

Université du Québec
INRS-Institut Armand-Frappier

**ÉVALUATION DE L'EXPRESSION DES DÉIODINASES COMME
BIOMARQUEURS MOLÉCULAIRES D'UNE MODULATION DES
HORMONES THYROÏDIENNES CHEZ LE DORÉ JAUNE (*SANDER
VITREUS*)**

Par
Michelle Picard-Aitken

Mémoire présenté
pour l'obtention
du grade de Maître ès sciences (M.Sc.)
en sciences expérimentales de la santé

Jury d'évaluation

Président du jury et examinateur interne	Patrick J. Devine, INRS-Institut Armand-Frappier
Examineur interne	Jocelyne Pellerin, Université du Québec à Rimouski
Directeur de recherche	Daniel G. Cyr, INRS-Institut Armand-Frappier

Tous droits réservés de Michelle Picard-Aitken, 2006

Résumé

Des délais de 3-4 ans ont été observés dans la maturation sexuelle des dorés jaunes femelles (*Sander vitreus*) exposées à des modulateurs endocriniens (ME) dans la Rivière des Outaouais. En raison du rôle que jouent les hormones thyroïdiennes (HT) dans l'initiation de la maturation ovarienne des poissons, un dérèglement des HT était alors suggéré. Le doré jaune est un grand prédateur, et représente ainsi un nouveau modèle d'étude des HT chez les poissons.

Les objectifs de cette étude étaient de déterminer si les taux d'HT étaient modulés chez les dorés jaunes immatures exposés aux ME dans la Rivière des Outaouais, et de développer un nouveau biomarqueur moléculaire, en clonant et en mesurant l'expression hépatique des déiodinases. Deux déiodinases, les types I et II (D1, D2) convertissent la pro-hormone thyroxine (T_4) en hormone active triiodothyronine (T_3), tandis que la déiodinase de type III (D3) inactive ces deux hormones.

Les dorés jaunes immatures ont été capturés à Rivière Blanche, situé en aval des émissaires des effluents municipaux d'Ottawa et de Gatineau, et à Plaisance, en aval des effluents d'usines de pâtes et papier, ainsi qu'à un site de référence (Deep River). Le taux plasmatique de T_4 était plus du double chez les dorés jaunes de Plaisance, tandis que les taux de T_3 étaient plus élevés d'un facteur de 1,5 aux deux sites en aval, comparativement à ceux de Deep River. De plus, le ratio molaire de $T_3:T_4$ était diminué de 50% chez les individus pêchés à Plaisance. Les trois déiodinases ont ensuite été clonées et localisées dans les tissus du doré jaune, et leur expression a été évaluée dans le foie des individus de la Rivière des Outaouais. La seule différence observée fut à Rivière Blanche, où le taux hépatique d'ARNm de D2 chez le doré jaune était plus élevé que celui des poissons des autres sites. Les résultats de ce nouveau biomarqueur moléculaire diffèrent de ce qui serait attendu selon le mode de régulation des déiodinases par la T_3 présenté dans la littérature, et suggèrent que d'autres paramètres doivent être évalués afin de cibler l'effet des ME dans l'environnement sur la cascade des HT des poissons. Par contre, le site de Plaisance se

démarque au niveau de la modulation des HT, ce qui suggère que les effluents des usines de pâtes et papier pourraient être responsables de cet effet, et contribuer au retard dans la maturation sexuelle des femelles. Ces travaux mettent en exergue l'intérêt d'étudier le système thyroïdien du doré jaune en tant que modèle de grand prédateur, et présentent les déiodinases comme nouvel outil d'étude chez cette espèce.



Étudiant

Directeur de recherche

Remerciements

Avant tout, ce mémoire n'aurait jamais vu le jour sans Daniel Cyr. Il m'a accueilli dans son équipe sans réserves et m'a généreusement offert l'accès de son vaste savoir scientifique, ainsi que des conseils de navigation pour les eaux houleuses de la recherche. Il m'a d'autant plus encouragé à découvrir et dépasser mes limites dans le labo, dans les congrès et sur le terrain.

Ce projet a aussi bénéficié de l'apport de collaborateurs de choix et amateurs de pêche : David Marcogliese, Henri Fournier, Richard Pariseau, ainsi que de leurs formidables équipes. Merci infiniment à Julie Dufresne et Mary Gregory de m'avoir formée, guidée et d'avoir ensuite accepté que je partage mon expertise avec eux.

Un beau gros merci à tous mes consoeurs et confrères des réunions de lab : Johanna, Valérie, Ben, Pan, Evemie, Alexandra, Stéphanie, Aurore, Isabelle et Noël. Votre soutien, scientifique ou autre, a rendu mon séjour à l'IAF plus qu'agréable et j'en garde des souvenirs hors-prix. Cela va de même pour les autres professeurs, tous les étudiants et le personnel de soutien. Je vous laisse la tâche d'élire une nouvelle « reine des potins » et je vous souhaite un déménagement serein vers Laval.

Je ne peux négliger de remercier mes amis « externes » qui ont été très nombreux à écouter (souvent au prix d'un thé) le récit de mes succès et de mes déceptions scientifiques. Je note tout particulièrement les merveilleux colocs avec qui j'ai habité lors de cette aventure : Wendy, Jessica, Steve et Claudine.

Je réserve mes plus tendres remerciements à toute ma famille (immédiate et étendue), du petit Zachary au grand Press, mais surtout et avant tout mes parents Paulette et Andrew – pour tellement de choses mais particulièrement pour leur sagesse, leur écoute et leur foi inébranlable en mes capacités, mes grand-parents – de m'avoir appris le cribbage, les règles du tennis et le secret du gâteau au zucchini, et mon frère André, de m'avoir légué sa joie de vivre et son sens de l'aventure. Je vous aime gros!

Je dédie ce mémoire à ma grand-mère, Rita Picard, qui est décédée en mai 2005, et qui m'a appris que l'amour est le plus beau de tous les cadeaux.

Table des matières

Résumé.....	iii
Remerciements	v
Table des matières	vii
Liste des figures	ix
Liste des tableaux	ix
Liste des abréviations	x
Introduction	1
PREMIÈRE PARTIE : REVUE DE LA LITTÉRATURE	5
Chapitre I : <u>Le système thyroïdien chez les poissons</u>	6
1. <u>Biosynthèse, régulation et transport</u>	6
1.1. <u>La biosynthèse de la thyroxine</u>	6
2. <u>La régulation centrale</u>	8
3. <u>Le transport des HT</u>	11
3.1. <u>Transport sanguin</u>	11
3.2. <u>Transport membranaire</u>	13
4. <u>Régulation et métabolisme périphérique</u>	14
4.1. <u>Désiodation</u>	14
4.1.1. <u>Déiodinase de type 1 (D1)</u>	16
4.1.2. <u>Déiodinase de type 2 (D2)</u>	18
4.1.3. <u>Déiodinase de type 3 (D3)</u>	19
4.1.4. <u>Rôle des déiodinases dans la régulation périphérique des HT</u>	21
4.2. <u>Sulfatation et glucuronidation</u>	23
5. <u>Mécanismes d'action des HT</u>	25
6. <u>Fonctions physiologiques</u>	27
6.1. <u>Développement</u>	27
6.1.1. <u>Développement embryonnaire</u>	27
6.1.2. <u>Développement larvaire, métamorphose et saumonification</u>	29
6.2. <u>Croissance</u>	31
6.3. <u>Reproduction</u>	33
6.3.1. <u>Maturation sexuelle de la femelle</u>	33
6.3.2. <u>Maturation sexuelle du mâle</u>	35
6.3.3. <u>Interactions HT et GnRH, GTH, TRH et TSH</u>	37

Chapitre II : Les modulateurs endocriniens du système thyroïdien des poissons	39
7. <u>Les modulateurs endocriniens : une problématique mondiale</u>	39
7.1. <u>Implications pour la santé humaine</u>	40
8. <u>Sources et types de modulateurs thyroïdiens retrouvés en milieu aquatique</u>	41
8.1. <u>Métaux et polluants organiques persistants (POP)</u>	41
8.2. <u>Effluents municipaux</u>	44
8.3. <u>Effluents des usines de pâtes et papier</u>	45
9. <u>Mode d'action et biomarqueurs des modulateurs du système thyroïdien</u>	47
9.1. <u>Biomarqueurs du dérèglement de la cascade des HT chez les poissons</u>	48
9.1.1. <u>Biomarqueurs moléculaires</u>	50
Chapitre III : Le doré jaune et la Rivière des Outaouais	52
10. <u>Le doré jaune</u>	52
10.1. <u>Distribution et cycle biologique du doré jaune</u>	52
10.2. <u>Importance écologique et économique</u>	54
11. <u>La Rivière des Outaouais</u>	55
12. <u>Le doré jaune de la Rivière des Outaouais</u>	57
DEUXIÈME PARTIE : ARTICLE	59
Contribution de l'étudiante	60
Résumé en français	61
THYROID DISRUPTION IN WALLEYE (<i>SANDER VITREUS</i>) EXPOSED TO ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS: CLONING AND USE OF IODO-THYRONINE DEIODINASES AS MOLECULAR BIOMARKERS	63
TROISIÈME PARTIE : DISCUSSION ET CONCLUSIONS	103
Discussion et conclusions	105
Liste des références	112

Liste des figures

Figure 1 : Structure de la thyroxine (T ₄).....	7
Figure 2 : Modèle de la cascade des hormones thyroïdiennes.....	9
Figure 3 : La désiodation des hormones thyroïdiennes.	15
Figure 4 : Distribution du doré jaune en Amérique du nord.....	52
Figure 5 : Carte de la Rivière des Outaouais	55
Figure 6 : Relation entre l'âge et la maturité sexuelle du doré jaune de la Rivière des Outaouais	58

Liste des tableaux

Tableau 1 : Taux physiologiques d'HT plasmatiques ou sériques.....	12
Tableau 2 : Déiodinases clonées chez les poissons.....	17
Tableau 3 : Caractéristiques enzymatiques de D2	19
Tableau 4 : Caractéristiques enzymatiques de D3	20
Tableau 5 : Réponse des déiodinases de poisson à l'hyper- et l'hypothyroïdie	22
Tableau 6 : Usines de pâtes et papier déversant leur effluents dans la Rivière des Outaouais	56

