTCTTATAAATTA CTTTGAAACAATAGCAGAATGATGATATAATATCACAGTAATTT ACTGCTCTTGTTTTACTGTGAATTGGTACGCAGTCAATC
5,1/2	GAACTGCGTACCAATTCAGGCTCTATCTCTTCAGCATGTCCCTAA ACAAAACACTGCAAAGAGGAGAACAATGAGCAGATAAAGCA AATTGGATTGGAAATTTAGTCCCCCAAATGACCACATAAATTAT TGCCCATGCAAATCGCCCCAGTGTTACTCAGGACTCATCA
5,2/3	TGAACTGCGTACCAATTCAGGGGTAACCGGAGCTGGTAAGTGAC TGGGTTTACTTGTCTGACGATTGGAAAGGGTCCGATGTACTTGG GGTTTAGTTTCTTACATGACTGACGAAGTCTGATGTCTCGAGTGG AAAGCCAGACTAATTGCTCGGGTTGATACTCTGGAGTAGGTCGT CGTTGTGTGTCAGCGAACCGTTGGTGTCTATTGACAGCTTGTGG ATTATGATGGTGAATTTAGATCCCAAACCTGTTTCGCTTTCCTCAA ACCACTTGTGACGGCAGGCACTTCGGAAGGTTCTCCGGACCAT GGGAATAACGGGGGTTGATAGCCAAGGATACATTGGAATGGTGT TACTCAGGACTCATCA
8/4	GATGAGTCCTGAGTAAACAGGCTAAAGACTATTTGCAATTATTCA AATGTGGAGACAACCACAAATAAGTGAATTGGTACGCAGTCA

Figure 4: Nucleotide sequences of the 5 sex-specific markers identified with the AFLP technique. Sequence 2/1 was obtained with primer pair E-ACA/M-CAT, sequence 3/3 was obtained with primer pair E-ACA/M-CTT, sequences 5.1/2 and 5.2/3 were obtained with primer pair E-AGG/M-CAC and sequence 8/4 was obtained with primer pair E-ACT/M-CAG.

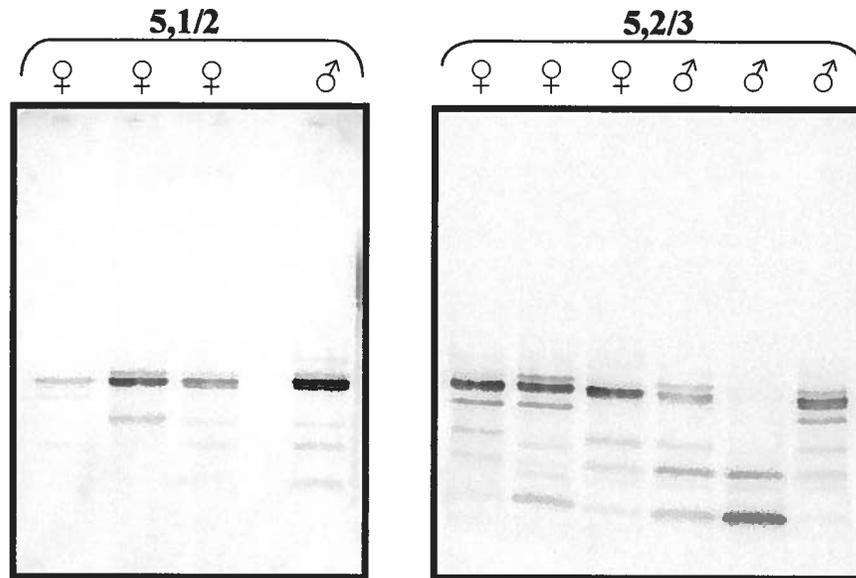


Figure 5: Southern Blot of male-specific AFLP markers 5,1/2 (right) and 5,2/3 (left) hybridized to male and female genomic DNA digested with *EcoRI* and *MseI* restriction enzymes. Hybridization patterns of both male and female do not differ between each other. Multiple fragments on the blots indicate the presence of several 5,1/2 and 5,2/3 copies in the spottail shiner genome.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Le système endocrinien représente un mode de communication majeur qui régule et coordonne l'activité cellulaire dont dépend l'homéostasie. Il joue un rôle crucial dans pratiquement toutes les fonctions biologiques des organismes tels que la différenciation sexuelle avant la naissance, la maturation sexuelle à la puberté, la reproduction, la croissance, le métabolisme, la digestion, la fonction cardiovasculaire et l'excrétion. Il est maintenant reconnu par la population scientifique que certains xénobiotiques possèdent l'habileté de moduler le système endocrinien. Ces composés incluent les hormones naturelles et de synthèses, les phytoestrogènes, des pesticides ainsi qu'un grand nombre de composés industriels (Colborn, vom Saal et Soto, 1993).

Le milieu aquatique est particulièrement susceptible de contenir des polluants à effets modulateurs endocriniens dont les xénoestrogènes. Lors de mon étude, le fleuve St-Laurent a été étudié. La susceptibilité de ce milieu aquatique origine du fait que la décharge municipale de la Communauté Urbaine de Montréal (CUM) rejette ses effluents dans le fleuve St-Laurent à un point unique situé à l'extrémité Nord-est de l'île. De plus, des données révèlent la présence d'alkylphénols dans l'eau et les sédiments aux alentours de Montréal, plus particulièrement en aval de la décharge municipale (Sabik *et al.*, 2003).

Étant donné la présence d'une contamination oestrogénique et devant la présence potentielle de plusieurs composés oestrogéniques dans le fleuve St-Laurent, notre objectif était de caractériser les effets d'une contamination en xénoestrogènes sur le système reproducteur mâle du Queue à tache noire, une espèce retrouvée en grande quantité dans le fleuve St-Laurent.

Ainsi, dans la première partie de cette étude, les niveaux hépatiques d'ARN messagers de vitellogénine chez les Queues à tache noire immatures révèlent une importante contamination en xénoestrogènes en amont et en aval de la décharge municipale de la CUM. Les analyses histologiques effectuées sur les gonades de Queues à tache noire mâles matures indiquent un ralentissement considérable de la progression de la

spermatogenèse caractérisé par une absence complète du dernier stade de maturation testiculaire dans les deux sites d'échantillonnages situés en aval de la décharge municipale de la CUM et où les niveaux hépatiques de vitellogénine sont élevés. De plus, une diminution de ce dernier stade a été observée dans un site situé en amont de celle-ci. Fait intéressant, l'absence du dernier stade de maturation des testicules caractérisée par une diminution du nombre de spermatozoïdes dans les tubules suggère que l'exposition aux xénoestrogènes présents dans le fleuve St-Laurent inhibe la transformation des spermatides en spermatozoïdes. Dans une étude effectuée par Kinnberg et Toft (2003), des guppies mâles ont été exposés aux composés oestrogéniques 4-*tert*-octylphénol et bisphénol A et les effets observés sont une réduction des kystes contenant les cellules germinales. Contrairement aux résultats de mon étude, les auteurs associent ces effets à une inhibition de la mitose menant aux spermatocytes. Ainsi, le ralentissement dans la progression de la spermatogenèse chez les Queues à tache noire dans le fleuve St-Laurent est non seulement l'une des premières évidences microscopiques des effets d'une exposition aux xénoestrogènes dans un environnement naturel sur la progression de la maturation des gamètes mais aussi le premier indice d'une inhibition de la méiose menant aux spermatozoïdes.

Cette observation laisse envisager une concentration en spermatozoïdes diminuée au moment du frai ainsi qu'une désynchronisation de celle-ci entre les males et les femelles Queues à tache noire. Cette possible désynchronisation de la période du frai pourrait résulter en conséquences majeures au niveau des populations. En effet, les processus énergétiques encourus par une reproduction tardive, à des températures non optimales, résultent en une diminution de l'énergie allouée à d'autres fonctions tels que la croissance et le développement. La diminution subséquente de la taille des populations chez les espèces telle que le Queue à tache noire, en fin de chaîne trophique, pourrait entraîner des effets néfastes applicables à tout l'écosystème. Des diminutions dans la taille des populations de certaines espèces de ménés dont le méné laiton et le méné d'herbe ont été relatées au cours des dernières années au Québec et associées à des rejets d'origines agricoles ainsi qu'à l'intensification de l'urbanisation (Henri Fournier, FAPAQ, communication personnelle). Le caractère oestrogénique des rejets agricoles et urbains

ainsi que les effets démontrés dans la présente étude permettent de croire à une cause oestrogénique.

Ensuite, une corrélation négative peut être établie entre le ralentissement de la progression de la spermatogenèse et les hauts niveaux d'intersexualité observés dans les sites caractérisés par une induction de la vitellogénine hépatique. En conséquence, malgré qu'il soit ardu d'établir une relation de cause à effet dans une étude effectuée dans un environnement naturel, l'association entre le ralentissement de la progression de la spermatogenèse, l'incidence d'intersex et les hauts niveaux hépatiques de vitellogénine suggèrent fortement que les effets observés originent tous d'une cause commune : une contamination oestrogénique.

La seconde partie de cette étude a été consacrée à la détermination des niveaux de contamination ainsi que des effets associés à celle-ci dans la rivière des Outaouais, un tributaire majeur du fleuve St-Laurent dans la région de Montréal. La quantification de la vitellogénine hépatique chez les Queues à tache noire immatures démontre qu'il existe une contamination en composés oestrogéniques dans la rivière des Outaouais et ce, en amont et en aval des villes de Gatineau/Ottawa. De plus, les analyses histologiques effectuées sur les gonades mâles indiquent une importante incidence d'intersex corrélée aux niveaux hépatiques de vitellogénine. Fait intéressant, l'intersex observé dans la rivière des Outaouais est caractérisé par la présence, dans les testicules, d'ovocytes en phase d'atrésie folliculaire. Ces résultats démontrent que la contamination oestrogénique observée dans le fleuve St-Laurent ne représente pas un phénomène isolé mais très étendu et que les effets oestrogéniques observés en amont de la décharge municipale de la CUM pourraient en partie provenir de la rivière des Outaouais. Par ailleurs, la capture de spécimens à l'automne, c'est-à-dire après la période de la reproduction chez le Queue à tache noire permet de conclure à des effets physiologiques persistents au niveau du système reproducteur mâle.

Par ailleurs, dans cette étude, les ovocytes des testicules démontrant de l'intersex sont différents de ceux relatés dans la littérature et dans le fleuve St-Laurent. Ce phénomène

d'atrésie folliculaire est un processus de dégénérescence cellulaire et a préalablement été observé chez des femelles exposées aux effluents provenant de l'industrie du papier (Janz *et al.*, 1997). L'étude de Andersen *et al.*, (2003) démontre de l'intersex caractérisé par ce même phénomène chez des poissons zèbres et ce, seulement pour une exposition au 17β -oestradiol au cours d'une période spécifique et précoce du développement testiculaire. Conséquemment, même dans l'éventualité que ce phénomène soit dû à la période d'échantillonnage automnale, l'absence de ce phénomène dans le site témoin ainsi que l'importante induction de vitellogénine dans les sites démontrant de l'intersex suggèrent que ces effets originent d'une exposition aux xénoestrogènes.

La haute incidence d'intersex retrouvée chez les Queues à tache noire capturés dans des sites contaminés par des xénoestrogènes suggère la présence potentielle d'inversion sexuelle complète. Ainsi, au cours de la troisième partie de cette étude, un marqueur du chromosome Y de cette espèce devait être identifié afin de permettre la vérification de l'incidence d'inversion sexuelle chez les Queues à tache noire. Premièrement, la spécificité au sexe mâle de deux gènes (SRY et ZFY) situés sur le chromosome Y des mammifères et importants déterminants de la présence des testicules a été investiguée chez le Queue à tache noire. Cependant, aucun de ces gènes ne démontre une spécificité au sexe génétique mâle chez le Queue à tache noire. Ces résultats suggèrent la présence d'autres gènes responsables de la différenciation des testicules chez le Queue à tache noire ainsi que la divergence évolutionnelle potentielle de celui-ci avant la survenue du pouvoir déterminant des gènes SRY et ZFY dans la différenciation du sexe mâle. Par ailleurs, la technique des AFLPs a permis l'identification de 5 marqueurs du chromosome Y du Queue à tache noire. Afin de vérifier l'incidence d'inversion sexuelle dans le fleuve St-Laurent, ces marqueurs devaient être employés comme sonde lors de Southern Blot contre l'ADN génomique des femelles. Par contre, dû à des problèmes de détection ou d'efficacité de digestion par les endonucléases, cette technique ne semble pas optimale pour cette utilisation. La technique des AFLPs sera donc employée directement pour la vérification de l'incidence d'inversion sexuelle et les résultats subséquents seront ajoutés à l'article.

Enfin, l'importance de ces résultats tient au fait que peu d'études se sont penchées sur les effets d'une exposition aux xénoestrogènes pour une période continue comprenant le cycle reproductif complet et ce, dans un environnement naturel. Les avantages retirés d'une étude dans un milieu naturel originent de l'aspect réaliste de l'exposition ainsi que des effets observés. En effet, malgré que des études traitent de l'effet d'une exposition temporaire à une période distincte du développement à un composé xénoestrogène spécifique, peu de données sont disponibles quant à une exposition environnementale. Conséquemment, cette étude démontre avec efficacité que la présence de faibles concentrations de composés biologiquement actifs dans un environnement naturel est en mesure d'altérer le système reproducteur mâle des espèces exposées. Cette étude implique donc que les recherches subséquentes sur les modulateurs endocriniens doivent prendre en compte les effets d'un mélange de composés, de la bioaccumulation des substances dans la nourriture, de la présence de microorganismes possédant le pouvoir de transformer un composé inactif en une substance active ainsi que la longue période d'exposition couvrant la vie entière de l'animal.

Pour conclure, ces résultats sont les premiers à démontrer la présence et l'étendue de la contamination en xénoestrogènes dans le fleuve St-Laurent et la rivière des Outaouais. Les conséquences associées à cette contamination révèlent que celle-ci est suffisamment importante pour altérer la fonction reproductrice mâle du Queue à tache noire et éventuellement de provoquer des effets au niveau de la population. Évidemment, cette contamination oestrogénique affecte présentement non seulement les poissons mais les populations entières d'espèces aquatiques et riveraines. Ces études sur une espèce sentinelle du milieu aquatique ne sont pas sans rappeler la diminution de la concentration en spermatozoïdes chez l'humain (Swan, Elkin et Fenster, 1997) aux cours des cinquante dernières années. Bien qu'il n'existe pas de preuve directe du lien entre les xénoestrogènes et la santé reproductrice humaine, les résultats de cette étude suggèrent que l'exposition à ces composés, au cours de la vie entière, cause des effets néfastes sur le système reproducteur mâle.

RÉFÉRENCES

- AKINGBEMI, B. T., R. S. Ge, G. R. Klinefelter, G. L. Gunsalus, and M. P. Hardy. 2000. «A Metabolite of Methoxychlor, 2,2-Bis(p-Hydroxyphenyl)-1,1, 1-Trichloroethane, Reduces Testosterone Biosynthesis in Rat Leydig Cells Through Suppression of Steady-State Messenger Ribonucleic Acid Levels of the Cholesterol Side-Chain Cleavage Enzyme». Biol Reprod, vol. 62, no. 3, p. 571-8.
- AMANO, M., S. Hyodo, A. Urano, N. Okumoto, S. Kitamura, K. Ikuta, Y. Suzuki, and K. Aida. 1994. «Activation of Salmon Gonadotropin-Releasing Hormone Synthesis by 17 Alpha-Methyltestosterone Administration in Yearling Masu Salmon, *Oncorhynchus Masou*». Gen Comp Endocrinol, vol. 95, no. 3, p. 374-80.
- AMER, M. A., T. Miura, C. Miura, and K. Yamauchi. 2001. «Involvement of Sex Steroid Hormones in the Early Stages of Spermatogenesis in Japanese Huchen (*Hucho Perryi*)». Biol Reprod, vol. 65, no. 4, p. 1057-66.
- ANBALAGAN, J., P. Kanagaraj, N. Srinivasan, M. M. Aruldas, and J. Arunakaran. 2003. «Effect of Polychlorinated Biphenyl, Aroclor 1254 on Rat Epididymis». Indian J Med Res, vol. 118, p. 236-42.
- ANDERSEN, H. R., A. M. Vinggaard, T. H. Rasmussen, I. M. Gjermansen, and E. C. Bonefeld-Jorgensen. 2002. «Effects of Currently Used Pesticides in Assays for Estrogenicity, Androgenicity, and Aromatase Activity in Vitro». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 179, no. 1, p. 1-12.
- ANDERSEN, L., H. Holbech, A. Gessbo, L. Norrgren, and G. I. Petersen. 2003. «Effects of Exposure to 17alpha-Ethinylestradiol During Early Development on Sexual Differentiation and Induction of Vitellogenin in Zebrafish (*Danio Rerio*)». Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, vol. 134, no. 3, p. 365-74.
- ANDERSON, H. A., C. Falk, L. Hanrahan, J. Olson, V. W. Burse, L. Needham, D. Paschal, D. Patterson Jr, and R. H. Hill Jr. 1998. «Profiles of Great Lakes Critical Pollutants: a Sentinel Analysis of Human Blood and Urine. The Great Lakes Consortium». Environ Health Perspect, vol. 106, no. 5, p. 279-89.
- ARNOLD, D. L., C. A. Moodie, S. M. Charbonneau, H. C. Grice, P. F. McGuire, F. R. Bryce, B. T. Collins, Z. Z. Zawidzka, D. R. Krewski, and E. A. Nera. et al. 1985. «Long-Term Toxicity of Hexachlorobenzene in the Rat and the Effect of Dietary Vitamin A». Food Chem Toxicol, vol. 23, no. 9, p. 779-93.
- ARNOLD, S. F., D. M. Klotz, B. M. Collins, P. M. Vonier, L. J. Guillette Jr, and J. A. McLachlan. 1996. «Synergistic Activation of Estrogen Receptor With Combinations of Environmental Chemicals». Science, vol. 272, no. 5267, p. 1489-92.

- ARNOLD, S. F., P. M. Vonier, B. M. Collins, D. M. Klotz, L. J. Guillette Jr, and J. A. McLachlan. 1997. «In Vitro Synergistic Interaction of Alligator and Human Estrogen Receptors With Combinations of Environmental Chemicals». Environ Health Perspect, vol. 105 Suppl 3, p. 615-8.
- ARONSON, K. J., A. B. Miller, C. G. Woolcott, E. E. Sterns, D. R. McCready, L. A. Lickley, E. B. Fish, G. Y. Hiraki, C. Holloway, T. Ross, W. M. Hanna, S. K. SenGupta, and J. P. Weber. 2000. «Breast Adipose Tissue Concentrations of Polychlorinated Biphenyls and Other Organochlorines and Breast Cancer Risk». Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, vol. 9, no. 1, p. 55-63.
- ARUKWE, A. 2001. «Cellular and Molecular Responses to Endocrine-Modulators and the Impact on Fish Reproduction». Mar Pollut Bull, vol. 42, no. 8, p. 643-55.
- ARUKWE, A. and A. Goksøyr. 2003. «Eggshell and Egg Yolk Proteins in Fish: Hepatic Proteins for the Next Generation: Oogenetic, Population, and Evolutionary Implications of Endocrine Disruption». Comp Hepatol, vol. 2, no. 1, p. 4.
- ARUKWE, A., F. R. Knudsen, and A. Goksoyr. 1997. «Fish Zona Radiata (Eggshell) Protein: a Sensitive Biomarker for Environmental Estrogens». Environ Health Perspect, vol. 105, no. 4, p. 418-22.
- ARUKWE, A., T. Celius, B. T. Walther, and A. Goksoyr. 2000. «Effects of Xenoestrogen Treatment on Zona Radiata Protein and Vitellogenin Expression in Atlantic Salmon (*Salmo Salar*)». Aquatic Toxicol, vol. 49, no. 3, p. 159-70.
- AUGUSTOWSKA, K., E. L. Gregoraszczyk, T. Milewicz, J. Krzysiek, A. Grochowalski, and R. Chrzaszcz. 2003. «Effects of Dioxin (2,3,7,8-TCDD) and PCDDs/PCDFs Congeners Mixture on Steroidogenesis in Human Placenta Tissue Culture». Endocr Regul, vol. 37, no. 1, p. 11-9.
- BAND, P. R., N. D. Le, R. Fang, W. J. Threlfall, and R. P. Gallagher. 1999. «Identification of Occupational Cancer Risks in British Columbia. Part II: A Population-Based Case-Control Study of 1516 Prostatic Cancer Cases». J Occup Environ Med, vol. 41, no. 4, p. 233-47.
- BARDET, P. L., B. Horard, M. Robinson-Rechavi, V. Laudet, and J. M. Vanacker. 2002. «Characterization of Oestrogen Receptors in Zebrafish (*Danio Rerio*)». J Mol Endocrinol, vol. 28, no. 3, p. 153-63.
- BARLOW, S., R. J. Kavlock, J. A. Moore, S. L. Schantz, D. M. Sheehan, D. L. Shuey, and J. M. Lary. 1999. «Teratology Society Public Affairs Committee Position Paper: Developmental Toxicity of Endocrine Disruptors to Humans». Teratology, vol. 60, no. 6, p. 365-75.
- BEARD, A. P. and N. C. Rawlings. 1998. «Reproductive Effects in Mink (*Mustela Vison*) Exposed to the Pesticides Lindane, Carbofuran and Pentachlorophenol in a Multigeneration Study». J Reprod Fertil, vol. 113, no. 1, p. 95-104.

- BERGMAN, A. 1999. «Health Condition of the Baltic Grey Seal (*Halichoerus Grypus*) During Two Decades. Gynaecological Health Improvement but Increased Prevalence of Colonic Ulcers». APMIS, vol. 107, no. 3, p. 270-82.
- BERGMAN, A., and M. Olsson. 1985. «Pathology of Baltic ringed seal and gray females with special reference to adrenocortical hyperplasia: is environmental pollution the cause of a widely distributed disease syndrome?» Finn. Game Res., vol. 44, no. 1, p. 47-62.
- BERGMAN, Å., E. Klasson-Wehler, and H. Kuroki. 1994. «Selective Retention of Hydroxylated PCB Metabolites in Blood.» Environ Health Perspec., vol. 102, p. 464-469.
- BETTIN, C., J. Oehlmann, and E. Stroben. 1996. «TBT Induced Imposex in Marine Neogastropods is Mediated by an Increasing Androgen Level.» Helgoländer Meeresunters., vol. 50, p. 299-317.
- BIGNERT, A., K. Litzén, T.M. Odsjö, W. Persson, and L. Reutergardh. 1995. «Time-Related Factors Influence the Concentration of sDDT, PCBs and Shell Parameters in Eggs of Baltic Guillemot (*Uria aagle*).» Environ Pollut., vol. 89, no. 1-2, p. 27-36.
- BILLARD, R. and M. P. Cosson. 1992. «Some Problems Related to Assessment of Sperm Motility in Freshwater Fish.» J Exp Zool., vol. 261, no. 4, p. 122-131.
- BITMAN, J., H. C. Cecil, and G. F. Fries. 1970. «DDT-Induced Inhibition of Avian Shell Gland Carbonic Anhydrase: a Mechanism for Thin Eggshells». Science, vol. 168, no. 931, p. 594-6.
- BJERSELIUS, R., K. Lundstedt-Enkel, H. Olsen, I. Mayer, and K. Dimberg. 2001. «Male Goldfish Reproductive Behaviour and Physiology Are Severely Affected by Exogenous Exposure to 17beta-Estradiol». Aquat Toxicol., vol. 53, no. 2, p. 139-52.
- BLOMKVIST, G., A. Ross, S. Jensen, A. Bignert, and M. Olsson. 1992. «Concentration of SDDR and PCB in Seals from Swedish and Scottish Waters.» Ambio., vol. 21, p. 539-545.
- BOUMA, J. and J. J. Nagler. 2001. «Estrogen Receptor-Alpha Protein Localization in the Testis of the Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) During Different Stages of the Reproductive Cycle». Biol Reprod., vol. 65, no. 1, p. 60-5.
- BRAUN, A. M. and P. Thomas. 2003. «Androgens Inhibit Estradiol-17beta Synthesis in Atlantic Croaker (*Micropogonias Undulatus*) Ovaries by a Nongenomic Mechanism Initiated at the Cell Surface». Biol Reprod., vol. 69, no. 5, p. 1642-50.
- BRAUN, A.M. and P.Thomas. 2004. «Biochemical Characterization of a Membrane Androgen Receptor in the Ovary of the Atlantic Croaker (*Micropogonias Undulatus*)». Biol Reprod., vol. 71, no. 1, p. 146-55.

- BROMWICH, P., J. Cohen, I. Stewart, and A. Walker. 1994. «Decline in Sperm Counts: an Artefact of Changed Reference Range of "Normal"?». BMJ, vol. 309, no. 6946, p. 19-22.
- BROUWER, A., P.J.H. Reijnders, and J. H. Koeman. 1989. «Polychlorinated Biphenyl (PCB) Contaminated Fish Induces Vitamin A and Thyroid Hormone Deficiency in the Common Seal *Phoca Vitulina*.» Aquat Toxicol. vol. 15, no. 1, p. 99-106.
- BRYAN, G.W., P.E. Gibbs, and G.R. Burt. 1988. «A Comparison of the Effectiveness of Tri-n-butyltin Chloride and Five Other Organotin Compounds in Promoting the Development of Imposex in the Dog-Whelk, *Nucella Lapillus*.» J Mar Biol Assoc UK, vol. 68, p. 733-744.
- BULGER, W. H., R. M. Muccitelli, and D. Kupfer. 1978. «Interactions of Methoxychlor, Methoxychlor Base-Soluble Contaminant, and 2,2-Bis(p-Hydroxyphenyl)-1,1,1-Trichloroethane With Rat Uterine Estrogen Receptor». J Toxicol Environ Health, vol. 4, no. 5-6, p. 881-93.
- CAPPELLETTI, V., G. Saturno, P. Miodini, W. Korner, and M. G. Daidone. 2003. «Selective Modulation of ER-Beta by Estradiol and Xenoestrogens in Human Breast Cancer Cell Lines». Cell Mol Life Sci, vol. 60, no. 3, p. 567-76.
- CARLSEN, E., A. Giwercman, N. Keiding, and N. E. Skakkebaek. 1992. «Evidence for Decreasing Quality of Semen During Past 50 Years». BMJ, vol. 305, no. 6854, p. 609-13.
- CARNEVALI, O., F. Centonze, S. Brooks, I. Marota, and J. P. Sumpter. 1999. «Molecular Cloning and Expression of Ovarian Cathepsin D in Seabream, *Sparus Aurata*.» Biol Reprod, vol. 61, no. 3, p. 785-91.
- CARVER, L. A. and C. A. Bradfield. 1997. «Ligand-Dependent Interaction of the Aryl Hydrocarbon Receptor With a Novel Immunophilin Homolog in Vivo». J Biol Chem, vol. 272, no. 17, p. 11452-6.
- CASSIDY, R. A., C. V. Vorhees, D. J. Minnema, and L. Hastings. 1994. «The Effects of Chlordane Exposure During Pre- and Postnatal Periods at Environmentally Relevant Levels on Sex Steroid-Mediated Behaviors and Functions in the Rat». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 126, no. 2, p. 326-37.
- CASTRO, V. L., M. M. Bernardi, and J. Palermo-Neto. 1992. «Evaluation of Prenatal Aldrin Intoxication in Rats». Arch Toxicol, vol. 66, no. 2, p. 149-52.
- CENTRE SAINT-LAURENT. 1996. Rapport-synthèse sur l'état du Saint-Laurent. Volume 1: L'écosystème du Saint-Laurent. Environnement Canada-Région du Québec, Conservation de l'environnement. Montréal. Éditions MultiMondes.
- CHADWICK, R. W., R. L. Cooper, J. Chang, G. L. Rehnberg, and W. K. McElroy. 1988. «Possible Antiestrogenic Activity of Lindane in Female Rats». J Biochem Toxicol, vol. 3, no. 2, p. 147-58.