Liste des abréviations

11-kétotestotérone	11-KT
acide acétylsalicylique	ASA
AMP cyclique	AMPc
ARN messenger	ARNm
aurothioglucose	ATG
biphényles polychlorés	BPC
bisphénol A	BPA
constante de Michaelis-Menten	K _m
cytochrome P 4501A	CYP1A
déiodinase de type 1	D1
déiodinase de type 2	D2
déiodinase de type 3	D3
désiodation de l'anneau externe	ORD
désiodation de l'anneau interne	IRD
dihydrotestérone	DHT
3,3'-diiodothyronine	T ₂
dithiothreitol	DTT
effluents d'usine de pâte de sulfate blanchie	BKME
Énergie atomique du Canada limitée	EACL
17β-estradiol	E ₂
éthynyloestradiol	EE2
facteur de croissance insulino-mimétique de type I	IGF-I
hormone de stimulation folliculaire	FSH
3β-hydroxystéroïde déshydrogénase	3β-HSD
gonadotrophine	GTH (GTH _I et GTH _{II})
Gouvernement du Québec, Ministère de l'environnement et de la faune	GQ-MEF
hormone d'induction de la maturation	MIH
hormone de croissance	GH
hormone de libération de la corticotrophine	CRH
hormone de libération des gonadotrophines	GnRH
hormones thyroïdiennes	HT
hydrocarbures aromatiques polycycliques	HAP
iodoacétate	Iac
lutéostimuline	LH
méthimazole	MMI
Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune	MRNF
modulateurs endocriniens	ME
4-nonylphénol	NP
Ontario	ON

pentachlorophénol	PCP
phosphodiesterase	PDE
polluants organiques persistants	POP
<i>polybrominated diphenyl ethers</i>	PBDE
prépro-TRH	ppTRH
6-n-propyl-2-thiouracil	PTU
Québec	QC
radioimmunoessai	RIA
récepteur aryl hydrocarbon	Arh
récepteur de la TSH	TSHR
récepteur X des rétinoïdes	RXR
récepteurs des HT	TR (TR α et TR β)
sélénocystéine	Sec
séquence d'insertion de la séléocystéine	SECIS
<i>sodium/iodide symporter</i>	NIS
sous-unité β de la TSH	TSH β
sulfotransférase	ST
testostérone	T
thyrolibérine (ou hormone de libération de la thyroestimuline)	TRH
thyroestimuline	TSH
thyroglobuline	TG
<i>thyroid peroxidase</i>	TPO
<i>thyroid response element</i>	TRE
thyroxine	T ₄
<i>thyroxine-binding globulin</i>	TBG
transthyréline (ou préalbumine)	TTR
triiodothyronine	T ₃
triiodothyronine inverse	rT ₃
uridine diphospho-glucuronyl transférase	UDPGT
vitellogénine	VTG

Introduction

Depuis plus d'une dizaine d'années, la problématique des modulateurs endocriniens (ME) inquiète les scientifiques, le public et les législateurs. Les ME, dont plusieurs sont présents dans l'environnement, sont des composés qui perturbent le fonctionnement normal du système endocrinien. Les ME les plus connus sont les xénoestrogènes, qui miment l'action de l'estradiol. En revanche, les androgènes et les hormones thyroïdiennes (HT) sont aussi sensibles à de nombreux contaminants retrouvés de façon ubiquitaire dans l'environnement, notamment dans les écosystèmes aquatiques.

Les HT jouent un rôle essentiel dans de nombreux processus physiologiques des vertébrés. Chez les mammifères, ils dirigent le développement neuronal du fœtus et du nouveau-né, et sont impliqués dans le métabolisme, la croissance et la reproduction. Les HT dirigent la métamorphose des amphibiens, et servent d'intermédiaires obligatoires dans le contrôle photopériodique de la reproduction chez les oiseaux. Du côté des poissons, les HT seraient surtout actifs au niveau du développement, de la croissance et de la reproduction. Par exemple, la saumonification, la métamorphose des poissons plats et la maturation sexuelle sont perturbés en cas d'hypo- ou d'hyperthyroïdie. Les poissons sont sensibles à de nombreux ME, dont ceux qui affectent les HT. Ils ont donc maintes fois démontré leur utilité dans l'étude des ME, à la fois dans un contexte expérimental et comme sentinelles dans l'environnement.

La présence de ME dans la Rivière des Outaouais est indiquée par des travaux antérieurs du laboratoire, ainsi que par la présence de sources reconnues de ME, telles que les usines de traitement des eaux municipales et de pâtes et papier. Dans le bassin de la Rivière des Outaouais, ces usines sont concentrées aux environs des villes d'Ottawa et de Gatineau. Des suivis des populations du doré jaune (*Sander vitreus*) ont relevé des retards de 3-4 ans dans la maturation des femelles en aval des villes d'Ottawa et de Gatineau, comparativement à des sites de référence. En raison du rôle

que jouent les HT dans la maturation sexuelle des poissons, il a été proposé que le retard observé pourrait être relié à un dérèglement des HT chez le doré jaune.

Dans le but d'étudier l'effet d'une exposition aux ME sur les HT du le doré jaune, il est nécessaire de bien comprendre la cascade des HT chez les poissons. Une bonne connaissance de cette cascade guide alors le choix des biomarqueurs, afin de choisir ceux qui seraient les plus sensibles et les plus représentatifs. La revue de littérature qui se trouve en première partie de ce mémoire discute en détail du système thyroïdien des poissons. Les formes des HT, leur biosynthèse et leur régulation seront présentés, particulièrement en ce qui a trait aux déiodinases. Les déiodinases sont une famille de trois enzymes qui participent à la régulation périphérique des HT, c'est-à-dire au niveau des tissus extra-thyroïdiens. Ces enzymes activent ou désactivent les HT selon les besoins de l'organisme, et sont d'ailleurs régulées au niveau transcriptionnel par les HT chez le poisson. Le premier chapitre de la revue de littérature présentera aussi les mécanismes d'action des HT et leur divers rôles physiologiques, particulièrement au niveau du développement, de la croissance et de la reproduction des poissons.

Le deuxième chapitre de cette revue comprend un survol des différents ME susceptibles de perturber le bon fonctionnement des HT. Les modes d'actions de ces ME seront mis en relief avec les différents biomarqueurs qui sont couramment utilisés pour mesurer les effets de ME sur la cascade des HT. De nouveaux outils et biomarqueurs sont préconisés afin d'identifier quels ME agissent sur les HT, ainsi que leurs mécanismes d'action. Entre autres, l'expression des déiodinases est suggérée comme biomarqueur moléculaire d'une perturbation des HT.

Finalement, le cycle biologique du doré jaune (*Sander vitreus*) sera présenté, ainsi qu'une brève description de la Rivière des Outaouais, afin d'introduire la problématique des travaux de recherche.

La deuxième partie de ce mémoire contient le manuscrit de l'article issu des travaux de recherche de l'auteur. Les objectifs de ces travaux étaient de déterminer si les HT du doré jaune étaient modulées en présence de contaminants environnementaux dans la Rivière des Outaouais, de cloner les trois déiodinases chez le doré jaune, et d'évaluer si l'expression hépatique des déiodinases pouvait servir de biomarqueur

moléculaire chez les dorés jaunes de la Rivière des Outaouais. Cet article a été soumis au *Journal of Molecular Endocrinology*. La contribution qu'apporte cet article aux travaux cités dans la revue de littérature sera soulignée dans la discussion de l'article et dans la conclusion de ce mémoire.

PREMIÈRE PARTIE

REVUE DE LA LITTÉRATURE

Chapitre I

Le système thyroïdien chez les poissons

Les premières études sur la régulation du système thyroïdien des poissons remontent aux années 50. Au cours des années subséquentes, il apparaît que la biosynthèse, la régulation et le métabolisme des hormones thyroïdiennes (HT) sont, d'un point de vue général, hautement conservés chez les vertébrés. Par contre, malgré de nombreuses similarités avec ce qui est observé chez les mammifères, la cascade des HT chez les poissons présente certaines caractéristiques distinctes (revu en détail par Eales et Brown, 1993). À moins d'indication contraire, la plupart des travaux cités ci-dessous ont été effectués sur les poissons, principalement sur les téléostéens.

1. Biosynthèse, régulation et transport

1.1. La biosynthèse de la thyroxine

La thyroxine (T_4) est produite par la glande thyroïde, dont les follicules sont dispersés dans la région ventrale branchiale du poisson (Raine et Leatherland, 2000, Einarsdóttir *et al.*, 2006). Le follicule thyroïdien est composé d'une couche simple de cellules épithéliales, nommées thyrocytes, qui englobent le colloïde de la lumière, où a lieu la biosynthèse de T_4 . L'autre forme principale de HT, la triiodothyronine (T_3), peut aussi être synthétisée par la glande thyroïde mais serait plutôt formée à partir de la T_4 dans les tissus périphériques chez les poissons (Eales et Brown, 1993). La production et la régulation de la T_3 seront décrites en plus de détails dans la section 4.

La T_4 est une molécule dérivée d'un acide aminé, la tyrosine. Comme son nom l'indique, la T_4 comporte quatre ions d'iodures greffés à deux cycles phénols ; ces derniers sont reliés par un pont diphenyl-éther (Figure 1). Ainsi, la biosynthèse des HT nécessite un apport adéquat en iodure, qui provient de la nourriture mais principalement de l'eau, absorbé via un transport actif au niveau des branchies (Eales

et Brown, 1993). Les thyrocytes contrôlent l'entrée d'iode dans la glande thyroïde par une pompe spécialisée (*sodium/iodide symporter*, NIS) située à la membrane basolatérale (Dohan et Carrasco, 2003). Le NIS n'a pas été caractérisé chez les poissons, mais les follicules de ces derniers sont sensibles au perchlorate, qui est un antagoniste du transport d'iode par le NIS (Crane *et al.*, 2005).

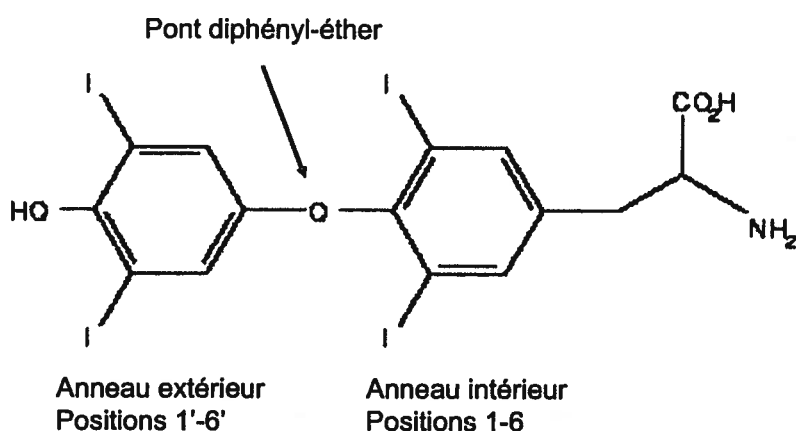


Figure 1 : Structure de la thyroxine (T₄)

Les iodures sont aux positions 3' et 5' de l'anneau extérieur et aux positions 3 et 5 de l'anneau intérieur. (Modifié de Eales et Brown, 1993)

À partir du cytoplasme des thyrocytes, l'iode est transloqué vers le colloïde, où il est oxydé et couplé à la thyroglobuline (TG). La TG est une grosse protéine (> 200 kD) sécrétée par les cellules folliculaires dans la lumière, et qui comporte plusieurs résidus tyrosines (Brisson *et al.*, 1974). Sous la double action d'une peroxydase (*thyroid peroxidase*, TPO) ces résidus sont iodés pour former des iodotyrosines et sont ensuite reliés par un pont éther pour former les précurseurs des hormones thyroïdiennes. Bien que les études sur la TG chez les téléostéens remontent à il y a plus de trente ans, de travaux récents confirment que l'iode est incorporé dans une protéine identifiée comme la TG chez la lamproie (Manzon et Youson, 2002). De surcroît, la présence de la TPO est indiquée par des tests d'activité enzymatique chez les poissons (Chakraborti *et al.*, 1983 ; Eales et Brown, 1993). Le gène de la TPO a été cloné chez deux espèces d'ascidies, des invertébrés marins (Ogasawara *et al.*, 1999) mais reste à être étudié chez les poissons.

La TG iodée est stockée dans le colloïde jusqu'à ce qu'elle soit reprise dans les thyrocytes par pinocytose. Les vacuoles ainsi formées fusionnent avec des lysosomes contenant des protéases, qui lysent la TG et libèrent des iodotyrosines et la T₄. La T₄ diffuse alors dans le sang, tandis que les iodotyrosines sont désiodées et recyclées par la cellule. La T₄ est la principale forme d'HT sécrétée chez les poissons, particulièrement les téléostéens (Eales et Brown, 1993), bien que plusieurs indications suggèrent que la glande thyroïde de l'esturgeon sécrète de la T₃ (Plohman *et al.*, 2002a, 2002b).

2. La régulation centrale

À l'instar des autres vertébrés, la régulation centrale de la T₄ chez les poissons passe par l'axe hypothalamo-hypophysaire (Eales et Brown, 1993) (Figure 2). Selon le modèle classique, le premier régulateur de cet axe est la thyroïdolibérine (aussi appelée « hormone de libération de la thyroestimuline » ; *thyroid releasing hormone*, TRH), une petite protéine clivée de la prépro-TRH (ppTRH) produite par l'hypothalamus du poisson (Hamano *et al.*, 1996 ; Ohide *et al.*, 1996 ; Aoki *et al.*, 2005). Chez les mammifères, la TRH agit sur l'adénohypophyse, où elle stimule la production de thyroestimuline (*thyroid stimulating hormone*, TSH) par les cellules thyroïdées. Par contre, chez les vertébrés inférieurs, le rôle exact de la TRH demeure ambigu (De Groef *et al.*, 2006). Chez les poissons, la TRH stimulerait la sécrétion d'hormones telles la prolactine et l'hormone de croissance (*growth hormone*, GH) mais pas la TSH ou la T₄ (Melamed *et al.*, 1995 ; Kabagu *et al.*, 1998). La TRH induit l'expression de l'ARNm de la sous-unité β de la TSH chez au moins deux espèces de poissons (Chatterjee *et al.*, 2001, Han *et al.*, 2004). De plus, des lésions au niveau de l'hypothalamus démontrent que les facteurs hypothalamiques auraient plutôt un effet inhibiteur sur la sécrétion des HT (Sukumar *et al.*, 1997).

Plusieurs facteurs ont été proposés en tant que libérateurs et inhibiteurs (p. ex., somatostatine, dopamine) de la TSH (Larsen *et al.*, 1998), dont l'innervation directe des cellules thyroïdées par les neurones hypothalamiques (Eales et Brown, 1993). L'hormone de libération de la corticotrophine (*corticotropin releasing hormone* ; CRH) et deux peptides semblables à la CRH stimulent la sécrétion de la TSH de l'adénohypophyse du saumon coho, tandis que cette stimulation est bloquée par un

antagoniste de la CRH, le α -helical CRF (Larsen *et al.*, 1998). L'effet parallèle de la CRH sur les cascades thyroïdienne et surrénale serait régulé au niveau moléculaire par des récepteurs spécifiques à la CRH exprimés dans les différents types cellulaires de l'adénohypophyse (De Groef *et al.*, 2006).

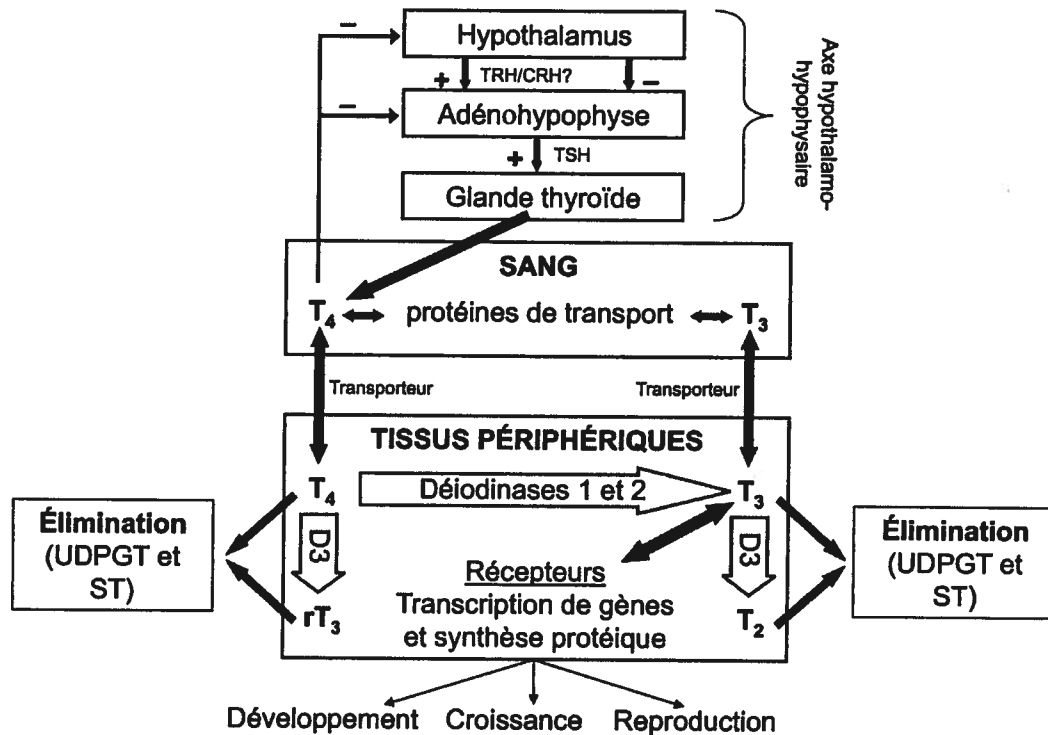


Figure 2 : Modèle de la cascade des hormones thyroïdiennes
(Modifié de Eales *et al.*, 1999)

Contrairement à la fonction ambiguë de la TRH, le rôle clé de la TSH dans la sécrétion de T_4 est bien connu chez les poissons (Eales et Brown, 1993) (Figure 3). La TSH est un hétérodimère composé de deux glycoprotéines : la sous-unité α est commune aux gonadotrophines, tandis que la sous-unité β est propre à la TSH (TSH β) et est régulée de façon indépendante à la protéine α . La TSH β de plusieurs poissons a été clonée et son expression a été localisée dans l'adénohypophyse, ainsi que dans les gonades de certaines espèces (voir section 6.3.3.), et plus rarement dans le foie et les reins (par ex., Ito *et al.*, 1993 ; Salmon *et al.*, 1993 ; Martin *et al.*, 1998 ; Yoshiura *et al.*, 1999 ; Chatterjee *et al.*, 2001 ; Herzog *et al.*, 2003 ; Wang *et al.*, 2004 ; Han *et al.*, 2004).

Une fois sécrétée par les thyrotropes, la TSH circule jusqu'à la glande thyroïde où elle se lie à son récepteur (TSHR) qui est couplé à une protéine G pour stimuler à la fois la synthèse et la sécrétion de T₄. La TSH provoque plusieurs changements dans le follicule thyroïdien qui ont comme effet d'augmenter le taux de T₄ dans le sang, bien que cette augmentation varie selon l'espèce, la saison et la température (Eales et Brown, 1993). Une injection de TSH provoque une hausse de l'entrée d'iodure dans les cellules thyrotropes, ainsi que de l'activité de la TPO (Eales et Brown, 1993). Des coupes histologiques confirment que sous l'action de la TSH, la hauteur des thyrocytes s'accroît, le nombre de follicules augmente, leur forme et leurs caractéristiques ultrastructurales sont modifiées (Smith et Grau *et al.*, 1986 ; Nishioka *et al.*, 1987 ; Raine et Leatherland 2000). De plus, la TSH induit une plus grande formation de vacuoles qui apparaissent à la surface apicale des cellules puisque la micropinocytose normale est remplacée par une macropinocytose ; ceci entraîne une diminution du volume du colloïde (Nishioka *et al.*, 1987). Ainsi, une injection de TSH stimule la sécrétion de HT, tel que confirmé par un marquage accru de la T₄ (et de la T₃, tous deux liés à la TG) dans les vacuoles pinocytosées par les thyrocytes de medaka et de truite arc-en-ciel, observé par immunolocalisation (Raine et Leatherland, 2000).

La boucle de rétrocontrôle négatif des HT est menée par la T₄, qui inhibe l'expression de TSH (Pradet-Balade *et al.*, 1997 ; Yoshiura *et al.*, 1999 ; Chatterjee *et al.*, 2001, Han *et al.*, 2004) via un élément de réponse aux HT sur le promoteur de TSHβ (Sohn *et al.*, 1999b), et qui agit parallèlement sur les facteurs hypothalamiques impliqués dans la libération de la TSH (Brown et Eales, 1993) (Figure 3). La supplémentation de T₃ par voie alimentaire, par implant ou par injection peut aussi provoquer un rétrocontrôle de la TSH (Larsen *et al.*, 1997 ; Moriyama *et al.*, 1997 ; Pradet-Balade *et al.*, 1997, 1999) mais la T₃ ne provoque pas habituellement une modification significative du taux de T₄ via l'axe hypothalamo-hypophysaire *in vivo* (Eales et Brown, 1993 ; Eales *et al.*, 1999 ; Kang et Devlin, 2003). Par contre, une exposition à la T₃ aurait un effet sur la cyclicité quotidienne de T₄ (Leiner et MacKenzie, 2003). Finalement, lorsque l'hypothyroïdie est induite chez le poisson, par exemple par traitement aux goitrogènes tel le méthimazole ou à la thiourée, le rétrocontrôle est relâché et la TSH augmente de façon marquée (Larsen *et al.*, 1997 ; Moriyama *et al.*, 1997 ; Pradet-Balade *et al.*, 1997).