- CHANG, X., T. Kobayashi, T. Todo, M. Yoshiura, H. Kajiura-Kobayashi, C. Morrey, and Y. Nagahama. 1999. «Molecular Cloning of Estrogens Receptors a et b in the Ovary of a Teleost Fish, the Tilapia (*Oreochromis niloticus*).» Zool Sci., vol. 16, no. 4, p. 653-658.
- CHARLES, J. M., H. C. Cunny, R. D. Wilson, and J. S. Bus. 1996. «Comparative Subchronic Studies on 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid, Amine, and Ester in Rats». Fundam Appl Toxicol, vol. 33, no. 2, p. 161-5.
- CHRISTIANSEN, T., B. Korsgaard, and A. Jespersen. 1998. «Effects of Nonylphenol and 17 Beta-Oestradiol on Vitellogenin Synthesis, Testicular Structure and Cytology in Male Eelpout *Zoarces Viviparus*». J Exp Biol, vol. 201 (Pt 2), p. 179-92.
- CHRISTIANSEN, T., K. Kinnberg, P. Bjerregaard, and B. Korsgaard. 2000. «Gamma-Glutamyl Transpeptidase As a Possible Marker of Sertoli Cells in Fish Testes for Studies of Xenoestrogens». Mar Environ Res, vol. 50, no. 1-5, p. 213-6.
- CHRISTIN, M. S., L. Menard, A. D. Gendron, S. Ruby, D. Cyr, D. J. Marcogliese, L. Rollins-Smith, and M. Fournier. 2004. «Effects of Agricultural Pesticides on the Immune System of *Xenopus Laevis* and *Rana Pipiens*». Aquat Toxicol, vol. 67, no. 1, p. 33-43.
- CLARKE, D. J., S. G. George, and B. Burchell. 1992. «Multiplicity of UDP-Glucuronosyltransferases in Fish. Purification and Characterization of a Phenol UDP-Glucuronosyltransferase From the Liver of a Marine Teleost, *Pleuronectes Platessa*». Biochem J, vol. 284 (Pt 2), p. 417-23.
- COCCO, P. 2002. «On the Rumors About the Silent Spring. Review of the Scientific Evidence Linking Occupational and Environmental Pesticide Exposure to Endocrine Disruption Health Effects». Cad Saude Publica, vol. 18, no. 2, p. 379-402.
- COLBORN, T., F. S. vom Saal, and A. M. Soto. 1993. «Developmental Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals in Wildlife and Humans». Environ Health Perspect, vol. 101, no. 5, p. 378-84.
- COLDHAM, N. G., S. Sivapathasundaram, M. Dave, L. A. Ashfield, T. G. Pottinger, C. Goodall, and M. J. Sauer. 1998. «Biotransformation, Tissue Distribution, and Persistence of 4-Nonylphenol Residues in Juvenile Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*)». Drug Metab Dispos, vol. 26, no. 4, p. 347-54.
- COLEMAN, K. M. and C. L. Smith. 2001. «Intracellular Signaling Pathways: Nongenomic Actions of Estrogens and Ligand-Independent Activation of Estrogen Receptors». Front Biosci, vol. 6, p. 1379-91.
- COOK, J. C., L. S. Mullin, S. R. Frame, and L. B. Biegel. 1993. «Investigation of a Mechanism for Leydig Cell Tumorigenesis by Linuron in Rats». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 119, no. 2, p. 195-204.

- COSTLOW, R. D., J. M. Hirsekorn, R. G. Stiratelli, G. P. O'Hara, D. L. Black, W. W. Kane, S. S. Burke, J. M. Smith, and A. W. Hayes. 1983. «The Effects on Rat Pups When Nitrofen (4-(2,4-Dichlorophenoxy)Nitrobenzene) Was Applied Dermal to the Dam During Organogenesis». Toxicology, vol. 28, no. 1-2, p. 37-50.
- COUMAILLEAU, P., L. Poellinger, J. A. Gustafsson, and M. L. Whitelaw. 1995. «Definition of a Minimal Domain of the Dioxin Receptor That Is Associated With Hsp90 and Maintains Wild Type Ligand Binding Affinity and Specificity». J Biol Chem, vol. 270, no. 42, p. 25291-300.
- COUSE, J. F. and K. S. Korach. 1999. «Reproductive Phenotypes in the Estrogen Receptor-Alpha Knockout Mouse». Ann Endocrinol (Paris), vol. 60, no. 2, p. 143-8.
- CRAIN, D. A.; L. J. Jr Guillette, A. A. Rooney, D. B. and Pickford. 1997. «Alterations in Steroidogenesis in Alligators (*Alligator mississippiensis*) Exposed Naturally and Experimentally to Environmental Contaminants.» Environ Health Perspect, vol. 105, no. 5, p. 528-33.
- CRAIN, D. A., N. Noriega, P. M. Vonier, S. F. Arnold, J. A. McLachlan, and L. J. Guillette Jr. 1998. «Cellular Bioavailability of Natural Hormones and Environmental Contaminants As a Function of Serum and Cytosolic Binding Factors». Toxicol Ind Health, vol. 14, no. 1-2, p. 261-73.
- CRISP, T. M., E. D. Clegg, R. L. Cooper, W. P. Wood, D. G. Anderson, K. P. Baetcke, J. L. Hoffmann, M. S. Morrow, D. J. Rodier, J. E. Schaeffer, L. W. Touart, M. G. Zeeman, and Y. M. Patel. 1998. «Environmental Endocrine Disruption: an Effects Assessment and Analysis». Environ Health Perspect, vol. 106 Suppl 1, p. 11-56.
- CYR, D. G. and J. G. Eales. 1988. «In Vitro Effects of Thyroid Hormones on Gonadotropin-Induced Estradiol-17 Beta Secretion by Ovarian Follicles of Rainbow Trout, *Salmo Gairdneri*». Gen Comp Endocrinol, vol. 69, no. 1, p. 80-7.
- CYR, D. G., N. R. Bromage, J. Duston, and J. G. Eales. 1988. «Seasonal Patterns in Serum Levels of Thyroid Hormones and Sex Steroids in Relation to Photoperiod-Induced Changes in Spawning Time in Rainbow Trout, *Salmo Gairdneri*». Gen Comp Endocrinol, vol. 69, no. 2, p. 217-25.
- CYR, D.G., and J. G. Eales. 1996. «Interrelationships Between Thyroidal and Endocrine Reproductive Systems in Fish.» Rev Fish Biol Fish, vol. 6, p. 165-200.
- DAGENAIS, G., P. Boulay, and J. Boulay. 1999. Treatment Process : Wastewater Treatment Plant. Communauté Urbaine de Montréal.
- DANZO, B. J. 1997. «Environmental Xenobiotics May Disrupt Normal Endocrine Function by Interfering With the Binding of Physiological Ligands to Steroid Receptors and Binding Proteins». Environ Health Perspect, vol. 105, no. 3, p. 294-301.

- DANZO, B. J. 1998. «The Effects of Environmental Hormones on Reproduction». Cell Mol Life Sci, vol. 54, no. 11, p. 1249-64.
- DAS, S. and P. Thomas. 1999. «Pesticides Interfere With the Nongenomic Action of a Progestogen on Meiotic Maturation by Binding to Its Plasma Membrane Receptor on Fish Oocytes». Endocrinology, vol. 140, no. 4, p. 1953-6.
- DASTON, G. P., J. C. Cook, and R. J. Kavlock. 2003. «Uncertainties for Endocrine Disrupters: Our View on Progress». Toxicol Sci, vol. 74, no. 2, p. 245-52.
- DAVAIL, B., F. Pakdel, H. Bujo, L. M. Perazzolo, M. Waclawek, W. J. Schneider, and F. Le Menn. 1998. «Evolution of Oogenesis: the Receptor for Vitellogenin From the Rainbow Trout». J Lipid Res, vol. 39, no. 10, p. 1929-37.
- DECHAUD, H., C. Ravard, F. Claustrat, A. B. de la Perriere, and M. Pugeat. 1999. «Xenoestrogen Interaction With Human Sex Hormone-Binding Globulin (HSHBG)». Steroids, vol. 64, no. 5, p. 328-34.
- DEMERS, A., P. Ayotte, J. Brisson, S. Dodin, J. Robert, and E. Dewailly. 2000. «Risk and Aggressiveness of Breast Cancer in Relation to Plasma Organochlorine Concentrations». Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, vol. 9, no. 2, p. 161-6.
- DESBROW, C., E. Routledge, G.C. Brighty, J.P. Sumpter, and M. Waldock. 1998. «Identification of Estrogenic Chemicals in STW Effluents. I. Chemical Fraction and In Vitro Biological Screening.» Environ Sci Technol, vol. 32, no. 11, p. 1549-1558.
- DICKEY, J. T. and P. Swanson. 1998. «Effects of Sex Steroids on Gonadotropin (FSH and LH) Regulation in Coho Salmon (*Oncorhynchus Kisutch*)». J Mol Endocrinol, vol. 21, no. 3, p. 291-306.
- DOLL, R. and R. Peto. 1981. «The Causes of Cancer: Quantitative Estimates of Avoidable Risks of Cancer in the United States Today». J Natl Cancer Inst, vol. 66, no. 6, p. 1191-308.
- FABER, R. A. and J. J. Hickey. 1973. «Eggshell Thinning, Chlorinated Hydrocarbons, and Mercury in Inland Aquatic Bird Eggs, 1969 and 1970». Pestic Monit J, vol. 7, no. 1, p. 27-36.
- FARROW, S. 1994. «Falling Sperm Quality: Fact or Fiction?». BMJ, vol. 309, no. 6946, p. 1-2.
- FAWELL, S. E., J. A. Lees, R. White, and M. G. Parker. 1990. «Characterization and Colocalization of Steroid Binding and Dimerization Activities in the Mouse Estrogen Receptor». Cell, vol. 60, no. 6, p. 953-62.
- FLOURIOT, G., F. Pakdel, B. Ducouret, Y. Ledrean, and Y. Valotaire. 1997. «Differential Regulation of Two Genes Implicated in Fish Reproduction: Vitellogenin and Estrogen Receptor Genes». Mol Reprod Dev, vol. 48, no. 3, p. 317-23.

- FOLMAR, L. C., N. D. Denslow, V. Rao, M. Chow, D. A. Crain, J. Enblom, J. Marcino, and L. J. Guillette Jr. 1996. «Vitellogenin Induction and Reduced Serum Testosterone Concentrations in Feral Male Carp (*Cyprinus Carpio*) Captured Near a Major Metropolitan Sewage Treatment Plant». Environ Health Perspect, vol. 104, no. 10, p. 1096-101.
- FOSTER, W. G., A. McMahon, D. C. Villeneuve, and J. F. Jarrell. 1992. «Hexachlorobenzene (HCB) Suppresses Circulating Progesterone Concentrations During the Luteal Phase in the Cynomolgus Monkey». J Appl Toxicol, vol. 12, no. 1, p. 13-7.
- FOX, J. E., M. Starcevic, K. Y. Kow, M. E. Burow, and J. A. McLachlan. 2001. «Nitrogen Fixation. Endocrine Disrupters and Flavonoid Signalling». Nature, vol. 413, no. 6852, p. 128-9.
- FRANÇOIS, E., D. Y. Wang, R. Fulthorpe, S. N. Liss, and E. A. Edwards. 2003. «DNA Microarrays for Detecting Endocrine-Disrupting Compounds». Biotechnol Adv, vol. 22, no. 1-2, p. 17-26.
- FRY, D. M. and C. K. Toone. 1981. «DDT-Induced Feminization of Gull Embryos». Science, vol. 213, no. 4510, p. 922-4.
- FRY, D.M. 1995. «Reproductive effects in birds exposed to pesticides and industrial chemicals.» Environ. Health Perspect., vol. 103 (suppl. 7), p. 165-171.
- GAGNON, C. and I. Saulnier. 2003. «Distribution and Fate of Metals in the Dispersion Plume of a Major Municipal Effluent». Environ Pollut, vol. 124, no. 1, p. 47-55.
- GALE, W. L., R. Patino, and A. G. Maule. 2004. «Interaction of Xenobiotics With Estrogen Receptors Alpha and Beta and a Putative Plasma Sex Hormone-Binding Globulin From Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*)». Gen Comp Endocrinol, vol. 136, no. 3, p. 338-45.
- GARCIA-MORALES, P., M. Saceda, N. Kenney, N. Kim, D. S. Salomon, M. M. Gottardis, H. B. Solomon, P. F. Sholler, V. C. Jordan, and M. B. Martin. 1994. «Effect of Cadmium on Estrogen Receptor Levels and Estrogen-Induced Responses in Human Breast Cancer Cells». J Biol Chem, vol. 269, no. 24, p. 16896-901.
- GELINAS, D. and G. V. Callard. 1997. «Immunolocalization of Aromatase- and Androgen Receptor-Positive Neurons in the Goldfish Brain». Gen Comp Endocrinol, vol. 106, no. 2, p. 155-68.
- GERCKEN, J. and H. Sordyl. 2002. «Intersex in Feral Marine and Freshwater Fish From Northeastern Germany». Mar Environ Res, vol. 54, no. 3-5, p. 651-5.
- GIAVINI, E., C. Vismara, and M. L. Broccia. 1983. «Pre- and Postimplantation Embryotoxic Effects of Zinc Dimethyldithiocarbamate (Ziram) in the Rat». Ecotoxicol Environ Saf, vol. 7, no. 6, p. 531-7.