Étant donné la multitude de rôles que jouent les HT (voir la section 6), il n'est pas surprenant que la cascade des HT interagisse à plusieurs niveaux avec d'autres systèmes endocriniens. En plus du lien proposé avec les surrénales (Kühn *et al.*, 1998), les hormones impliquées dans le développement des poissons, telles la GH et la prolactine, peuvent aussi affecter la régulation des taux d'HT (Eales et Brown, 1993). Des interrelations existent aussi avec les hormones du système reproducteur (Cyr et Eales, 1996), qui seront présentées dans la section 3.3. Une discussion détaillée de toutes ces interactions dépasse la capacité de cette revue mais il serait illusoire d'étudier le système thyroïdien des poissons sans reconnaître la complexité des facteurs qui peuvent interagir avec ce système.

3. Le transport des HT

3.1. Transport sanguin

Les HT, étant très peu hydrosolubles, doivent se lier à des protéines de transport afin d'assurer leur distribution par le sang jusqu'aux organes cibles (Mendel *et al.*, 1987). Le pool d'hormone lié de façon réversible à ces protéines, soit plus de 99% du taux total de T₄ et de T₃, agit aussi en tant que réservoir et tampon dans le maintien de l'homéostasie des HT (Eales et Shostak, 1985 ; Eales et Brown, 1993). Notons que les taux totaux (libre et lié) d'HT plasmatiques sont généralement plus élevés chez les poissons marins que les espèces d'eau douce (voir Tableau 1).

Les principales protéines plasmatiques se liant aux HT chez les poissons sont l'albumine, la transthyrétine (TTR, aussi nommée préalbumine) et des lipoprotéines telles que la vitellogénine (VTG) (Cyr et Eales, 1989a, 1992 ; Babin, 1992 ; Richardson *et al.*, 1994 ; Santos et Power, 1999 ; Yamauchi *et al.*, 1999 ; Monteverdi et Di Giulio, 2000). Ces protéines sont principalement exprimées par le foie (Funkenstein *et al.*, 1999, 2000 ; Santos et Power, 1999). Leur expression et leur contribution au transport des HT varie de façon considérable selon l'espèce, selon le rôle que jouent les HT lors de divers processus physiologiques ainsi qu'en réponse à une hausse de 17 β -estradiol (E₂) (Cyr et Eales, 1989a, 1992 ; Funkenstein *et al.*, 2000 ; Monteverdi et Di Giulio, 2000 ; Santos et Power, 1999 ; Yamauchi *et al.*, 1999 ; Richardson *et al.*, 2005). Les protéines de transport, dont la VTG, ont aussi été

impliquées dans l'incorporation des HT dans les œufs, ce qui concorde avec le rôle central que jouent les HT dans la croissance et le développement des poissons (Funkenstein *et al.*, 2000 ; Monteverdi et Di Giulio, 2000 ; Power *et al.*, 2001).

Tableau 1 : Taux physiologiques d'HT plasmatiques ou sériques.

Espèce	T ₄ (ng/ml)	T ₃ (ng/ml)	Référence
Espèces marines^a			
Sébaste (♀ vivipare)	16,4-119,3	-	Kwon <i>et al.</i> , 1999
<i>Sebastes inermis</i>			
Daurade	20-56,8	15-66,5	Cerdà-Reverter <i>et al.</i> , 1996 ; Power <i>et al.</i> , 2000
<i>Sparus auratus</i>			
Denté commun	10-50	10-30	Pavlidis <i>et al.</i> , 2000
<i>Dentex dentex</i>			
Bar	n.d.-40	5-18	Cerdà-Reverter <i>et al.</i> , 1996
<i>Dicentrarchus labrax</i>			
Morue	1-4	10-18	Cyr <i>et al.</i> , 1998
<i>Gadus morhua</i>			
Tambour rouge	2-18	12-24	Leiner <i>et al.</i> , 2000
<i>Sciaenops ocellatus</i>			
Espèces anadromes			
Saumon d'Atlantique	3-17	2-9	Eales <i>et al.</i> , 1991
<i>Salmo salar</i>			Morin <i>et al.</i> , 1993
Saumon coho (saumonification)	12,7-17,1	2-7	Sweeting <i>et al.</i> , 1994 ; Ebbesson, <i>et al.</i> , 1998
<i>Oncorhynchus kisutch</i>			
Espèces d'eau douce			
Truite arc-en-ciel	n.d.-9	0,5-10	Cyr <i>et al.</i> , 1988 ; Holloway et Leatherland, 1997
<i>Oncorhynchus mykiss</i>			
Tilapia	2-6	3-6,5	Van der Geyten <i>et al.</i> , 2001
<i>Oreochromis niloticus</i>			
Tilapia blackchin	2,18	5,69	Van der Geyten <i>et al.</i> , 2001
<i>Sarotherodon melanotheron</i>			
Mrigal	1,3-2,5	-	Roy <i>et al.</i> , 2000
<i>Cirrhinus mrigala</i>			
Choquemort	8,64	8,64	Zhou <i>et al.</i> , 2000
<i>Fundulus heteroclitus</i>			
Perchaude	15-50	0,8-6	Hontela <i>et al.</i> , 1995 ; Levesque <i>et al.</i> , 2003
<i>Perca flavescens</i>			
Perche	n.d.-15	n.d.-15	Bau et Parent, 2000
<i>Perca fluviatilis</i>			
Brochet	n.d.-14	2-7	Bau et Parent, 2000
<i>Esox lucius</i>			
Sandre	1-8	2-4	Bau et Parent, 2000
<i>Sander lucioperca</i>			
Brème	2-7	2-5	Bau et Parent, 2000
<i>Abramis brama</i>			
Chevesne	n.d.-15	n.d.-3	Bau et Parent, 2000
<i>Leuciscus cephalus</i>			
Perche grimpeuse	2-9	-	Chakraborti et Bhattacharya, 1984
<i>Anabas testudineus</i>			
Non-téléostéen			
Esturgeon jaune	0,2 (cultivé)	0,3 (cultivé)	Plohman <i>et al.</i> , 2002a
<i>Acipenser fulvescens</i>	n.d.-2,90 (en liberté)	n.d.-9,65 (en liberté)	

^a A moins d'indication contraire, ces taux ont été mesurés chez des juvéniles ou des adultes provenant d'une population contrôle ou échantillonnés à un site de référence.

La cascade des HT du poisson se démarque en plusieurs points des mammifères, entre autres par l'expression de VTG, qui peut aussi agir comme transporteur d'HT. De surcroît, le plus important transporteur de la T_4 chez l'humain, la *thyroxine-binding globulin* (TBG) n'est pas exprimé chez les poissons. De plus, des études de liaison des HT à la TTR de saumon coho et la daurade indiquent que cette protéine, un homotétramère de 60kD, a une affinité beaucoup plus grande pour la T_3 que pour la T_4 , à l'inverse de ce qui est observé chez les mammifères (Santos et Power, 1999 ; Yamauchi *et al.*, 1999), un effet qui est attribué aux différences de structure de la TTR des poissons, tel qu'évalué par cristallisation en comparaison avec la TTR de poule et d'humain (Eneqvist *et al.*, 2004).

Les HT sont aussi transportées dans le sang par les globules rouges (érythrocytes) : selon les espèces de poisson, entre 5 à 15% de la T_4 et entre 14 et 41% de la T_3 dans le sang se retrouve dans ces cellules (McLeese *et al.*, 1998). L'échange d'HT entre les érythrocytes et le milieu plasmatique étant très rapide pour T_3 (50% en 30-40 s) et plus lent pour T_4 (50% en 30 min), les globules rouges agissent donc comme les protéines de transport, servant de pool dynamique d'HT et tamponnant les perturbations du taux plasmatique de T_3 (McLeese *et al.*, 1998).

3.2. Transport membranaire

Seules les HT libres, c'est-à-dire celles qui ne sont pas liées à une protéine de transport, peuvent pénétrer dans les cellules, où elles induisent la rétroaction négative de l'axe hypothalamo-hypophysaire, se font activer ou inactiver, et exercent leurs nombreux effets physiologiques (Eales et Brown, 1993). Les HT, par leur nature liposoluble, peuvent diffuser directement à travers la membrane plasmique : environ 15% de la T_4 et 6-7% de la T_3 qui pénètre dans les hépatocytes de truite arc-en-ciel à des concentrations physiologiques s'y rendent par transport passif (Riley et Eales, 1993a, 1993b). La balance est incorporée par des transporteurs membranaires saturables sélectifs énergie-dépendants, qui ne sont pas modifiés par la concentration extracellulaire de Na^+ et qui fonctionnent probablement par endocytose (Riley et Eales, 1993a, 1993b). Les caractéristiques des transporteurs de T_3 et de T_4 ont plusieurs similarités entre elles mais certaines observations appuient l'hypothèse de

transporteurs distincts, ce qui permettrait aussi une régulation séparée de la quantité extra- et intracellulaire de ces deux hormones (Riley et Eales, 1993b). Un membre de la famille des transporteurs monocarboxylates, le MCT8, qui démontre un transport spécifique des HT, a été identifié dans plusieurs tissus du rat (Friesema *et al.*, 2003) mais aucune étude n'a jusqu'à maintenant confirmé si un transporteur analogue était actif chez les poissons.

4. Régulation et métabolisme périphérique

Bien que l'axe hypothalamo-hypophysaire contrôle la régulation centrale de la T_4 , les voies métaboliques périphériques jouent un rôle tout aussi important dans l'homéostasie des HT des poissons et assurent la régulation locale de la forme active des HT, la T_3 (Eales et Brown 1993 ; Eales *et al.*, 1999). Ces voies incluent donc l'activation des HT ainsi que l'inactivation des HT par leur désiodation et leur conjugaison à des groupements sulfates et à l'acide glucuronique. En concert avec l'échange de HT avec les protéines de transport, les érythrocytes et les tissus, ces voies métaboliques oeuvrent à maintenir l'homéostasie de l'état thyroïdien.

4.1. Désiodation

La T_3 est la forme bioactive des HT (voir section 2) ; par contre, la glande thyroïde sécrète la pro-hormone T_4 . Ainsi, la T_4 doit être convertie en T_3 dans les tissus périphériques, par la soustraction d'un ion iodure de l'anneau extérieur de la T_4 (*outer-ring deiodination*, ORD) (Figure 3). De plus, la désiodation de l'anneau interne (*inner-ring deiodination*, IRD) de T_4 et de T_3 , produisant des iodothyronines inactives (T_3 inverse (rT_3) et 3,3'-diiodothyronine (T_2)), ainsi que l'ORD de rT_3 , sont d'importantes voies métaboliques des HT et permettent de récupérer l'iodure des HT avant l'excrétion de ces dernières (revu par Eales *et al.*, 1999 ; Bianco *et al.*, 2002 ; Sutija et Joss 2006). Les déiodinases, aussi appelées désiodases, sont les enzymes responsables de la désiodation des HT.

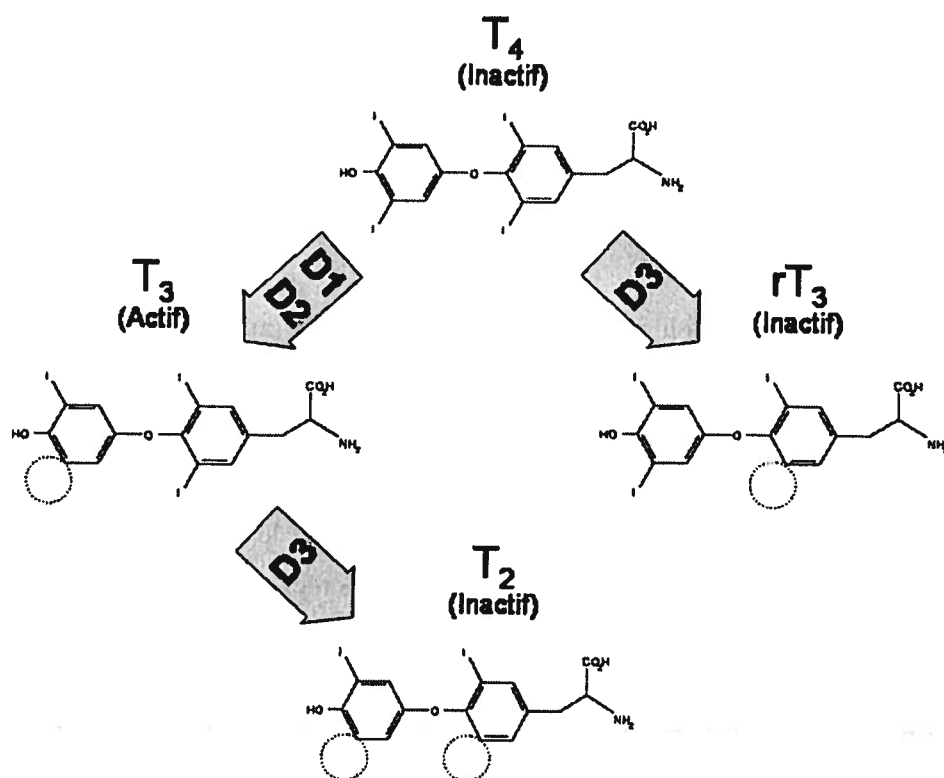


Figure 3 : La désiodation des hormones thyroïdiennes.

Les déiodinases de type 1 (D1) et de type 2 (D2) prélèvent l'iodure de la position 5' de l'anneau extérieur de la T₄, tandis que la déiodinase de type 3 (D3) prélève l'iodure de la position 5 de l'anneau intérieur. (Modifié de Brown *et al.*, 2004b)

Trois déiodinases sont présentes chez presque tous les vertébrés : les déiodinases de type 1 (D1; absente chez les dipneustes), de type 2 (D2) et de type 3 (D3), sont issues de trois gènes différents, catalysent soit l'ORD, l'IRD ou les deux, et sont caractérisées par leur profil enzymatique, dont une préférence de substrats (Eales *et al.*, 1999 ; Bianco *et al.*, 2002). Chez les poissons, comme chez les autres vertébrés, le site actif des trois déiodinases contient un résidu sélénocystéine (Sec), un acide aminé rare et essentiel à l'action catalytique de l'enzyme. En présence d'un cofacteur thiol, le sélénium forme un complexe réversible avec l'iodure et le libère de l'HT. La Sec est traduite par un codon UGA, qui indique habituellement la fin de la traduction. Une séquence d'insertion de la Sec (*SEC insertion sequence*, SECIS) doit être présente et former une boucle à l'extrémité 3' de l'ARN messager (ARNm) afin de recruter le complexe protéique qui permet à l'appareil ribosomal de traduire le codon UGA par la Sec (Bianco *et al.*, 2002). Toutes les séquences de déiodinases fonctionnelles clonées

jusqu'à présent, chez toutes les espèces, contiennent une SECIS, quoique différentes formes existent (Bianco *et al.*, 2002 ; Sutija et Joss, 2006). Récemment, il a été avancé que l'épissage alternatif de l'ARNm des déiodinases au niveau de la SECIS pourrait permettre une régulation tissu- ou stade-spécifique de l'activité de ces enzymes chez les poissons (Bres *et al.*, 2006 ; Sutija et Joss 2006).

Les déiodinases, de par leur rôle clé dans la régulation des HT (autant par l'activation et que par l'inactivation), ont été impliquées dans presque toutes les fonctions physiologiques des HT chez les vertébrés (voir section 3). Les déiodinases maintiennent l'homéostasie des taux d'HT plasmatiques dans l'ensemble des tissus périphériques qui échangent des HT avec le plasma, dont chez les poissons (García-G *et al.*, 2004 ; Van der Geyten *et al.*, 2005). Au niveau de la régulation centrale des HT, elles sont essentielles au rétrocontrôle de la TSH par la T_4 , qui doit être convertie en T_3 dans l'adénohypophyse par ORD, pour que T_3 puisse se lier au récepteur nucléaire des HT et réguler l'expression de TSH β (voir la section 1.2 et 2) (Bianco *et al.*, 2002). Elles régulent aussi les HT de manière tissu- et cellule-spécifique afin de favoriser et de diriger l'action des HT dans les processus de développement, de croissance, et de reproduction (voir section 3) (Bianco *et al.*, 2002), chez les poissons (voir section 3). À cet égard, leur rôle le plus connu est sans doute la régulation de la métamorphose des amphibiens (Brown, 2005).

Les déiodinases ont été étudiées en détail chez les poissons, à la fois au niveau enzymatique et moléculaire, et ce, principalement dans le cadre de la régulation périphérique de l'homéostasie des HT. De plus en plus d'études soulignent leur contribution à la régulation des fonctions physiologiques des HT, tel que décrit dans la section 3. La présente section discutera principalement des caractéristiques des déiodinases chez les poissons et de leur rôle dans la régulation périphérique des HT.

4.1.1. Déiodinase de type 1 (D1)

La D1 catalyse l'ORD, et peut aussi avoir une activité IRD chez les mammifères qui est très faible ou absente chez les poissons. Bien que la D1 fut la première déiodinase à être caractérisée et clonée chez les mammifères (Bianco *et al.*, 2002), sa présence

chez les poissons n'a pas été reconnue sans controverse, notamment puisqu'à l'inverse de mammifères, elle contribue très peu à la conversion de T_4 à T_3 sauf dans le cas d'une hypothyroïdie (Van der Geyten *et al.*, 2001, 2005). Chez le *Xenopus laevis*, D1 n'a été clonée qu'en 2006, et présente un profil d'expression restreint et une très faible activité dans les différents tissus sondés (Kuiper *et al.*, 2006)

Le substrat préférentiel de la D1 est la rT_3 , avec une constante de Michaelis-Menten (K_m) de 160-330 nM chez le tilapia (Mol *et al.*, 1993, 1997), de 180-200 nM chez la truite arc-en-ciel (Orozco *et al.*, 1997 ; Finnson *et al.*, 1999), de 1250 nM chez le tilapia bleu (Mol *et al.*, 1997, Mol *et al.*, 1998), de 84-420 nM chez le choquemort (Orozco *et al.*, 2000, 2003b), et de 800 nM chez la daurade (Klaren *et al.*, 2005). En plus des espèces nommées précédemment, l'activité de la D1 (ORD de rT_3) a été mesurée dans divers tissus du saumon de l'Atlantique (Eales *et al.*, 1993), du turbot (Mol *et al.*, 1998), de la plie canadienne (Adams *et al.*, 2000) et de l'esturgeon jaune (Plohman *et al.*, 2002b). Chez l'ensemble de ces espèces, les besoins de la D1 pour le dithiothreitol (DTT) (source de cofacteur thiol) sont faibles, étant généralement moins de 10 mM ; le DTT inhibe même l'activité de la D1 chez la daurade (Klaren *et al.*, 2005). À l'inverse de mammifères, son activité n'est peu ou pas inhibée par le 6-N-propyl-2-thiouracil (PTU) mais plutôt par l'aurothioglucose (ATG) et l'iodoacétate (IAc). La D1 a été clonée chez le tilapia, le choquemort, le poisson zèbre et la daurade (voir Tableau 2).

Tableau 2 : Déiodinases clonées chez les poissons^a

Espèce	D1	D2	D3
Tilapia	Sanders <i>et al.</i> , 1997	Van der Geyten <i>et al.</i> , 2001	Sanders <i>et al.</i> , 1999
<i>Oreochromis niloticus</i>			
Turbot	-	Marchand <i>et al.</i> , 2004	-
<i>Scophthalmus maximus</i>			
Truite arc-en-ciel	-	Sambroni <i>et al.</i> , 2001	Bres <i>et al.</i> , 2006
<i>Oncorhynchus mykiss</i>			
Choquemort	Orozco <i>et al.</i> , 2003b	Valverde-R <i>et al.</i> , 1997	-
<i>Fundulus heteroclitus</i>		(incomplet) ; Orozco <i>et al.</i> , 2002	
Poisson zèbre	Thisse <i>et al.</i> , 2003	Thisse <i>et al.</i> , 2003	-
<i>Danio rerio</i>			
Daurade	Klaren <i>et al.</i> , 2005	-	-
<i>Sparus auratus</i>			
Dipneuste australien	-	Sutija <i>et al.</i> , 2003	Sutija <i>et al.</i> , 2004
<i>Norceratus forsteri</i>			
Morue	-	-	Adams 1999
<i>Gadus morhua</i>			

^a ce tableau présente uniquement les séquences publiées

Son expression et/ou son activité se retrouvent surtout dans le rein et dans le foie de certaines espèces, puis dans l'intestin, le cœur, les gonades, les branchies, le cerveau, l'œil et la peau. D1 est aussi exprimée de manière stade- et tissu-spécifique (foie, intestin, rein) lors de l'embryogenèse du poisson zèbre (Thisse *et al.*, 2003).

4.1.2. Déiodinase de type 2 (D2)

La D2 catalyse uniquement l'ORD. Contrairement aux mammifères, elle assure presque toute la conversion périphérique de T_4 à T_3 chez les poissons (Eales et Brown, 1993 ; Eales *et al.*, 1999). Pour cette raison, c'est la déiodinase qui a reçu le plus d'attention chez les poissons. Elle est particulièrement active dans le foie des téléostéens, ou encore dans l'intestin des lamproies et des myxines (Eales *et al.*, 2000), tandis qu'elle joue plutôt un rôle d'approvisionnement local de T_3 dans certains tissus de mammifères (système nerveux central, adénohypophyse, tissus adipeux brun, placenta) (Bianco *et al.*, 2002).

L'activité de D2 a été caractérisée chez plusieurs espèces de poisson, tel que résumé dans le Tableau 3. Brièvement, selon des études de compétition, la D2 préfère la T_4 comme substrat, puis la rT_3 et la T_3 , quoique l'ORD de la T_3 est généralement négligeable. Chez les téléostéens, son K_m pour T_4 et rT_3 est faible (de l'ordre du nM), elle nécessite une concentration en DTT de 10-100 mM et elle est inhibée par l'ATG, moins par l'IAC et est insensible au PTU.