- GILL, W. B., G. F. Schumacher, M. Bibbo, F. H. Straus 2nd, and H. W. Schoenberg. 1979. «Association of Diethylstilbestrol Exposure in Utero With Cryptorchidism, Testicular Hypoplasia and Semen Abnormalities». J Urol, vol. 122, no. 1, p. 36-9.
- GIMENO, S., A. Gerritsen, T. Bowmer, and H. Komen. 1996. «Feminization of Male Carp». Nature, vol. 384, no. 6606, p. 221-2.
- GIMENO, S., H. Komen, S. Jobling, J.P. Sumpter, and T. Bowmer. 1998. «Demasculinisation of Sexually Mature Male Common Carp, *Cyprinus Carpio*, Exposed to 4-Tert-Pentylphenol During Spermatogenesis.» Aquat Toxicol, vol. 43, no. 2-3, p. 93-109.
- GIROUX, I. 2002. Contamination de l'eau par les pesticides dans les régions de culture de maïs et de soya au Québec. Direction du suivi de l'état de l'environnement. Ministère de l'Environnement.
- GORZINSKI, S. J., R. J. Kociba, R. A. Campbell, F. A. Smith, R. J. Nolan, and D. L. Eisenbrandt. 1987. «Acute, Pharmacokinetic, and Subchronic Toxicological Studies of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid». Fundam Appl Toxicol, vol. 9, no. 3, p. 423-35.
- GOVOROUN, M., O. M. McMeel, H. Mecherouki, T. J. Smith, and Y. Guiguen. 2001. «17beta-Estradiol Treatment Decreases Steroidogenic Enzyme Messenger Ribonucleic Acid Levels in the Rainbow Trout Testis». Endocrinology, vol. 142, no. 5, p. 1841-8.
- GRAHAM, J. D., D. L. Bain, J. K. Richer, T. A. Jackson, L. Tung, and K. B. Horwitz. 2000. «Nuclear Receptor Conformation, Coregulators, and Tamoxifen-Resistant Breast Cancer». Steroids, vol. 65, no. 10-11, p. 579-84.
- GRAY, L. E. Jr and W. R. Kelce. 1996. «Latent Effects of Pesticides and Toxic Substances on Sexual Differentiation of Rodents». Toxicol Ind Health, vol. 12, no. 3-4, p. 515-31.
- GRAY, L. E. Jr, J. Ostby, E. Monosson, and W. R. Kelce. 1999. «Environmental Antiandrogens: Low Doses of the Fungicide Vinclozolin Alter Sexual Differentiation of the Male Rat». Toxicol Ind Health, vol. 15, no. 1-2, p. 48-64.
- GRAY, L. E. Jr, J. Ostby, J. Ferrell, G. Rehnberg, R. Linder, R. Cooper, J. Goldman, V. Slott, and J. Laskey. 1989. «A Dose-Response Analysis of Methoxychlor-Induced Alterations of Reproductive Development and Function in the Rat». Fundam Appl Toxicol, vol. 12, no. 1, p. 92-108.
- GRAY, L. E. Jr, J. S. Ostby, and W. R. Kelce. 1994. «Developmental Effects of an Environmental Antiandrogen: the Fungicide Vinclozolin Alters Sex Differentiation of the Male Rat». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 129, no. 1, p. 46-52.
- GRAY, M.A. and C. D. Metcalfe. 1997. «Induction of Testis-Ova in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to p-Nonylphenol.» Environ Toxicol Chem, vol. 16, no. 5, p. 1082-1086.

- GRAY, M.A., K.L. Teather, and C. D. Metcalfe. 1999. «Reproductive Success and Behavior of Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) Exposed to 4-Tert-Octylphenol.» Environ Toxicol Chem, vol. 18, no. 11, p. 2587-2594.
- GRONEN, S., N. Denslow, S. Manning, S. Barnes, D. Barnes, and M. Brouwer. 1999. «Serum Vitellogenin Levels and Reproductive Impairment of Male Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) Exposed to 4-Tert-Octylphenol». Environ Health Perspect, vol. 107, no. 5, p. 385-90.
- GUILLETTE, L. J. Jr, A. R. Woodward, D. A. Crain, D. B. Pickford, A. A. Rooney, and H. F. Percival. 1999. «Plasma Steroid Concentrations and Male Phallus Size in Juvenile Alligators From Seven Florida Lakes». Gen Comp Endocrinol, vol. 116, no. 3, p. 356-72.
- GUILLETTE, L. J. Jr, D. B. Pickford, D. A. Crain, A. A. Rooney, and H. F. Percival. 1996. «Reduction in Penis Size and Plasma Testosterone Concentrations in Juvenile Alligators Living in a Contaminated Environment». Gen Comp Endocrinol, vol. 101, no. 1, p. 32-42.
- GUILLETTE, L. J. Jr, P. M. Vonier, and J. A. McLachlan. 2002. «Affinity of the Alligator Estrogen Receptor for Serum Pesticide Contaminants». Toxicology, vol. 181-182, p. 151-4.
- GUILLETTE, L. J. Jr, T. S. Gross, G. R. Masson, J. M. Matter, H. F. Percival, and A. R. Woodward. 1994. «Developmental Abnormalities of the Gonad and Abnormal Sex Hormone Concentrations in Juvenile Alligators From Contaminated and Control Lakes in Florida». Environ Health Perspect, vol. 102, no. 8, p. 680-8.
- GUNDERSON, M. P., G. A. LeBlanc, and L. J. Guillette Jr. 2001. «Alterations in Sexually Dimorphic Biotransformation of Testosterone in Juvenile American Alligators (*Alligator Mississippiensis*) From Contaminated Lakes». Environ Health Perspect, vol. 109, no. 12, p. 1257-64.
- HADLEY, M.E. 1996. Endocrinology. (4th edition) Prentice-Hall. Upper Saddle River. New Jersey.
- HALM, S., N. Pounds, S. Maddix, M. Rand-Weaver, J. P. Sumpter, T. H. Hutchinson, and C. R. Tyler. 2002. «Exposure to Exogenous 17beta-Oestradiol Disrupts P450aromB mRNA Expression in the Brain and Gonad of Adult Fathead Minnows (*Pimephales Promelas*)». Aquat Toxicol, vol. 60, no. 3-4, p. 285-99.
- HAMMOND, B., B. S. Katzenellenbogen, N. Krauthammer, and J. McConnell. 1979. «Estrogenic Activity of the Insecticide Chlordecone (Kepone) and Interaction With Uterine Estrogen Receptors». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 76, no. 12, p. 6641-5.
- HAMMOND, G. L. and W. P. Bocchinfuso. 1995. «Sex Hormone-Binding Globulin/Androgen-Binding Protein: Steroid-Binding and Dimerization Domains». J Steroid Biochem Mol Biol, vol. 53, no. 1-6, p. 543-52.

- HARAGUCHI, K., M. Athanasiadou, A. Bergman, L. Hovander, and S. Jensen. 1992. «PCB and PCB Methylsulfones in Selected Groups of Seals from Swedish Waters.» Ambio, vol. 21, p. 549-549.
- HARAZONO, A., M. Ema, and Y. Ogawa. 1996. «Pre-Implantation Embryonic Loss Induced by Tributyltin Chloride in Rats». Toxicol Lett, vol. 89, no. 3, p. 185-90.
- HARRIES, J.E., D.A. Sheahan, S. Jobling, P. Matthiessen, P. Neall, J.P. Sumpter, T. Taylor, and N. Zaman. 1997. «Estrogenic Activity in Five U.K. Rivers Detected by Measurement of Vitellogenesis in Caged Male Trout.» Environ Toxicol Chem, vol. 16, no. 3, p. 534-542.
- HARRIS, C. A., E. M. Santos, A. Janbakhsh, T. G. Pottinger, C. R. Tyler, and J. P. Sumpter. 2001. «Nonylphenol Affects Gonadotropin Levels in the Pituitary Gland and Plasma of Female Rainbow Trout». Environ Sci Technol, vol. 35, no. 14, p. 2909-16.
- HARRIS, M.L., Van den Heuvel, M.R., Rouse, J., Martin, P.A., Struger, J., Bishop, C.A. and P. Takacs. 2000a. Pesticides in Ontario : A critical Assessment of Potential Toxicity of Agricultural Product to Wildlife, With Consideration For Endocrine Disruption. Canadian Wildlife Service, Environmental Conservation Branch, Ontario.
- HARRIS, R. M., R. H. Waring, C. J. Kirk, and P. J. Hughes. 2000b. «Sulfation of "Estrogenic" Alkylphenols and 17beta-Estradiol by Human Platelet Phenol Sulfotransferases». J Biol Chem, vol. 275, no. 1, p. 159-66.
- HARSHBARGER, J. C., M. J. Coffey, and M. Y. Young. 2000. «Intersexes in Mississippi River Shovelnose Sturgeon Sampled Below Saint Louis, Missouri, USA». Mar Environ Res, vol. 50, no. 1-5, p. 247-50.
- HASHIMOTO, S., H. Bessho, A. Hara, M. Nakamura, T. Iguchi, and K. Fujita. 2000. «Elevated Serum Vitellogenin Levels and Gonadal Abnormalities in Wild Male Flounder (Pleuronectes Yokohamae) From Tokyo Bay, Japan». Mar Environ Res, vol. 49, no. 1, p. 37-53.
- HASSANIN, A., S. Kuwahara, Nurhidayat, Y. Tsukamoto, K. Ogawa, K. Hiramatsu, and F. Sasaki. 2002. «Gonadosomatic Index and Testis Morphology of Common Carp (Cyprinus Carpio) in Rivers Contaminated With Estrogenic Chemicals». J Vet Med Sci, vol. 64, no. 10, p. 921-6.
- HASSIN, S., Y. Gothilf, O. Blaise, and Y. Zohar. 1998. «Gonadotropin-I and -II Subunit Gene Expression of Male Striped Bass (Morone Saxatilis) After Gonadotropin-Releasing Hormone Analogue Injection: Quantitation Using an Optimized Ribonuclease Protection Assay». Biol Reprod, vol. 58, no. 5, p. 1233-40.
- HAUBRUGE, E., F. Petit, and M. J. Gage. 2000. «Reduced Sperm Counts in Guppies (Poecilia Reticulata) Following Exposure to Low Levels of Tributyltin and Bisphenol A». Proc R Soc Lond B Biol Sci, vol. 267, no. 1459, p. 2333-7.

- HAWKINS, M. B., J. W. Thornton, D. Crews, J. K. Skipper, A. Dotte, and P. Thomas. 2000. «Identification of a Third Distinct Estrogen Receptor and Reclassification of Estrogen Receptors in Teleosts». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 97, no. 20, p. 10751-6.
- HAYES, A.W. 2001. Principles and Methods of Toxicology. 4th edition. Raven Press, New-York, NY.
- HEINZ, G.H., H.F. Percival, and M. L. Jennings. 1991. «Contaminants in American Alligator Eggs from Lake Apopka, Lake Griffin, and Lake Okeechobee, Florida.» Environ Monitor Assess, vol. 16, no. 1, p. 277-285.
- HEMMER, M. J., C. J. Bowman, B. L. Hemmer, S. D. Friedman, D. Marcovich, K. J. Kroll, and N. D. Denslow. 2002. «Vitellogenin mRNA Regulation and Plasma Clearance in Male Sheepshead Minnows, (*Cyprinodon Variegatus*) After Cessation of Exposure to 17 Beta-Estradiol and P-Nonylphenol». Aquat Toxicol, vol. 58, no. 1-2, p. 99-112.
- HERBST, A. L., H. Ulfelder, and D. C. Poskanzer. 1971. «Adenocarcinoma of the Vagina. Association of Maternal Stilbestrol Therapy With Tumor Appearance in Young Women». N Engl J Med, vol. 284, no. 15, p. 878-81.
- HERMAN, R.L. and H. L. Kincaid. 1988. «Pathological Effects of Orally Administered Estradiol to Rainbow Trout». Aquaculture, vol. 72, no. 1-2, p. 165-172.
- HICKEY, J. J. and D. W. Anderson. 1968. «Chlorinated Hydrocarbons and Eggshell Changes in Raptorial and Fish-Eating Birds». Science, vol. 162, no. 850, p. 271-3.
- HILL, R. L. Jr and D. M. Janz. 2003. «Developmental Estrogenic Exposure in Zebrafish (*Danio Rerio*): I. Effects on Sex Ratio and Breeding Success». Aquat Toxicol, vol. 63, no. 4, p. 417-29.
- HOYER, A. P., P. Grandjean, T. Jorgensen, J. W. Brock, and H. B. Hartvig. 1998. «Organochlorine Exposure and Risk of Breast Cancer». Lancet, vol. 352, no. 9143, p. 1816-20.
- HURLEY, P. M. 1998. «Mode of Carcinogenic Action of Pesticides Inducing Thyroid Follicular Cell Tumors in Rodents». Environ Health Perspect, vol. 106, no. 8, p. 437-45.
- HUTCHINSON, T. H. and P. Matthiessen. 1999. «Endocrine Disruption in Wildlife: Identification and Ecological Relevance». Sci Total Environ, vol. 233, no. 1-3, p. 1-3.
- ISHIHARA, A., N. Nishiyama, S. Sugiyama, and K. Yamauchi. 2003. «The Effect of Endocrine Disrupting Chemicals on Thyroid Hormone Binding to Japanese Quail Transthyretin and Thyroid Hormone Receptor». Gen Comp Endocrinol, vol. 134, no. 1, p. 36-43.