La D2 a été clonée chez le tilapia, le choquemort, la truite arc-en-ciel, le poisson zèbre et le turbot (voir Tableau 2). Chez l'ensemble de ces espèces et celles nommées dans le Tableau 3, son expression et son activité se retrouvent surtout dans le foie et dans l'intestin de certaines espèces, dans la glande thyroïde de l'esturgeon jaune (Plohman *et al.*, 2002b), dans la rétine, dans l'épithélium olfactif de la truite arc-en-ciel et du saumon rouge (Plate *et al.*, 2002), dans le poumon du dipneuste australien (Sutija *et al.*, 2002), puis de façon irrégulière dans les gonades, dans le cœur, dans le cerveau, dans les branchies, dans la peau, et peu ou pas dans le muscle, dans la rate et dans le rein. D2 est aussi exprimée de manière stade- et tissu-spécifique (adénohypophyse, et faiblement dans la rétine et la vessie natatoire) lors de l'embryogenèse du poisson zèbre (Thisse *et al.*, 2003). Son expression fut observée dans la larve du turbot

(Marchand *et al.*, 2004) et son activité augmente dans la larve du tilapia suite à l'éclosion (Reddy *et al.*, 1992).

Tableau 3 : Caractéristiques enzymatiques de D2

Espèce	DTT ^a (mM)	K _m T ₄ (nM)	K _m rT ₃ (nM)	Inhibé ATG	Inhibé PTU	Inhibé IAc	Référence
Choquemort	25-35	0,5-0,9	1,0-11	Oui	Non	- ^b	Valverde-R <i>et al.</i> , 1997, Orozco <i>et al.</i> , 2000, 2002
Esturgeon jaune	10	6,7	-	Oui	Non	Faible	Plohman <i>et al.</i> , 2002b
Lamproie	5-10	0,77-1,25	-	Oui	Non	Faible	Eales <i>et al.</i> , 1997
Morue	-	1,7-1,9	-	Oui	Non	Faible	Cyr <i>et al.</i> , 1998
Myxine d'Atlantique	50	-	-	Oui	Faible	Faible	McLeese <i>et al.</i> , 2000
Plie canadienne	25-50	0,6-4	-	Oui	Non	Non	Adams <i>et al.</i> , 2000
Poisson-chat	20	1,09-1,49	-	Faible	Non	Non	Mol <i>et al.</i> , 1998
Saumon coho	-	0,78-0,84	-	-	-	-	Sweeting <i>et al.</i> , 1994
Saumon d'Atlantique	-	0,35-0,53	-	-	-	-	Morin <i>et al.</i> , 1993
Tambour rouge	50-80	0,43-6,31	-	Oui	Non	Oui	VanPutte <i>et al.</i> , 2001
Tilapia	25-30	0,46-0,87	-	Oui	Non	Faible	Mol <i>et al.</i> , 1993, 1998
Tilapia bleu	30	1,23-1,46	-	Oui	Non	Faible	Mol <i>et al.</i> , 1997, 1998
Truite arc-en-ciel	10-25	0,63-2,5	8	Oui	Non	Faible	Frith et Eales 1996 Orozco <i>et al.</i> , 1997
Turbot	30	0,41-0,54	-	Oui	Non	Faible	Mol <i>et al.</i> , 1998

^a Concentration optimale de DTT

^b N'a pas été mesuré

L'analyse du promoteur du gène de D2 révèle la présence d'une présumée boîte *CAAT*, de deux boîtes *TATA-like* et de sites de liaison des facteurs de la transcription GATA-1 et Evi-1 chez la truite arc-en-ciel (Sambroni *et al.*, 2001), mais aucune boîte TATA et un site Sp1 chez le choquemort (Orozco *et al.*, 2002). Des études futures sur la régulation de ces gènes permettraient de déterminer la fonctionnalité de ces sites.

4.1.3. Délodinase de type 3 (D3)

La D3 catalyse exclusivement l'IRD. Ainsi, son rôle principal est l'inactivation de T₄ et de T₃, autant chez les poissons que chez les autres vertébrés, notamment dans le système nerveux central, dans le foie et dans le placenta des vivipares (Eales *et al.*, 1999 ; Bianco *et al.*, 2002). La D3 préfère la T₃ à la T₄, avec un K_m dans l'ordre de 10⁻⁹ (nM) chez les poissons (voir Tableau 4). Ses besoins en DTT sont de 10-50 mM

et elle est inhibée surtout par l'ATG, mais aussi plus faiblement par l'IAc. Le PTU inhibe D3 seulement chez la myxine d'Atlantique (McLeese *et al.*, 2000).

Tableau 4 : Caractéristiques enzymatiques de D3

Espèce	DTT ^a (mM)	K _m T ₄ (nM)	K _m T ₃ (nM)	Inhibé ATG	Inhibé PTU	Inhibé IAc	Référence
Esturgeon jaune	10	- ^b	3,3	Oui	Non	Faible	Plohman <i>et al.</i> , 2002b
Lamproie	-	-	1,3	-	-	-	Eales <i>et al.</i> , 1997
Dipneuste australien	15	-	4,5	-	Non	-	Sutija <i>et al.</i> , 2004
Myxine d'Atlantique	50	-	-	Oui-T ₄ Non-T ₃	Oui	Oui	McLeese <i>et al.</i> , 2000
Plie canadienne	12,5- 25	0,6-4	0,6-4	Oui	Non	Faible	Adams <i>et al.</i> , 2000
Poisson-chat	30	-	4,6-6,5	Oui	Non	Faible	Mol <i>et al.</i> , 1998
Saumon coho	-	-	0,77-3,2	-	-	-	Sweeting <i>et al.</i> , 1994
Saumon d'Atlantique	-	-	0,66	-	-	-	Eales <i>et al.</i> , 1993
Tilapia	30	-	5,4-22	Oui	Non	Faible	Mol <i>et al.</i> , 1998, Sanders <i>et al.</i> , 1999
Tilapia bleu	20-30	-	3,2-14	Oui	Non	Faible	Mol <i>et al.</i> , 1997, 1998
Truite arc-en- ciel	10	4,9	5,2-5,4	Oui	Non	Non	Frith et Eales 1996
Turbot	30	-	2,5-10	Oui	Non	Faible	Mol <i>et al.</i> , 1998

^a Concentration optimale de DTT

^b N'a pas été mesuré

La D3 a été clonée chez le choquemort, le dipneuste australien, et la truite arc-en-ciel (voir Tableau 2). L'expression de l'ARNm de D3 est détectée dans le cerveau, le foie, les branchies, le cœur, et les poumons du dipneuste australien (Sutija *et al.*, 2004), mais à un niveau faible ou absent dans le rein. Dans l'ensemble des espèces caractérisées (voir Tableau 4), l'activité T₄IRD de D3 a été mesurée dans le foie, le cerveau, et parfois dans les branchies, le cœur, et le muscle. La T₄IRD apparaît dans le rein uniquement suite à une injection d'E₂ (Wiens et Eales, 2005). Parallèlement, l'activité IRD sur T₃ est présente dans le cerveau, le foie, et dans la peau de la truite arc-en-ciel lors du développement (Fenton *et al.*, 1997), bien qu'elle soit faible dans les branchies, le cœur et le rein (par ex. Wiens et Eales, 2005). L'IRD de T₃ et de T₄ est aussi impliquée dans la régulation des HT dans la rétine de la truite arc-en-ciel et du saumon rouge suite à une exposition à la T₄ ou à l'hormone de libération des gonadotrophines (GnRH) et a été mesurée dans l'épithélium olfactif de ces deux espèces (Plate *et al.*, 2002).

4.1.4. Rôle des déiodinases dans la régulation périphérique des HT

Le taux plasmatique de T_3 est rigoureusement contrôlé chez les poissons, même lors d'importantes fluctuations du taux de T_4 (Eales et Brown, 1993 ; Van der Geyten *et al.*, 2005). Puisque T_3 est peu actif dans le rétrocontrôle de l'axe hypothalamo-hypophysaire, la régulation du taux plasmatique T_3 s'effectue principalement au niveau périphérique plutôt que par l'entremise de T_4 et la régulation centrale. Ainsi, en plus de réguler le taux local de T_3 dans les tissus, l'ensemble des déiodinases contribue à la régulation périphérique de T_3 . Ceci est indiqué par des études montrant que l'activité des déiodinases est très sensible à l'état thyroïdien, particulièrement dans le foie. En effet, quelques équipes ont étudié la réponse des déiodinases suite à l'induction d'une hypo- ou hyperthyroïdie, afin de mieux comprendre leur rôle dans la régulation périphérique des HT.

Une hyperthyroïdie induite par une supplémentation de T_3 (et parfois de T_4) diminue l'activité et l'expression hépatique de D2 et, de façon irrégulière, de D1, tandis que l'activité et l'expression hépatique de D3 sont augmentées (voir Tableau 5). L'hyperthyroïdie induit aussi une augmentation de D3 dans les branchies à forte dose de T_3 ou de T_4 (48 ppm) (Van der Geyten *et al.* 2005), ainsi qu'une diminution de D2 et de l'IRD de T_4 (et non de T_3) dans le cerveau de la truite arc-en-ciel (Fines *et al.* 1999). Le produit de l'ORD de rT_3 , nommé 3,5- T_2 , diminue aussi l'expression et l'activité de D2 et l'expression de D1 chez le choquemort, ce qui est la première indication que ce métabolite est bioactif chez le poisson (García-G *et al.*, 2004). Deux études ont aussi noté que la modulation de l'activité des déiodinases persistait ou encore se renversait (c.-à-d. diminuait suite à une augmentation ou vice-versa) suite à la fin du traitement (Van der Geyten *et al.*, 1998, 2005).

En cas d'une l'hypothyroïdie induite par le méthimazole (MMI) ou suite à un jeûne, l'activité et l'expression hépatique de D1 augmentent de manière assez constante. Pour D2, le MMI tend à augmenter l'activité et l'expression hépatique de D2 mais l'activité de D2 tend à diminuer suite à un jeûne de 7 jours (voir Tableau 5). La réponse hépatique de D3 est moins claire mais tend vers une diminution de l'activité en cas d'hypothyroïdie, tel qu'observé pour D3 dans les branchies et le cerveau de certains poissons.

Tableau 5 : Réponse des déiodinases de poisson à l'hyper- et l'hypothyroïdie

Espèce (Réf.)	Traitement	D1 foie	D2 foie	D3 foie	Autre ^a
Hyperthyroïdie					
Tilapia (Mol <i>et al.</i> , 1999 ; Van der Geyten <i>et al.</i> , 2005)	12 ppm T ₃ alimentaire	↔ activité	↓ activité	↑ activité	↔ activité D3B D3C
	48 ppm T ₃ alimentaire	↓ activité	↓ activité	↑ activité	↑ activité D3B ↔ activité D1R, D2B, D3R, D3C
Truite arc-en-ciel (Fines <i>et al.</i> , 1999 ; Finsson et Eales, 1999 ; Bres <i>et al.</i> 2006)	12 ppm T ₃ alimentaire	↔ activité	↓ activité ↓ expression	↑ activité ↑ expression	↓ D2C, D3C (T ₄ IRD) ↔ activité D2R, D3R, D3C (T ₃ IRD)
Choquemort (García-G <i>et al.</i> , 2004)	Immersion T ₃	↔ activité ↓ expression	↓ activité ↓ expression	-	-
Esturgeon jaune (Plohman <i>et al.</i> , 2002b)	12 ppm T ₃ alimentaire	↔ activité	↓ activité	↔ activité	↔ activité D1I, D2I, D3I, D1C, D2C, D3C
Tilapia (Van der Geyten <i>et al.</i> , 2005)	48 ppm T ₄ alimentaire	↑ activité	↔ activité	↔ activité	↑ activité D3B ↔ activité D1R, D2B, D3R, D3C
Choquemort (García-G <i>et al.</i> , 2004)	Immersion T ₄	↔ activité ↓ expression	↓ activité ↓ expression	-	-
Truite arc-en-ciel (Plate <i>et al.</i> 2002 ; Bres <i>et al.</i> 2006)	Immersion T ₄	-	↓ activité ↔ activité ↔ expression	↑ activité ↔ expression	↑ activité D3O ↔ activité D2R, D3R
Choquemort (García-G <i>et al.</i> , 2004)	Immersion 3,5-T ₂	↔ activité ↓ expression	↓ activité ↓ expression	-	-
Hypothyroïdie					
Tilapia (Van der Geyten <i>et al.</i> , 1998, 2001 ; Mol <i>et al.</i> , 1999)	Jeûne 7 jours	↔ activité	↓ activité	↑ activité (j1) ↓ activité (j2-7)	↓ activité D3B ^a , D3C
	0,2% MMI	↑ activité ↑ expression	↑ activité ↑ expression	↓ activité	↓ activité D1R, D3B, D3C ↔ activité D3B
Tilapia <i>blackchin</i> (Van der Geyten <i>et al.</i> , 2001)	0,2% MMI	↑ activité ↑ expression	↑ activité ↑ expression	↓ activité	↔ activité D1R, D3B, D3R
Truite arc-en-ciel (Finsson et Eales, 1999)	Jeûne 7 jours	↑ activité	↓ activité	-	-
Esturgeon jaune (Plohman <i>et al.</i> , 2002b)	Changement de régime	↑ activité	↔ activité	↑ activité (T ₃ IRD) ↔ activité (T ₄ IRD)	↑ activité D3I (T ₃ IRD) ↔ activité D1I, D2I, D3I (T ₄ IRD)

^aB : branchies, R : reins, C : cerveau, I : intestin, O : rétine

Ainsi, les déiodinases répondent rapidement (Van der Geyten *et al.*, 1998, 2005) aux dérèglements de l'homéostasie des HT plasmatiques de manière à corriger l'équilibre et à maintenir les taux d'HT aux niveaux physiologiques optimaux. Les déiodinases régulent aussi les taux d'HT en réponse à ou en concert avec divers stimuli endogènes (par ex., stade de développement, plusieurs hormones), ainsi qu'avec des facteurs exogènes qui sont souvent associés aux stimuli endogènes, dont la salinité, l'alimentation, la photopériode/saison/température, et les contaminants environnementaux (voir le chapitre II) (Cyr *et al.*, 1998 ; Eales *et al.* 1999 ; Orozco *et al.*, 2002 ; Brown *et al.*, 2004b). Le stress est un bon exemple de facteur exogène qui agirait en parallèle ou en cascade avec les glucocorticoïdes pour modifier l'activité des déiodinases (Kühn *et al.*, 1998). Par exemple, la manipulation et la perturbation physique des truites arc-en-ciel tend à diminuer l'activité hépatique de type ORD et augmenter l'IRD (Johnston *et al.*, 1996 ; Todd et Eales, 2002).

Il est intéressant de constater que l'expression des gènes des déiodinase est souvent aussi sensible (Van der Geyten *et al.*, 2001, Bres *et al.*, 2006) ou même plus sensibles (García-G *et al.*, 2004) que leur activité. Ceci se compare aux mammifères et aux amphibiens, chez qui D1 (absent chez les amphibiens), D2, et D3 sont régulées au niveau transcriptionnel par T₃ (Bianco *et al.* 2002). Par exemple, l'expression de D1 est un biomarqueur très sensible de l'état thyroïdien chez la souris (Zavacki *et al.* 2005).

Compte tenu de l'importance des déiodinases dans le contrôle périphérique et local des HT et de leur réponse rapide aux changements dans l'homéostasie des HT, l'activité et l'expression des déiodinases ont été proposées comme outils dans l'étude de la régulation périphérique des HT chez les téléostéens (Eales *et al.*, 1999) (voir la section 9.1).

4.2. Sulfatation et glucuronidation

La sulfatation et la glucuronidation ont comme fonction de faciliter l'élimination des HT en catalysant leur conjugaison à des groupements qui augmentent leur solubilité, et ainsi, leur élimination dans la bile (Finsson et Eales, 1996) et dans l'urine (Parry *et*

al., 1994). Les HT peuvent aussi être métabolisés par déamination, décarboxylation ou par clivage du pont diphenyl-éther (Figure 1). Par contre, ces dernières voies n'ont pas fait l'objet d'études poussées, même chez les mammifères, et n'auraient probablement que des fonctions mineures dans la régulation normale des HT (Wu *et al.*, 2005).

Les premiers travaux détaillés sur les voies de conjugaison hépatiques des HT chez les poissons ont été effectués par Finnson et Eales, qui ont utilisés la truite arc-en-ciel comme modèle (1996, 1997, 1998, 1999). Ils ont détecté la production *in vitro* de HT glucuroconjugués et sulfatés par des hépatocytes, ainsi que la présence des métabolites conjugués de T₂, de T₃ et de T₄ dans la bile de truite (Finnson et Eales, 1996). Par ailleurs, des HT glucuroconjugués sans HT sulfatés apparaissent dans le plasma et la bile du tilapia après une injection de T₃ (DiStefano *et al.*, 1998). Dans le foie de poisson, il existerait plus d'une forme de l'enzyme responsable de la glucurodination, l'uridine diphospho-glucuronyl transférase (UDPGT) (Finnson et Eales, 1997). Chez la truite, il n'a pas été possible d'établir si plusieurs formes de la sulfotransférase (ST) agissent sur les HT (Finnson et Eales, 1998). Par contre, six formes de ST qui démontrent une activité envers les HT ont été clonées chez le poisson zèbre et leur expression a été évaluée lors de l'embryogenèse et au cours du développement (Sugahara *et al.*, 2003a, 2003b, 2003c ; Liu *et al.*, 2005 ; Yasuda *et al.*, 2005).

Des UDPGT et des ST sont aussi actives dans les reins mais leur contribution à la clairance d'HT n'est pas modifiée en cas d'hyperthyroïdie et serait plutôt déterminée par la capacité de production d'urine (Parry *et al.*, 1994). Du côté hépatique, des truites maintenues avec différentes rations alimentaires, ce qui modifie l'état thyroïdien, présentent des différences dans l'activité des UDPGT et des ST qui leur permet de compléter les déiodinases pour réguler leur taux de HT (Finnson et Eales, 1999). Par contre, aucun changement dans l'activité de ces enzymes n'a été observé dans le foie de truites supplémentées en T₃ ; dans ce cas, la régulation périphérique de T₃ passe uniquement par les déiodinases (Finnson et Eales, 1999). Ainsi les différentes UDPGT et les ST présentes dans le foie, et à un moindre degré dans les reins, contribuent de façon significative mais non exclusive au métabolisme des HT, facilitant leur élimination des HT dans la bile et l'urine.

Chez les mammifères, les HT sulfatées peuvent être soit déconjuguées (dans le cas de T₃S) (Kung *et al.*, 1988), ou encore désiodées (T₄S, T₃S, et rT₃S), ce qui permet recycler l'iodure, dont la seule source extérieure est l'alimentation (Visser, 1994). La désulfatation *in vitro* de T₃S par les hépatocytes de truite arc-en-ciel a aussi été observée, ce qui laisse présager la possibilité d'une remise en circulation de la T₃ à partir d'une réserve tissulaire de T₃S (Finnson *et al.*, 1999). Par contre, les déiodinases de poisson n'ont pas la capacité de désioder les HT sulfatées, même que la désiodation est inhibée chez les métabolites sulfatées (Finnson *et al.*, 1999) ; les hormones conjuguées sont donc évacuées par la bile sans qu'il y ait de recyclage de leur iodure (Finnson et Eales, 1996). Le recyclage de l'iodure des HT n'est peut-être pas nécessaire pour subvenir aux besoins des poissons puisqu'ils peuvent en absorber amplement à partir de l'eau via leur branchies.

5. Mécanismes d'action des HT

Les mécanismes d'action des HT ont été hautement conservés au cours de l'évolution. En effet, les études chez les poissons à ce sujet confirment ce qui avait été préalablement ou parallèlement observé chez les mammifères et chez d'autres vertébrés, notamment les amphibiens. Ainsi, les HT agissent principalement par l'entremise de récepteurs nucléaires spécifiques pour induire la transcription de gènes. De plus, l'affinité de T₃ pour ces récepteurs est au moins 10 fois plus que celle de T₄, d'où le fait que la T₃ est considéré comme la forme active des HT (Darling *et al.*, 1982 ; Bres et Eales 1986 ; Nowell *et al.*, 2001).

Deux récepteurs des HT, TR α et TR β , ont été clonés chez plusieurs espèces de poisson, et qui présentent chacun des isoformes issus d'un épissage alternatif (Marchand *et al.*, 2001, 2004 ; Liu *et al.*, 2000 ; Nowell *et al.*, 2001 ; Jones *et al.*, 2002 ; Kawakami *et al.*, 2003a, 2003b). Ces récepteurs comportent chacun un domaine de liaison à l'ADN en doigt de zinc et un domaine de liaison au ligand qui sont hautement conservés (Marchand *et al.*, 2001). Les TR agissent en tant que facteur de transcription ligand-dépendant en se liant aux éléments de réponse aux HT (*thyroid response element*, TRE) situés dans les promoteurs de gènes sous le contrôle des HT (Liu *et al.*, 2000 ; Marchand *et al.*, 2001). Le TR forme alors un dimère, soit avec un

autre TR, ou plus communément, avec le récepteur X des rétinoïdes (RXR) (Bassett *et al.*, 2003). Dans la plupart des cas, en l'absence de T₃, ce complexe recrute des éléments co-répresseurs de la transcription, tels N-Cor et SMRT, qui modifient la structure de la chromatine et réprime l'expression du gène. Lorsque la T₃ se lie au TR, un changement dans la conformation de ce dernier libère les corépresseurs et favorise la liaison d'une série d'activateurs de la transcription qui ont, entre autres, une activité histone-acétyl transférase et permettent la liaison de l'ARN polymérase II ; le gène cible est alors exprimé. À l'inverse, certains gènes sous le contrôle des HT ont une expression constitutive et sont réprimés en présence de T₃ (Bassett *et al.*, 2003).