- JANZ, D.M., M.E. McMaster, K.R. Munkittrick, and G. Van der Kraak. 1997. «Elevated Ovarian Follicular Apoptosis and Heat Shock Protein-70 Expression in White Sucker Exposed to Bleached Kraft Pulp Mill Effluent.» Toxicol Appl Pharmacol, vol. 147, no. 2, p. 391-398.
- JARRELL, J., A. Gocmen, W. Foster, R. Brant, S. Chan, and M. Sevcik. 1998. «Evaluation of Reproductive Outcomes in Women Inadvertently Exposed to Hexachlorobenzene in Southeastern Turkey in the 1950s». Reprod Toxicol, vol. 12, no. 4, p. 469-76.
- JENKINS, R.E. and N. M. Burkhead. 1994. Freshwater Fishes of Virginia. American Fisheries Society, Bethesda, M.D.
- JENSSEN, B. M. 1996. «An Overview of Exposure to, and Effects of, Petroleum Oil and Organochlorine Pollution in Grey Seals (*Halichoerus Grypus*)». Sci Total Environ, vol. 186, no. 1-2, p. 109-18.
- JOBLING, S., N. Beresford, M. Nolan, T. Rodgers-Gray, G. C. Brighty, J. P. Sumpter, and C. R. Tyler. 2002a. «Altered Sexual Maturation and Gamete Production in Wild Roach (*Rutilus Rutilus*) Living in Rivers That Receive Treated Sewage Effluents». Biol Reprod, vol. 66, no. 2, p. 272-81.
- JOBLING, S., M. Nolan, C.R. Tyler, G. Brighty, and J. P. Sumpter. 1998. «Widespread Sexual Disruption in Wild Fish.» Environ Sci Technol, vol. 32, no. 17, p. 2498-2506.
- JOBLING, S., S. Coey, J. G. Whitmore, D. E. Kime, K. J. Van Look, B. G. McAllister, N. Beresford, A. C. Henshaw, G. Brighty, C. R. Tyler, and J. P. Sumpter. 2002b. «Wild Intersex Roach (*Rutilus Rutilus*) Have Reduced Fertility». Biol Reprod, vol. 67, no. 2, p. 515-24.
- JOBLING, S., D.A. Sheahan, J.A. Osborne, P. Matthiessen, and J. P. Sumpter. 1996. «Inhibition of Testicular Growth in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to Estrogenic Alkylphenolic Chemicals.» Environ Toxicol Chem, vol. 15, no. 2, p. 194-202.
- JOBLING, S., T. Reynolds, R. White, M. G. Parker, and J. P. Sumpter. 1995. «A Variety of Environmentally Persistent Chemicals, Including Some Phthalate Plasticizers, Are Weakly Estrogenic». Environ Health Perspect, vol. 103, no. 6, p. 582-7.
- JOHANSSON, M., S. Nilsson, and B. O. Lund. 1998. «Interactions Between Methylsulfonyl PCBs and the Glucocorticoid Receptor». Environ Health Perspect, vol. 106, no. 12, p. 769-72.
- JOHN RADCLIFFE HOSPITAL CRYPTORCHIDISM STUDY GROUP. 1992. «Cryptorchidism: a Prospective Study of 7500 Consecutive Male Births, 1984-8.» Arch Dis Child, vol. 67, no. 7, p. 892-899.

- JOHNSON, E., C. Shorter, L. Bestervelt, D. Patterson, L. Needham, W. Piper, G. Lucier, and C. Nolan. 2001. «Serum Hormone Levels in Humans With Low Serum Concentrations of 2,3,7,8-TCDD». Toxicol Ind Health, vol. 17, no. 4, p. 105-12.
- JOSEPH, D. R. 1994. «Structure, Function, and Regulation of Androgen-Binding Protein/Sex Hormone-Binding Globulin». Vitam Horm, vol. 49, p. 197-280.
- KAVANAGH, R. J., G. C. Balch, Y. Kiparissis, A. J. Niimi, J. Sherry, C. Tinson, and C. D. Metcalfe. 2004. «Endocrine Disruption and Altered Gonadal Development in White Perch (*Morone Americana*) From the Lower Great Lakes Region». Environ Health Perspect, vol. 112, no. 8, p. 898-902.
- KELCE, W. R., C. R. Stone, S. C. Laws, L. E. Gray, J. A. Kemppainen, and E. M. Wilson. 1995. «Persistent DDT Metabolite P,p'-DDE Is a Potent Androgen Receptor Antagonist». Nature, vol. 375, no. 6532, p. 581-5.
- KESTER, M. H., S. Bulduk, D. Tibboel, W. Meinh, H. Glatt, C. N. Falany, M. W. Coughtrie, A. Bergman, S. H. Safe, G. G. Kuiper, A. G. Schuur, A. Brouwer, and T. J. Visser. 2000. «Potent Inhibition of Estrogen Sulfotransferase by Hydroxylated PCB Metabolites: a Novel Pathway Explaining the Estrogenic Activity of PCBs». Endocrinology, vol. 141, no. 5, p. 1897-900.
- KHAN, A. T., A. Atkinson, T. C. Graham, S. J. Thompson, S. Ali, and K. F. Shireen. 2004. «Effects of Inorganic Mercury on Reproductive Performance of Mice». Food Chem Toxicol, vol. 42, no. 4, p. 571-7.
- KHAN, A.T. and J. S. Weis. 1993. «Differential Effects of Organic and Inorganic Mercury on the Micropyle of the Eggs of *Fundulus heteroclitus*.» Environ Biol Fishes, vol. 37, p. 323-327.
- KIM OANH, N. T., B. Bengtsson, L. Baetz Reutergardh, D. T. Hoa, P. Bergqvist, D. Broman, and Y. Zebuhr. 1999. «Persistent Organochlorines in the Effluents From a Chlorine-Bleached Kraft Integrated Pulp and Paper Mill in Southeast Asia». Arch Environ Contam Toxicol, vol. 37, no. 3, p. 303-9.
- KIME, D. E. 1999. «A Strategy for Assessing the Effects of Xenobiotics on Fish Reproduction». Sci Total Environ, vol. 225, no. 1-2, p. 3-11.
- KINNBERG, K. and G. Toft. 2003. «Effects of Estrogenic and Antiandrogenic Compounds on the Testis Structure of the Adult Guppy (*Poecilia Reticulata*)». Ecotoxicol Environ Saf, vol. 54, no. 1, p. 16-24.
- KIPARISSIS, Y., T. L. Metcalfe, G. C. Balch, and C. D. Metcalfe. 2003. «Effects of the Antiandrogens, Vinclozolin and Cyproterone Acetate on Gonadal Development in the Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*)». Aquat Toxicol, vol. 63, no. 4, p. 391-403.
- KIRK, C. J., L. Bottomley, N. Minican, H. Carpenter, S. Shaw, N. Kohli, M. Winter, E. W. Taylor, R. H. Waring, F. Michelangeli, and R. M. Harris. 2003. «Environmental

Endocrine Disrupters Dysregulate Estrogen Metabolism and Ca²⁺ Homeostasis in Fish and Mammals Via Receptor-Independent Mechanisms». Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol, vol. 135, no. 1, p. 1-8.

KISHIDA, M. and G. V. Callard. 2001. «Distinct Cytochrome P450 Aromatase Isoforms in Zebrafish (Danio Rerio) Brain and Ovary Are Differentially Programmed and Estrogen Regulated During Early Development». Endocrinology, vol. 142, no. 2, p. 740-50.

KISHIDA, M., M. McLellan, J. A. Miranda, and G. V. Callard. 2001. «Estrogen and Xenoestrogens Upregulate the Brain Aromatase Isoform (P450aromB) and Perturb Markers of Early Development in Zebrafish (Danio Rerio)». Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol, vol. 129, no. 2-3, p. 261-8.

KLINGE, C. M. 2000. «Estrogen Receptor Interaction With Co-Activators and Co-Repressors». Steroids, vol. 65, no. 5, p. 227-51.

KLINGE, C. M., K. Kaur, and H. I. Swanson. 2000. «The Aryl Hydrocarbon Receptor Interacts With Estrogen Receptor Alpha and Orphan Receptors COUP-TFI and ERRA1». Arch Biochem Biophys, vol. 373, no. 1, p. 163-74.

KLOTZ, D. M., S. F. Arnold, and J. A. McLachlan. 1997. «Inhibition of 17 Beta-Estradiol and Progesterone Activity in Human Breast and Endometrial Cancer Cells by Carbamate Insecticides». Life Sci, vol. 60, no. 17, p. 1467-75.

KNÖRR, S. and T. Braunbeck. 2002. «Decline in Reproductive Success, Sex Reversal, and Developmental Alterations in Japanese Medaka (Oryzias Latipes) After Continuous Exposure to Octylphenol». Ecotoxicol Environ Saf, vol. 51, no. 3, p. 187-96.

KOBAYASHI, M., K. Aida, and N. E. Stacey. 1991. «Induction of Testis Development by Implantation of 11-Ketotestosterone in Female Goldfish.» Zool Sci, vol. 8, no. 2, p. 389-393.

KOLON, T. F., J. S. Wiener, M. Lewitton, D. R. Roth, E. T. Gonzales Jr, and D. J. Lamb. 1999. «Analysis of Homeobox Gene HOXA10 Mutations in Cryptorchidism». J Urol, vol. 161, no. 1, p. 275-80.

KONOPLYA, E. F. and E. H. Popoff. 1992. «Identification of the Classical Androgen Receptor in Male Rat Liver and Prostate Cell Plasma Membranes». Int J Biochem, vol. 24, no. 12, p. 1979-83.

KORACH, K. S., P. Sarver, K. Chae, J. A. McLachlan, and J. D. McKinney. 1988. «Estrogen Receptor-Binding Activity of Polychlorinated Hydroxybiphenyls: Conformationally Restricted Structural Probes». Mol Pharmacol, vol. 33, no. 1, p. 120-6.

KORNILOVSKAYA, I. N., M. V. Gorelaya, V. S. Usenko, L. V. Gerbilsky, and V. A. Berezin. 1996. «Histological Studies of Atrazine Toxicity on the Thyroid Gland in Rats». Biomed Environ Sci, vol. 9, no. 1, p. 60-6.

- KRAMER, V. J., W. G. Helferich, A. Bergman, E. Klasson-Wehler, and J. P. Giesy. 1997. «Hydroxylated Polychlorinated Biphenyl Metabolites Are Anti-Estrogenic in a Stably Transfected Human Breast Adenocarcinoma (MCF7) Cell Line». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 144, no. 2, p. 363-76.
- KRISFALUSI, M. and J. J. Nagler. 2000. «Induction of Gonadal Intersex in Genotypic Male Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Embryos Following Immersion in Estradiol-17beta». Mol Reprod Dev, vol. 56, no. 4, p. 495-501.
- KRISHNAN, V., W. Porter, M. Santostefano, X. Wang, and S. Safe. 1995. «Molecular Mechanism of Inhibition of Estrogen-Induced Cathepsin D Gene Expression by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) in MCF-7 Cells». Mol Cell Biol, vol. 15, no. 12, p. 6710-9.
- KRISTENSEN, P., A. Andersen, L. M. Irgens, A. S. Bye, and N. Vagstad. 1996. «Testicular Cancer and Parental Use of Fertilizers in Agriculture». Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, vol. 5, no. 1, p. 3-9.
- KRISTENSEN, P., E. Eilertsen, E. Einarsdottir, A. Haugen, V. Skaug, and S. Ovrebo. 1995. «Fertility in Mice After Prenatal Exposure to Benzo[a]Pyrene and Inorganic Lead». Environ Health Perspect, vol. 103, no. 6, p. 588-90.
- KUIPER, G. G., E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, and J. A. Gustafsson. 1996. «Cloning of a Novel Receptor Expressed in Rat Prostate and Ovary». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 93, no. 12, p. 5925-30.
- KWON, J. Y., B. J. McAndrew, and D. J. Penman. 2001. «Cloning of Brain Aromatase Gene and Expression of Brain and Ovarian Aromatase Genes During Sexual Differentiation in Genetic Male and Female Nile Tilapia *Oreochromis Niloticus*». Mol Reprod Dev, vol. 59, no. 4, p. 359-70.
- KWON, J. Y., V. Haghpanah, L. M. Kogson-Hurtado, B. J. McAndrew, and D. J. Penman. 2000. «Masculinization of Genetic Female Nile Tilapia (*Oreochromis Niloticus*) by Dietary Administration of an Aromatase Inhibitor During Sexual Differentiation». J Exp Zool, vol. 287, no. 1, p. 46-53.
- LAISI, A., R. Tuominen, P. Mannisto, K. Savolainen, and J. Mattila. 1985. «The Effect of Maneb, Zineb, and Ethylenethiourea on the Humoral Activity of the Pituitary-Thyroid Axis in Rat». Arch Toxicol Suppl, vol. 8, p. 253-8.
- LANGE, I. G., A. Daxenberger, and H. H. Meyer. 2001. «Hormone Contents in Peripheral Tissues After Correct and Off-Label Use of Growth Promoting Hormones in Cattle: Effect of the Implant Preparations Filaplix-H, Raglo, Synovex-H and Synovex Plus». APMIS, vol. 109, no. 1, p. 53-65.
- LARUE, W. 1980. Food of Alewives, Yellow Perch, Spottail Shiners, Trout-Perch, and Slimy and Fourhorn Sculpins in Southeastern Lake Michigan. Technical papers of the U.S. Fish and Wildlife Service; 98. Washington, D.C.

- LARUE, W. and H. Robert. 1974. Life History of the Spottail Shiner (Notropis Hudsonius) in Southeastern Lake Michigan, the Kalamazoo River, and Western Lake Erie. Research Report 78. Bureau of Sport Fisheries and Wildlife. Washington, D.C.
- LAVINSKY, R. M., K. Jepsen, T. Heinzl, J. Torchia, T. M. Mullen, R. Schiff, A. L. Del-Rio, M. Ricote, S. Ngo, J. Gemsch, S. G. Hilsenbeck, C. K. Osborne, C. K. Glass, M. G. Rosenfeld, and D. W. Rose. 1998. «Diverse Signaling Pathways Modulate Nuclear Receptor Recruitment of N-CoR and SMRT Complexes». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, no. 6, p. 2920-5.
- LE BAIL, J. C., Y. Champavier, A. J. Chulia, and G. Habrioux. 2000. «Effects of Phytoestrogens on Aromatase, 3beta and 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Activities and Human Breast Cancer Cells». Life Sci, vol. 66, no. 14, p. 1281-91.
- LIND, P. M., M. R. Milnes, R. Lundberg, D. Bermudez, J. A. Orberg, and L. J. Guillette Jr. 2004. «Abnormal Bone Composition in Female Juvenile American Alligators From a Pesticide-Polluted Lake (Lake Apopka, Florida)». Environ Health Perspect, vol. 112, no. 3, p. 359-62.
- LISTER, A. and G. J. Van Der Kraak. 2001. «Endocrine Disruption: Why it is so Complicated ?» Water Qual Res Jour Can, vol. 36, no. 2, p. 175-188.
- LOOMIS, A. K. and P. Thomas. 2000. «Effects of Estrogens and Xenoestrogens on Androgen Production by Atlantic Croaker Testes in Vitro: Evidence for a Nongenomic Action Mediated by an Estrogen Membrane Receptor». Biol Reprod, vol. 62, no. 4, p. 995-1004.
- LUCONI, M., L. Bonaccorsi, G. Forti, and E. Baldi. 2001. «Effects of Estrogenic Compounds on Human Spermatozoa: Evidence for Interaction With a Nongenomic Receptor for Estrogen on Human Sperm Membrane». Mol Cell Endocrinol, vol. 178, no. 1-2, p. 39-45.
- LUNDHOLM, C. D. 1997. «DDE-Induced Eggshell Thinning in Birds: Effects of P,p'-DDE on the Calcium and Prostaglandin Metabolism of the Eggshell Gland». Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, vol. 118, no. 2, p. 113-28.
- MARIEB, E.N. 1999. Anatomie et Physiologie Humaines. Éditions du Renouveau Pédagogique. Montréal.
- MATTIOLI, F., L. Robbiano, L. Fazzuoli, and P. Baracchini. 1994. «Studies on the Mechanism of the Carcinogenic Activity of Amitrole». Fundam Appl Toxicol, vol. 23, no. 1, p. 101-6.
- MCKENNA, N. J. and B. W. O'Malley. 2002. «Minireview: Nuclear Receptor Coactivators--an Update». Endocrinology, vol. 143, no. 7, p. 2461-5.

- MCKENNA, N. J., R. B. Lanz, and B. W. O'Malley. 1999. «Nuclear Receptor Coregulators: Cellular and Molecular Biology». Endocr Rev, vol. 20, no. 3, p. 321-44.
- MCLACHLAN, J. A. 1997. «Synergistic Effect of Environmental Estrogens: Report Withdrawn». Science, vol. 277, no. 5325, p. 462-3.
- MCMMASTER, M. E., C. B. Portt, K. R. Munkittrick, and D. G. Dixon. 1992. «Milt Characteristics, Reproductive Performance, and Larval Survival and Development of White Sucker Exposed to Bleached Kraft Mill Effluent». Ecotoxicol Environ Saf, vol. 23, no. 1, p. 103-17.
- MEERTS, I. A., Y. Assink, P. H. Ceniijn, J. H. Van Den Berg, B. M. Weijers, A. Bergman, J. H. Koeman, and A. Brouwer. 2002. «Placental Transfer of a Hydroxylated Polychlorinated Biphenyl and Effects on Fetal and Maternal Thyroid Hormone Homeostasis in the Rat». Toxicol Sci, vol. 68, no. 2, p. 361-71.
- MEISTRICH, M. L., G. Wilson, G. A. Shuttlesworth, and K. L. Porter. 2003. «Dibromochloropropane Inhibits Spermatogonial Development in Rats». Reprod Toxicol, vol. 17, no. 3, p. 263-71.
- MELLANEN, P., T. Petanen, J. Lehtimaki, S. Makela, G. Bylund, B. Holmbom, E. Mannila, A. Oikari, and R. Santti. 1996. «Wood-Derived Estrogens: Studies in Vitro With Breast Cancer Cell Lines and in Vivo in Trout». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 136, no. 2, p. 381-8.
- METCALFE, C. D., T. L. Metcalfe, Y. Kiparissis, B. G. Koenig, C. Khan, R. J. Hughes, T. R. Croley, R. E. March, and T. Potter. 2001. «Estrogenic Potency of Chemicals Detected in Sewage Treatment Plant Effluents As Determined by in Vivo Assays With Japanese Medaka (Oryzias Latipes)». Environ Toxicol Chem, vol. 20, no. 2, p. 297-308.
- MILMAN, H. A., J. M. Ward, and K. C. Chu. 1978. «Pancreatic Carcinogenesis and Naturally Occurring Pancreatic Neoplasms of Rats and Mice in the NCI Carcinogenesis Testing Program». J Environ Pathol Toxicol, vol. 1, no. 6, p. 829-40.
- MIN, J., S. K. Lee, and M. B. Gu. 2003. «Effects of Endocrine Disrupting Chemicals on Distinct Expression Patterns of Estrogen Receptor, Cytochrome P450 Aromatase and P53 Genes in Oryzias Latipes Liver». J Biochem Mol Toxicol, vol. 17, no. 5, p. 272-7.
- MISHRA, P. K., B. Manivannan, N. Pathak, S. Sriram, S. S. Bhande, S. Panneerdoss, and N. K. Lohiya. 2003. «Status of Spermatogenesis and Sperm Parameters in Langur Monkeys Following Long-Term Vas Occlusion With Styrene Maleic Anhydride». J Androl, vol. 24, no. 4, p. 501-9.
- MIURA, T., K. Yamauchi, H. Takahashi, and Y. Nagahama. 1991. «Hormonal Induction of All Stages of Spermatogenesis in Vitro in the Male Japanese Eel (Anguilla Japonica)». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 88, no. 13, p. 5774-8.

- MOORE, M., M. Mustain, K. Daniel, I. Chen, S. Safe, T. Zacharewski, B. Gillesby, A. Joyeux, and P. Balaguer. 1997. «Antiestrogenic Activity of Hydroxylated Polychlorinated Biphenyl Congeners Identified in Human Serum». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 142, no. 1, p. 160-8.
- NAGAHAMA, Y. 1994. «Endocrine Regulation of Gametogenesis in Fish». Int J Dev Biol, vol. 38, no. 2, p. 217-29.
- NAGEL, S. C., F. S. vom Saal, K. A. Thayer, M. G. Dhar, M. Boechler, and W. V. Welshons. 1997. «Relative Binding Affinity-Serum Modified Access (RBA-SMA) Assay Predicts the Relative in Vivo Bioactivity of the Xenoestrogens Bisphenol A and Octylphenol». Environ Health Perspect, vol. 105, no. 1, p. 70-6.
- NAGLER, J. J., J. Bouma, G. H. Thorgaard, and D. D. Dauble. 2001. «High Incidence of a Male-Specific Genetic Marker in Phenotypic Female Chinook Salmon From the Columbia River». Environ Health Perspect, vol. 109, no. 1, p. 67-9.
- NAGLER, J. J., M. Krisfalusi, and D. G. Cyr. 2000. «Quantification of Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Estrogen Receptor-Alpha Messenger RNA and Its Expression in the Ovary During the Reproductive Cycle». J Mol Endocrinol, vol. 25, no. 2, p. 243-51.
- NEF, S., T. Shipman, and L. F. Parada. 2000. «A Molecular Basis for Estrogen-Induced Cryptorchidism». Dev Biol, vol. 224, no. 2, p. 354-61.
- NELSON, J. A., R. F. Struck, and R. James. 1978. «Estrogenic Activities of Chlorinated Hydrocarbons». J Toxicol Environ Health, vol. 4, no. 2-3, p. 325-39.
- NICHOLS, D.J., T.C. Daniel, Jr P.A. Moore, D.R. Edwards, and D. H. Pote. 1997. «Runoff of Estrogen Hormone 17beta-Estradiol from Poultry Litter Applied to Pasture.» Environ Qual, vol. 26, no. 4, p. 1002-1006.
- NIRMALA, K., Y. Oshima, R. Lee, N. Imada, T. Homjo, and K. Kobayashi. 1999. «Transgenerational Toxicity of Tributyltin and its Combined Effects whit Polychorinated Biphenyls on Reproductive Processes in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*).» Environ Toxicol Chem, vol. 18, no. 4, p. 717-721.
- NIWA, T., Y. Maekawa, M. Fujimoto, K. Kishimoto, Y. Yabusaki, F. Ishibashi, and M. Katagiri. 2002. «Inhibition of Human Hepatic Cytochrome P450s and Steroidogenic CYP17 by Nonylphenol». Biol Pharm Bull, vol. 25, no. 2, p. 235-8.
- NY SPORT FISHING AND AQUATIC RESOURCES EDUCATION PROGRAM (SAREP) DEPARTMENT OF NATURAL RESOURCES. 1980. Minnow family, Cyprinidae.
- OAKES, K. D., M. E. McMaster, and G. J. Van Der Kraak. 2004. «Oxidative Stress Responses in Longnose Sucker (*Catostomus Catostomus*) Exposed to Pulp and Paper Mill and Municipal Sewage Effluents». Aquat Toxicol, vol. 67, no. 3, p. 255-71.

- ODUMA, J. A., E. O. Wango, D. Oduor-Okelo, D. W. Makawiti, and H. Odongo. 1995. «In Vivo and in Vitro Effects of Graded Doses of the Pesticide Heptachlor on Female Sex Steroid Hormone Production in Rats». Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol, vol. 111, no. 2, p. 191-6.
- OEHLMANN, J., B. Markert, E. Stroben, U. Schulte-Oehlmann, B. Bauer, and P. Fioroni. 1996. «Tributyltin Biomonitoring Using Prosobranchs As Sentinel Organisms». Anal Bioanal Chem, vol. 354, no. 5-6, p. 540-5.
- OHKIMOTO, K., M. Y. Liu, M. Suiko, Y. Sakakibara, and M. C. Liu. 2004. «Characterization of a Zebrafish Estrogen-Sulfating Cytosolic Sulfotransferase: Inhibitory Effects and Mechanism of Action of Phytoestrogens». Chem Biol Interact, vol. 147, no. 1, p. 1-7.
- OHKIMOTO, K., T. Sugahara, Y. Sakakibara, M. Suiko, M. Y. Liu, G. Carter, and M. C. Liu. 2003. «Sulfonation of Environmental Estrogens by Zebrafish Cytosolic Sulfotransferases». Biochem Biophys Res Commun, vol. 309, no. 1, p. 7-11.
- OLSEN, G. W., K. M. Bodner, J. M. Ramlow, C. E. Ross, and L. I. Lipshultz. 1995. «Have Sperm Counts Been Reduced 50 Percent in 50 Years? A Statistical Model Revisited». Fertil Steril, vol. 63, no. 4, p. 887-93.
- OLSSON, M., B. Karlsson, and E. Ahnland. 1994. «Diseases and Environmental Contaminants in Seals From the Baltic and the Swedish West Coast». Sci Total Environ, vol. 154, no. 2-3, p. 217-27.
- OLSSON, M., A.G. Johnels, and R. Vaz. 1975. «DDT and PCB Levels in Seals from Swedish Waters. The Occurrence of Aborted Seal Pups.» Proceeding from the symposium on the seal in the Baltic. SNV PM., vol. 591, p. 43-65
- OPPEN-BERNTSEN, D. O., A. Arukwe, F. Yadetie, J. B. Lorens, and R. Male. 1999. «Salmon Eggshell Protein Expression: A Marker for Environmental Estrogens». Mar Biotechnol (NY), vol. 1, no. 3, p. 252-60.
- OPPEN-BERNTSEN, D. O., E. Gram-Jensen, and B. T. Walther. 1992. «Zona Radiata Proteins Are Synthesized by Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Hepatocytes in Response to Oestradiol-17 Beta». J Endocrinol, vol. 135, no. 2, p. 293-302.
- OSHIMA, Y., I. J. Kang, M. Kobayashi, K. Nakayama, N. Imada, and T. Honjo. 2003. «Suppression of Sexual Behavior in Male Japanese Medaka (*Oryzias Latipes*) Exposed to 17beta-Estradiol». Chemosphere, vol. 50, no. 3, p. 429-36.
- PAECH, K., P. Webb, G. G. Kuiper, S. Nilsson, J. Gustafsson, P. J. Kushner, and T. S. Scanlan. 1997. «Differential Ligand Activation of Estrogen Receptors ERalpha and ERbeta at AP1 Sites». Science, vol. 277, no. 5331, p. 1508-10.
- PAULOZZI, L. J., J. D. Erickson, and R. J. Jackson. 1997. «Hypospadias Trends in Two US Surveillance Systems». Pediatrics, vol. 100, no. 5, p. 831-4.

- PAYNE, J., N. Rajapakse, M. Wilkins, and A. Kortenkamp. 2000. «Prediction and Assessment of the Effects of Mixtures of Four Xenoestrogens». Environ Health Perspect, vol. 108, no. 10, p. 983-7.
- PEAKALL, D. B. 1970. «P,p'-DDT: Effect on Calcium Metabolism and Concentration of Estradiol in the Blood». Science, vol. 168, no. 931, p. 592-4.
- PEAKALL, D. E.; J. L. Lincer; R. W. Risebrough, J. B. Pritchard, W. B. and Kinter. 1973. «DDE-Induced Egg-Shell Thinning: Structural and Physiological Effects in Three Species». Comp Gen Pharmacol, vol. 4, no. 15, p. 305-13.
- PORTER, W. P., S. M. Green, N. L. Debbink, and I. Carlson. 1993. «Groundwater Pesticides: Interactive Effects of Low Concentrations of Carbamates Aldicarb and Methomyl and the Triazine Metribuzin on Thyroxine and Somatotropin Levels in White Rats». J Toxicol Environ Health, vol. 40, no. 1, p. 15-34.
- POWER, D. M., P. M. Ingleton, and M. S. Clark. 2002. «Application of Comparative Genomics in Fish Endocrinology». Int Rev Cytol, vol. 221, p. 149-90.
- PRATT, W. B. 1997. «The Role of the Hsp90-Based Chaperone System in Signal Transduction by Nuclear Receptors and Receptors Signaling Via MAP Kinase». Annu Rev Pharmacol Toxicol, vol. 37, p. 297-326.
- PRISCO, M., M. Romano, L. Ricchiari, E. Limatola, and P. Andreuccetti. 2002. «An Ultrastructural Study on the Vitellogenesis in the Spotted Ray *Torpedo Marmorata*». Gen Comp Endocrinol, vol. 128, no. 3, p. 171-9.
- PURDOM, C.E., P.A. Hardiman, and V. J. Bye. 1994. «Estrogenic Effects of Effluents from Sewage Treatment Works.» Chem Ecol, vol. 8, no. 4, p. 275-285.
- PURENNE, P. 2002. Rapport Annuel 2001: Analyses de la Qualité des Eaux Brutes et de l'Eau Traitée à la Station d'Épuration et Évaluation du Rendement des Installations. Station d'épuration des eaux usées. Division ingénierie de procédé. Communauté Urbaine de Montréal. Montréal.
- QUERAT, B., A. Hardy, and Y. A. Fontaine. 1991. «Regulation of the Type-II Gonadotrophin Alpha and Beta Subunit MRNAs by Oestradiol and Testosterone in the European Eel». J Mol Endocrinol, vol. 7, no. 1, p. 81-86.
- JOHN RADCLIFFE HOSPITAL CRYPTORCHIDISM STUDY GROUP. 1992. «Cryptorchidism: a Prospective Study of 7500 Consecutive Male Births, 1984-8». Arch Dis Child, vol. 67, p. 892-899.
- RAJAPAKSE, N., E. Silva, and A. Kortenkamp. 2002. «Combining Xenoestrogens at Levels Below Individual No-Observed-Effect Concentrations Dramatically Enhances Steroid Hormone Action». Environ Health Perspect, vol. 110, no. 9, p. 917-21.

- RAMAMOORTHY, K., F. Wang, I. C. Chen, J. D. Norris, D. P. McDonnell, L. S. Leonard, K. W. Gaido, W. P. Bocchinfuso, K. S. Korach, and S. Safe. 1997. «Estrogenic Activity of a Dieldrin/Toxaphene Mixture in the Mouse Uterus, MCF-7 Human Breast Cancer Cells, and Yeast-Based Estrogen Receptor Assays: No Apparent Synergism». Endocrinology, vol. 138, no. 4, p. 1520-7.
- RANI, B. E. and M. K. Krishnakumari. 1995. «Prenatal Toxicity of Heptachlor in Albino Rats». Pharmacol Toxicol, vol. 76, no. 2, p. 112-4.
- RATCLIFFE, D. A. 1967. «Decrease in Eggshell Weight in Certain Birds of Prey.» Nature, vol. 215; no. 97, p. 208-10.
- RATCLIFFE, D.A. 1970. «Changes Attributable to Pesticides in Egg Breakage Frequency and Eggshell Thickness in Some British Birds.» J Appl Ecol, vol. 7, p. 67-115.
- RAWLINGS, N. C., S. J. Cook, and D. Waldbillig. 1998. «Effects of the Pesticides Carbofuran, Chlorpyrifos, Dimethoate, Lindane, Triallate, Trifluralin, 2,4-D, and Pentachlorophenol on the Metabolic Endocrine and Reproductive Endocrine System in Ewes». J Toxicol Environ Health A, vol. 54, no. 1, p. 21-36.
- ROBYR, D., A. P. Wolffe, and W. Wahli. 2000. «Nuclear Hormone Receptor Coregulators in Action: Diversity for Shared Tasks». Mol Endocrinol, vol. 14, no. 3, p. 329-47.
- ROGERS, J. M. and M. S. Denison. 2000. «Recombinant Cell Bioassays for Endocrine Disruptors: Development of a Stably Transfected Human Ovarian Cell Line for the Detection of Estrogenic and Anti-Estrogenic Chemicals». In Vitro Mol Toxicol, vol. 13, no. 1, p. 67-82.
- ROJAS, M., E. Bustos-Obregon, F. Martinez-Garcia, H. Contreras, and J. Regadera. 1998. «The Effect of Parathion on Mouse Testicular and Epididymal Development Cultured in Chicken Allantochorion». Adv Exp Med Biol, vol. 444, p. 201-6.
- RONIS, M. J., T. M. Badger, S. J. Shema, P. K. Roberson, and F. Shaikh. 1996. «Reproductive Toxicity and Growth Effects in Rats Exposed to Lead at Different Periods During Development». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 136, no. 2, p. 361-71.
- RONIS, M.J.J. and A. Z. Mason. 1996. «The Metabolism of Testosterone by the Periwinkle (*Littorina littorea*) in Vitro and in Vivo Effects of Tributyltin.» Mar Environ Res, vol. 42, no. 1-4, p. 161-166.
- ROONEY, A. A., D. S. Bermudez, and L. J. Guillette Jr. 2003. «Altered Histology of the Thymus and Spleen in Contaminant-Exposed Juvenile American Alligators». J Morphol, vol. 256, no. 3, p. 349-59.
- ROTCHHELL, J. M. and G. K. Ostrander. 2003. «Molecular Markers of Endocrine Disruption in Aquatic Organisms». J Toxicol Environ Health B Crit Rev, vol. 6, no. 5, p. 453-96.

- ROUTLEDGE, E. J., J. Parker, J. Odum, J. Ashby, and J. P. Sumpter. 1998. «Some Alkyl Hydroxy Benzoate Preservatives (Parabens) Are Estrogenic». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 153, no. 1, p. 12-9.
- ROY, P., H. Salminen, P. Koskimies, J. Simola, A. Smeds, P. Saukko, and I. T. Huhtaniemi. 2004. «Screening of Some Anti-Androgenic Endocrine Disruptors Using a Recombinant Cell-Based in Vitro Bioassay». J Steroid Biochem Mol Biol, vol. 88, no. 2, p. 157-66.
- SABIK, H., F. Gagne, C. Blaise, D. J. Marcogliese, and R. Jeannot. 2003. «Occurrence of Alkylphenol Polyethoxylates in the St. Lawrence River and Their Bioconcentration by Mussels (*Elliptio Complanata*)». Chemosphere, vol. 51, no. 5, p. 349-56.
- SACEDA, M., R. K. Lindsey, H. Solomon, S. V. Angeloni, and M. B. Martin. 1998. «Estradiol Regulates Estrogen Receptor MRNA Stability». J Steroid Biochem Mol Biol, vol. 66, no. 3, p. 113-20.
- SAFE, S. 2001. «Transcriptional Activation of Genes by 17 Beta-Estradiol Through Estrogen Receptor-Sp1 Interactions». Vitam Horm, vol. 62, p. 231-52.
- SAFE, S. H. 1995. «Modulation of Gene Expression and Endocrine Response Pathways by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin and Related Compounds». Pharmacol Ther, vol. 67, no. 2, p. 247-81.
- SAFE, S., F. Wang, W. Porter, R. Duan, and A. McDougal. 1998. «Ah Receptor Agonists As Endocrine Disruptors: Antiestrogenic Activity and Mechanisms». Toxicol Lett, vol. 102-103, p. 343-7.
- SANDERS, J. E., D. A. Eigenberg, L. J. Bracht, W. R. Wang, and M. J. van Zwieten. 1988. «Thyroid and Liver Trophic Changes in Rats Secondary to Liver Microsomal Enzyme Induction Caused by an Experimental Leukotriene Antagonist (L-649,923)». Toxicol Appl Pharmacol, vol. 95, no. 3, p. 378-87.
- SCHULTZ, I. R., A. Skillman, J. M. Nicolas, D. G. Cyr, and J. J. Nagler. 2003. «Short-Term Exposure to 17Alpha-Ethynylestradiol Decreases the Fertility of Sexually Maturing Male Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*)». Environ Toxicol Chem, vol. 22, no. 6, p. 1272-80.
- SCHWAIGER, J., U. Mallow, H. Ferling, S. Knoerr, T. Braunbeck, W. Kalbfus, and R. D. Negele. 2002. «How Estrogenic Is Nonylphenol? A Transgenerational Study Using Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) As a Test Organism». Aquat Toxicol, vol. 59, no. 3-4, p. 177-89.
- SCIPPO, M. L., C. Argiris, C. Van De Weerd, M. Muller, P. Willemsen, J. Martial, and G. Maghuin-Rogister. 2004. «Recombinant Human Estrogen, Androgen and Progesterone Receptors for Detection of Potential Endocrine Disruptors». Anal Bioanal Chem, vol. 378, no. 3, p. 664-9.

- SCORER, C. G. 1964. «The Descent of the Testis». Arch Dis Child, vol. 39, p. 605-9.
- SENEKJIAN, E. K., R. K. Potkul, K. Frey, and A. L. Herbst. 1988. «Infertility Among Daughters Either Exposed or Not Exposed to Diethylstilbestrol». Am J Obstet Gynecol, vol. 158, no. 3 Pt 1, p. 493-8.
- SEPULVEDA, M. S., B. P. Quinn, N. D. Denslow, S. E. Holm, and T. S. Gross. 2003. «Effects of Pulp and Paper Mill Effluents on Reproductive Success of Largemouth Bass». Environ Toxicol Chem, vol. 22, no. 1, p. 205-13.
- SHARPE, R. M. and N. E. Skakkebaek. 1993. «Are Oestrogens Involved in Falling Sperm Counts and Disorders of the Male Reproductive Tract?». Lancet, vol. 341, no. 8857, p. 1392-5.
- SHIODA, T. and M. Wakabayashi. 2000. «Effect of Certain Chemicals on the Reproduction of Medaka (*Oryzias Latipes*)». Chemosphere, vol. 40, no. 3, p. 239-43.
- SIMIC, B., Z. Kniewald, J. E. Davies, and J. Kniewald. 1991. «Reversibility of the Inhibitory Effect of Atrazine and Lindane on Cytosol 5Alpha-Dihydrotestosterone Receptor Complex Formation in Rat Prostate». Bull Environ Contam Toxicol, vol. 46, no. 1, p. 92-9.
- SINGH, A., M. K. Bhatnagar, D. C. Villeneuve, and V. E. Valli. 1985. «Ultrastructure of the Thyroid Glands of Rats Fed Photomirex: a 48-Week Recovery Study». J Environ Pathol Toxicol Oncol, vol. 6, no. 1, p. 115-26.
- SINHA, N., B. Lal, and T. P. Singh. 1991. «Pesticides Induced Changes in Circulating Thyroid Hormones in the Freshwater Catfish *Clarias Batrachus*». Comp Biochem Physiol C, vol. 100, no. 1-2, p. 107-10.
- SMEETS, J. M., I. van Holsteijn, J. P. Giesy, W. Seinen, and M. van den Berg. 1999. «Estrogenic Potencies of Several Environmental Pollutants, As Determined by Vitellogenin Induction in a Carp Hepatocyte Assay». Toxicol Sci, vol. 50, no. 2, p. 206-13.
- SMITH, A. G., D. Dinsdale, J. R. Cabral, and A. L. Wright. 1987. «Goitre and Wasting Induced in Hamsters by Hexachlorobenzene». Arch Toxicol, vol. 60, no. 5, p. 343-9.
- SOHONI, P., P. A. Lefevre, J. Ashby, and J. P. Sumpter. 2001. «Possible Androgenic/Anti-Androgenic Activity of the Insecticide Fenitrothion». J Appl Toxicol, vol. 21, no. 3, p. 173-8.
- SORENSEN, P. W. and A. P. Scott. 1994. «The Evolution of Hormonal Sex Pheromones in Teleost Fish: Poor Correlation Between the Pattern of Steroid Release by Goldfish and Olfactory Sensitivity Suggests That These Cues Evolved As a Result of Chemical Spying Rather Than Signal Specialization». Acta Physiol Scand, vol. 152, no. 2, p. 191-205.

- SOTO, A. M., J. M. Calabro, N. V. Precht, A. Y. Yau, E. F. Orlando, A. Daxenberger, A. S. Kolok, L. J. Guillette Jr, B. le Bizec, I. G. Lange, and C. Sonnenschein. 2004. «Androgenic and Estrogenic Activity in Water Bodies Receiving Cattle Feedlot Effluent in Eastern Nebraska, USA». Environ Health Perspect, vol. 112, no. 3, p. 346-52.
- SOTO, A. M., K. L. Chung, and C. Sonnenschein. 1994. «The Pesticides Endosulfan, Toxaphene, and Dieldrin Have Estrogenic Effects on Human Estrogen-Sensitive Cells». Environ Health Perspect, vol. 102, no. 4, p. 380-3.
- SPENCER, F., L. Chi, and M. X. Zhu. 1998. «Biochemical Characterization of Benomyl Inhibition on Endometrial Growth During Decidualization in Rats». Adv Exp Med Biol, vol. 444, p. 163-9.
- SPENGLER, P., W. Korner, and J. W. Metzger. 2001. «Substances With Estrogenic Activity in Effluents of Sewage Treatment Plants in Southwestern Germany. 1. Chemical Analysis». Environ Toxicol Chem, vol. 20, no. 10, p. 2133-41.
- SPERRY, T. S. and P. Thomas. 2000. «Androgen Binding Profiles of Two Distinct Nuclear Androgen Receptors in Atlantic Croaker (*Micropogonias Undulatus*)». J Steroid Biochem Mol Biol, vol. 73, no. 3-4, p. 93-103.
- STACHEL, B., U. Ehrhorn, O. P. Heemken, P. Lepom, H. Reincke, G. Sawal, and N. Theobald. 2003. «Xenoestrogens in the River Elbe and Its Tributaries». Environ Pollut, vol. 124, no. 3, p. 497-507.
- SUMPTER, J. P. and S. Jobling. 1995. «Vitellogenesis As a Biomarker for Estrogenic Contamination of the Aquatic Environment». Environ Health Perspect, vol. 103 Suppl 7, p. 173-8.
- SWAN, S. H., E. P. Elkin, and L. Fenster. 1997. «Have Sperm Densities Declined? A Reanalysis of Global Trend Data». Environ Health Perspect, vol. 105, no. 11, p. 1228-32.
- SWANSON, P., K. Suzuki, H. Kawauchi, and W. W. Dickhoff. 1991. «Isolation and Characterization of Two Coho Salmon Gonadotropins, GTH I and GTH II». Biol Reprod, vol. 44, no. 1, p. 29-38.
- SWARTZ, W. J. and V. P. Eroschenko. 1998. «Neonatal Exposure to Technical Methoxychlor Alters Pregnancy Outcome in Female Mice». Reprod Toxicol, vol. 12, no. 6, p. 565-73.
- TAKEO, J. and S. Yamashita. 1999. «Two Distinct Isoforms of cDNA Encoding Rainbow Trout Androgen Receptors». J Biol Chem, vol. 274, no. 9, p. 5674-80.
- TANENBAUM, D. M., Y. Wang, S. P. Williams, and P. B. Sigler. 1998. «Crystallographic Comparison of the Estrogen and Progesterone Receptor's Ligand Binding Domains». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 95, no. 11, p. 5998-6003.

- TAPIERO, H., G. N. Ba, and K. D. Tew. 2002. «Estrogens and Environmental Estrogens». Biomed Pharmacother, vol. 56, no. 1, p. 36-44.
- TCHOUDAKOVA, A. and G. V. Callard. 1998. «Identification of Multiple CYP19 Genes Encoding Different Cytochrome P450 Aromatase Isozymes in Brain and Ovary». Endocrinology, vol. 139, no. 4, p. 2179-89.
- TERNES, T. A., M. Stumpf, J. Mueller, K. Haberer, R. D. Wilken, and M. Servos. 1999. «Behavior and Occurrence of Estrogens in Municipal Sewage Treatment Plants--I. Investigations in Germany, Canada and Brazil». Sci Total Environ, vol. 225, no. 1-2, p. 81-90.
- THOMAS, P. 2000. «Chemical Interference With Genomic and Nongenomic Actions of Steroids in Fishes: Role of Receptor Binding». Mar Environ Res, vol. 50, no. 1-5, p. 127-34.
- TOLLEFSEN, K. E., J. F. Meys, J. Frydenlund, and J. Stenersen. 2002. «Environmental Estrogens Interact With and Modulate the Properties of Plasma Sex Steroid-Binding Proteins in Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo Salar*)». Mar Environ Res, vol. 54, no. 3-5, p. 697-701.
- TOMBOC, M., P. A. Lee, M. F. Mitwally, F. X. Schneck, M. Bellinger, and S. F. Witchel. 2000. «Insulin-Like 3/Relaxin-Like Factor Gene Mutations Are Associated With Cryptorchidism». J Clin Endocrinol Metab, vol. 85, no. 11, p. 4013-8.
- TONG, Z. and M. O. James. 2000. «Purification and Characterization of Hepatic and Intestinal Phenol Sulfotransferase With High Affinity for Benzo[a]Pyrene Phenols From Channel Catfish, *Ictalurus Punctatus*». Arch Biochem Biophys, vol. 376, no. 2, p. 409-19.
- TOPPARI, J., J. C. Larsen, P. Christiansen, A. Giwercman, P. Grandjean, L. J. Guillette Jr, B. Jegou, T. K. Jensen, P. Jouannet, N. Keiding, H. Leffers, J. A. McLachlan, O. Meyer, J. Muller, E. Rajpert-De Meyts, T. Scheike, R. Sharpe, J. Sumpter, and N. E. Skakkebaek. 1996. «Male Reproductive Health and Environmental Xenoestrogens». Environ Health Perspect, vol. 104 Suppl 4, p. 741-803.
- TOPPARI, J., M. Kaleva, and H. E. Virtanen. 2001. «Trends in the Incidence of Cryptorchidism and Hypospadias, and Methodological Limitations of Registry-Based Data». Hum Reprod Update, vol. 7, no. 3, p. 282-6.
- TORA, L., J. White, C. Brou, D. Tasset, N. Webster, E. Scheer, and P. Chambon. 1989. «The Human Estrogen Receptor Has Two Independent Nonacidic Transcriptional Activation Functions». Cell, vol. 59, no. 3, p. 477-87.
- TRANT, J. M., J. Lehrter, T. Gregory, S. Nunez, and J. Wunder. 1997. «Expression of Cytochrome P450 Aromatase in the Channel Catfish, *Ictalurus Punctatus*». J Steroid Biochem Mol Biol, vol. 61, no. 3-6, p. 393-7.

- TRIPATHI, P. K. and A. Singh. 2003. «Toxic Effects of Dimethoate and Carbaryl Pesticides on Reproduction and Related Enzymes of the Freshwater Snail *Lymnaea Acuminata*». Bull Environ Contam Toxicol, vol. 71, no. 3, p. 535-42.
- TYLER, C. R., S. Jobling, and J. P. Sumpter. 1998. «Endocrine Disruption in Wildlife: a Critical Review of the Evidence». Crit Rev Toxicol, vol. 28, no. 4, p. 319-61.
- TYLER, C. R., T. G. Pottinger, E. Santos, J. P. Sumpter, S. A. Price, S. Brooks, and J. J. Nagler. 1996. «Mechanisms Controlling Egg Size and Number in the Rainbow Trout, *Oncorhynchus Mykiss*». Biol Reprod, vol. 54, no. 1, p. 8-15.
- UMESONO, K. and R. M. Evans. 1989. «Determinants of Target Gene Specificity for Steroid/Thyroid Hormone Receptors». Cell, vol. 57, no. 7, p. 1139-46.
- URUSHITANI, H., M. Nakai, H. Inanaga, Y. Shimohigashi, A. Shimizu, Y. Katsu, and T. Iguchi. 2003. «Cloning and Characterization of Estrogen Receptor Alpha in *Mummichog*, *Fundulus Heteroclitus*». Mol Cell Endocrinol, vol. 203, no. 1-2, p. 41-50.
- VAN DEN BELT, K., R. Verheyen, and H. Witters. 2001. «Reproductive Effects of Ethynylestradiol and 4t-Octylphenol on the Zebrafish (*Danio Rerio*)». Arch Environ Contam Toxicol, vol. 41, no. 4, p. 458-67.
- VAN DEN BELT, K., R. Verheyen, and H. Witters. 2003. «Comparison of Vitellogenin Responses in Zebrafish and Rainbow Trout Following Exposure to Environmental Estrogens». Ecotoxicol Environ Saf, vol. 56, no. 2, p. 271-81.
- VAN DEN BERG, K. J., J. A. van Raaij, P. C. Bragt, and W. R. Notten. 1991. «Interactions of Halogenated Industrial Chemicals With Transthyretin and Effects on Thyroid Hormone Levels in Vivo». Arch Toxicol, vol. 65, no. 1, p. 15-9.
- VAN DEN HURK, P., G. A. Kubiczak, H. J. Lehmler, and M. O. James. 2002. «Hydroxylated Polychlorinated Biphenyls As Inhibitors of the Sulfation and Glucuronidation of 3-Hydroxy-Benzo[a]Pyrene». Environ Health Perspect, vol. 110, no. 4, p. 343-8.
- VIGANO, L., A. Arillo, S. Bottero, A. Massari, and A. Mandich. 2001. «First Observation of Intersex Cyprinids in the Po River (Italy)». Sci Total Environ, vol. 269, no. 1-3, p. 189-94.
- VINGGAARD, A. M., C. Hnida, V. Breinholt, and J. C. Larsen. 2000a. «Screening of Selected Pesticides for Inhibition of CYP19 Aromatase Activity in Vitro». Toxicol In Vitro, vol. 14, no. 3, p. 227-34.
- VINGGAARD, A. M., W. Korner, K. H. Lund, U. Bolz, and J. H. Petersen. 2000b. «Identification and Quantification of Estrogenic Compounds in Recycled and Virgin Paper for Household Use As Determined by an in Vitro Yeast Estrogen Screen and Chemical Analysis». Chem Res Toxicol, vol. 13, no. 12, p. 1214-22.

- VONIER, P. M., D. A. Crain, J. A. McLachlan, L. J. Guillette Jr, and S. F. Arnold. 1996. «Interaction of Environmental Chemicals With the Estrogen and Progesterone Receptors From the Oviduct of the American Alligator». Environ Health Perspect, vol. 104, no. 12, p. 1318-22.
- VOS, J. G., E. Dybing, H. A. Greim, O. Ladefoged, C. Lambre, J. V. Tarazona, I. Brandt, and A. D. Vethaak. 2000. «Health Effects of Endocrine-Disrupting Chemicals on Wildlife, With Special Reference to the European Situation». Crit Rev Toxicol, vol. 30, no. 1, p. 71-133.
- WALSH, L. P. and D. M. Stocco. 2000. «Effects of Lindane on Steroidogenesis and Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression». Biol Reprod, vol. 63, no. 4, p. 1024-33.
- WARITZ, R. S., M. Steinberg, F. K. Kinoshita, C. M. Kelly, and W. R. Richter. 1996. «Thyroid Function and Thyroid Tumors in Toxaphene-Treated Rats». Regul Toxicol Pharmacol, vol. 24, no. 2 Pt 1, p. 184-92.
- WARNER, R.R. 1997. «Sperm Allocation in Coral Reef Fishes; Strategies for Coping with Demands on Sperm Production.» Bioscience, vol. 47, no. 9, p. 561-564.
- WEBER, L. P., R. L. Hill Jr, and D. M. Janz. 2003. «Developmental Estrogenic Exposure in Zebrafish (Danio Rerio): II. Histological Evaluation of Gametogenesis and Organ Toxicity». Aquat Toxicol, vol. 63, no. 4, p. 431-46.
- WEIR, H. K., L. D. Marrett, N. Kreiger, G. A. Darlington, and L. Sugar. 2000. «Pre-Natal and Peri-Natal Exposures and Risk of Testicular Germ-Cell Cancer». Int J Cancer, vol. 87, no. 3, p. 438-43.
- WHITE, P. A. and J. B. Rasmussen. 1998. «The Genotoxic Hazards of Domestic Wastes in Surface Waters». Mutat Res, vol. 410, no. 3, p. 223-36.
- WHITE, R., S. Jobling, S. A. Hoare, J. P. Sumpter, and M. G. Parker. 1994. «Environmentally Persistent Alkylphenolic Compounds Are Estrogenic». Endocrinology, vol. 135, no. 1, p. 175-82.
- WILLINGHAM, E. 2004. «Endocrine-Disrupting Compounds and Mixtures: Unexpected Dose-Response». Arch Environ Contam Toxicol, vol. 46, no. 2, p. 265-9.
- WILSON, A. G., D. C. Thake, W. E. Heydens, D. W. Brewster, and K. J. Hotz. 1996. «Mode of Action of Thyroid Tumor Formation in the Male Long-Evans Rat Administered High Doses of Alachlor». Fundam Appl Toxicol, vol. 33, no. 1, p. 16-23.
- WONG, C., W. R. Kelce, M. Sar, and E. M. Wilson. 1995. «Androgen Receptor Antagonist Versus Agonist Activities of the Fungicide Vinclozolin Relative to Hydroxyflutamide». J Biol Chem, vol. 270, no. 34, p. 19998-20003.

- WOODWARD, A.R., M.L. Jennings, H.F. Percival, and C.T. Moore. 1993. Low Clutch Viability of American Alligators on Lake Apopka.» Florida Sci, vol. 56, no. 1, p. 52-63.
- WU, C., R. Patino, K. B. Davis, and X. Chang. 2001. «Localization of Estrogen Receptor Alpha and Beta RNA in Germinal and Nongerminal Epithelia of the Channel Catfish Testis». Gen Comp Endocrinol, vol. 124, no. 1, p. 12-20.
- XIA, Z., W. L. Gale, X. Chang, D. Langenau, R. Patino, A. G. Maule, and L. D. Densmore. 2000. «Phylogenetic Sequence Analysis, Recombinant Expression, and Tissue Distribution of a Channel Catfish Estrogen Receptor Beta». Gen Comp Endocrinol, vol. 118, no. 1, p. 139-49.
- XIONG, F., D. Liu, H. P. Elsholtz, and C. L. Hew. 1994. «The Chinook Salmon Gonadotropin II Beta Subunit Gene Contains a Strong Minimal Promoter With a Proximal Negative Element». Mol Endocrinol, vol. 8, no. 6, p. 771-81.
- YADETIE, F. and R. Male. 2002. «Effects of 4-Nonylphenol on Gene Expression of Pituitary Hormones in Juvenile Atlantic Salmon (*Salmo Salar*)». Aquat Toxicol, vol. 58, no. 1-2, p. 113-29.
- YADETIE, F., A. Arukwe, A. Goksoyr, and R. Male. 1999. «Induction of Hepatic Estrogen Receptor in Juvenile Atlantic Salmon in Vivo by the Environmental Estrogen, 4-Nonylphenol». Sci Total Environ, vol. 233, no. 1-3, p. 201-10.
- YAGER, J. D. and J. G. Liehr. 1996. «Molecular Mechanisms of Estrogen Carcinogenesis». Annu Rev Pharmacol Toxicol, vol. 36, p. 203-32.
- YAMAMOTO, K. and Y. Nagahama. 1969. «Ultrastructure and Reproductive Function of the Adenohypophysis in Teleostei». Horumon To Rinsho, vol. 17, no. 6, p. 512-21.
- YIN, G. G., R. S. Kookana, and Y. J. Ru. 2002. «Occurrence and Fate of Hormone Steroids in the Environment». Environ Int, vol. 28, no. 6, p. 545-51.
- YOKOTA, H., N. Miyashita, and A. Yuasa. 2002. «High Glucuronidation Activity of Environmental Estrogens in the Carp (*Cyprinus Carpio*) Intestine». Life Sci, vol. 71, no. 8, p. 887-98.
- YOU, L., M. Sar, E. Bartolucci, S. Ploch, and M. Whitt. 2001. «Induction of Hepatic Aromatase by P,p'-DDE in Adult Male Rats». Mol Cell Endocrinol, vol. 178, no. 1-2, p. 207-14.
- ZHANG, Z., B. Maier, R. J. Santen, and R. X. Song. 2002. «Membrane Association of Estrogen Receptor Alpha Mediates Estrogen Effect on MAPK Activation». Biochem Biophys Res Commun, vol. 294, no. 5, p. 926-33.
- ZHOU, T., M. M. Taylor, M. J. DeVito, and K. M. Crofton. 2002. «Developmental Exposure to Brominated Diphenyl Ethers Results in Thyroid Hormone Disruption». Toxicol Sci, vol. 66, no. 1, p. 105-16.

ZHU, Y., C. D. Rice, Y. Pang, M. Pace, and P. Thomas. 2003. «Cloning, Expression, and Characterization of a Membrane Progestin Receptor and Evidence It Is an Intermediary in Meiotic Maturation of Fish Oocytes». Proc Natl Acad Sci U S A, vol. 100, no. 5, p. 2231-6.

ZILLIOUS, E.J., I.C. Johnson, Y. Kaparissis, C.D. Metcalfe, J.V. Wheat, S.G. Ward, and H. Liu. 2001. «The Sheepshead Minnow as an In Vivo Model for Endocrine Disruption in Marine Teleosts: A Partial Life-Cycle Test with 17 α -Ethinylestradiol.» Environ Toxicol Chem, vol. 20, no. 9, p. 1968-1978.

ZWIJSEN, R. M., R. S. Buckle, E. M. Hijmans, C. J. Loomans, and R. Bernards. 1998. «Ligand-Independent Recruitment of Steroid Receptor Coactivators to Estrogen Receptor by Cyclin D1». Genes Dev, vol. 12, no. 22, p. 3488-98.