L'expression des gènes de TR α et TR β se retrouve dans un grand nombre de tissus de poisson, bien que les patrons d'expression différentiels de ces deux types indiquent qu'ils jouent des rôles à la fois simultanés et distincts, permettant à la T₃ d'agir sur une variété de fonctions physiologiques, notamment lors du développement (Liu *et al.*, 2000 ; Nowell *et al.*, 2001 ; Power *et al.*, 2001 ; Marchand *et al.*, 2004) et en interaction avec la cascade de l'acide rétinoïque (Essner *et al.*, 1997, 1999). De plus, la transcription des gènes de TR α et TR β sont sous le contrôle des HT (Liu *et al.*, 2000, 2002 ; Raine *et al.*, 2004). Bien qu'un TRE n'ait pas encore été identifié dans le promoteur des TR chez le poisson, un TRE fonctionnel est présent dans le promoteur du TR β du *Xenopus laevis* (Ranjan *et al.*, 1994) et de l'humain (Sakurai *et al.*, 1992).

Quelques mécanismes d'action non génomiques des HT seraient aussi présents et moduleraient des changements très rapides dans la cellule, par exemple au niveau des canaux ioniques (notamment pour le calcium) et des mitochondries (Davis et Davis, 1996 ; Bassett *et al.*, 2003). Une intégrine présente à la surface de la membrane plasmique, $\alpha_v\beta_3$, lie la T₄ (et la T₃ avec une affinité moindre) et permet de l'activation de la voie MAPK et l'angiogenèse induite par la T₄ (Bergh *et al.*, 2005). Cette action non génomique des HT pourrait aussi stimuler la phosphorylation des TR, causant la dissociation des corépresseurs et une activation accrue de la transcription (Jones *et al.*, 1994, Bassett *et al.*, 2003).

Chez les poissons, la T₃ augmente l'effet de la gonadotrophine sur la production d'E₂ sans induire une synthèse protéique *de novo* dans l'ovaire de truite arc-en-ciel (Cyr et Eales, 1988a, 1988b) mais plutôt en inhibant la phosphodiesterase (PDE) : la

dégradation de l'AMP cyclique (AMPC) par la PDE est donc diminuée, ce qui permet à l'AMPC de stimuler la production d'E₂ de manière prolongée (Cyr et Eales, 1989b). Récemment, il a été signalé que la T₃ stimulait l'activité de la tyrosine hydroxylase dans le cerveau d'un poisson chat via la voie de l'AMPC et des messagers secondaires protéines kinases A et C (Chaube et Joy, 2005). Plus d'études sont nécessaires pour démontrer l'importance des voies non génomiques, compte tenu la prépondérance du mécanisme d'action classique de la T₃ via ses récepteurs nucléaires.

6. Fonctions physiologiques

Les HT sont essentielles à plusieurs fonctions physiologiques des vertébrés. Parmi leurs rôles les plus étudiés, notons leur contrôle du développement du cerveau des mammifères et de la métamorphose chez les amphibiens. Chez les poissons, les HT ont souvent un effet permissif sur plusieurs processus physiologiques, particulièrement en ce qui touche le développement, la croissance et la reproduction. Ces processus sont tous régulés par une multitude de facteurs qui agissent en concert à des étapes précises du cycle biologique du poisson. Ainsi, les premières indications du rôle des HT ont souvent été des corrélations entre les étapes critiques de ces processus physiologiques et des variations dans la cyclicité des taux d'HT. Les études subséquentes ont alors démontré l'effet d'administration d'HT ou de goitrogènes (agents anti-thyroïdiens) sur ces processus et tendent actuellement à préciser l'effet des HT selon des paramètres enzymatiques (p. ex., désiodation), biochimiques et moléculaires. Cette section présente donc un survol des études sur les rôles des HT dans le développement, la croissance et la reproduction.

6.1. Développement

6.1.1. Développement embryonnaire

La présence de T₃ et/ou de T₄ a été observée dans les œufs de toutes les espèces (≥ 40) de poissons étudiés jusqu'à présent (Tagawa *et al.*, 1990b ; Power *et al.*, 2001 ; McComb *et al.*, 2005 ; Yamano, 2005). Ceux-ci proviennent d'un transfert maternel des HT. La tendance générale indique une séquestration préférentielle de T₄ plutôt que de T₃ dans les œufs de poissons d'eau douce et l'inverse chez les poissons marins

(Tagawa *et al.*, 1990b). Tel que discuté dans la section 1.3.1, les HT se lient à la VTG; de plus, le taux d'accumulation des HT dans les ovocytes du choquemort suit de près le stade vitellogénique, ce qui suggère que la VTG serait un des vecteurs du transfert (et/ou de rétention) des HT dans les œufs (Monteverdi et Di Giulio 2000). Par contre, la diffusion passive de T_3 à partir du liquide folliculaire serait peut-être une voie de transport plus importante (Tagawa et Brown, 2001 ; Raine et Leatherland, 2003). Le taux d'HT dans les œufs dépend aussi du taux d'HT maternel, puisqu'une injection de T_3 chez la mère amène une augmentation de l'hormone dans ses œufs (Brown *et al.*, 1988 ; Kang et Chang, 2004).

La baisse des taux de HT maternels dans les œufs lors du développement embryonnaire (Tagawa *et al.*, 1990a, b ; Reddy *et al.*, 1992 ; Raine et Leatherland, 1999 ; Raine *et al.*, 2004 ; Szisch *et al.*, 2005) et la biosynthèse de T_4 et de T_3 avant l'éclosion chez certaines espèces (Greenblatt *et al.*, 1989 ; Crane *et al.*, 2004), suggère un rôle physiologique ainsi que la présence de voies métaboliques des HT lors de l'embryogenèse. Dans plusieurs cas, les œufs qui sont supplémentés en HT (soit par injection maternelle ou par incubation) présentent de meilleurs taux d'éclosion, de survie larvaire et de croissance (Brown *et al.*, 1988 ; Reddy et Lam, 1992 ; Hey *et al.*, 1996 ; Kang et Chang, 2004). Par contre, les mécanismes par lesquels les HT favorisent le développement embryonnaire ne sont pas bien connus, surtout que le développement n'est pas toujours avantage par un traitement aux HT (Power *et al.*, 2001 ; Raine et Leatherland, 2003 ; Raine *et al.*, 2004 ; Yamano 2005).

Sachant que l'action classique des HT passe par les récepteurs des HT, plusieurs travaux ont confirmé que les récepteurs $TR\alpha$ et $TR\beta$ sont exprimés chez l'embryon, avant même la formation des follicules thyroïdiennes (Essner *et al.*, 1997 ; Yamano et Miwa, 1998 ; Llewellyn *et al.*, 1999 ; Liu *et al.*, 2000, 2002 ; Nowell *et al.*, 2001 ; Jones *et al.*, 2002 ; Raine *et al.*, 2004). L'activité de T_3 envers ses récepteurs est confirmée par l'expression d'un gène rapporteur dans des cellules HeLa et dans des embryons du poisson zèbre en présence de T_3 ou d'un analogue (TRIAC) (Essner *et al.*, 1997 ; Liu *et al.*, 2000). Il reste donc à démontrer si (et dans quelles circonstances) la T_3 présente dans les embryons peut interagir avec ses récepteurs endogènes, ou si ceux-ci sont couplés avec leurs co-répresseurs afin de taire l'expression de gènes lors

du développement, comme cela serait le cas pour TR α chez le poisson zèbre (Essner *et al.*, 1997, 1999 ; Power *et al.*, 2001).

L'ORD fut détectée dans les embryons de la truite arc-en-ciel (Raine *et al.*, 2004) et à un faible niveau chez un élasmodonté (Squalus *acanthias*) (Leary *et al.*, 1999) mais pas chez le tilapia (Reddy *et al.*, 1992). Le rôle de T₃ dans l'organogenèse est fortement suggéré par l'expression de D1 et D2 stade- et tissu-spécifique chez les embryons du poisson zèbre (Thisse *et al.*, 2003). Par contre, la plupart des études tendent à suggérer que la production de T₃ ne débute qu'après l'absorption du vitellus.

6.1.2. Développement larvaire, métamorphose et saumonification

Les HT seraient aussi nécessaires aux processus de développement suivant l'éclosion des poissons, dont la transition larve-juvénile, la métamorphose, et la saumonification. Ce dernier phénomène englobe tous les changements physiologiques qui permettent aux salmonidés de passer de l'eau douce à un milieu marin. Tous ces processus impliquent des changements morphologiques importants, dont la restructuration de tissus et l'organogenèse, qui sont intimement liés à l'action des HT, tel que détaillé chez les amphibiens (par ex., Huang *et al.*, 2001 ; revu par Brown, 2005).

Tandis que les embryons de poisson dépendent d'un apport maternel des HT, les larves doivent rapidement prendre en charge la synthèse de leurs propres hormones. Chez les espèces dont les follicules thyroïdiens ne sont pas actifs avant l'éclosion, l'expression de TSH β et la biosynthèse de la T₄ débute quelques jours après l'éclosion, souvent au moment de l'absorption du vitellus ou du début de l'alimentation (Sullivan *et al.*, 1987 ; Brown 1997 ; García Ayala *et al.*, 2003 ; Raine *et al.*, 2004, Szisch *et al.*, 2005 ; Einarsdóttir *et al.*, 2006). La production de T₃ par la désiodation semble débiter suite à l'éclosion, généralement peu après l'absorption du vitellus et augmente en concert avec la transition larve-juvénile (Sullivan *et al.*, 1987 ; Reddy *et al.*, 1992 ; Orozco *et al.*, 2003a ; Szisch *et al.*, 2005). Finalement, tel que mentionnée, l'expression des TR est déjà amorcée mais peut aussi augmenter au cours du développement larvaire (Llewellyn *et al.*, 1999 ; Jones *et al.*, 2002).

Les larves vivent des nombreux changements lors de leur transition à l'état juvénile, qui leur permettent de se mouvoir librement, de se nourrir et d'acquérir les caractéristiques des adultes de leur espèce (Power *et al.*, 2001 ; Liu *et al.*, 2002 ; Szisch *et al.*, 2005). Parmi les changements qui sont accélérés par les HT (T₃ ou T₄), notons l'absorption du vitellus, le développement des nageoires des larves, de la vessie natatoire, de la structure de la tête et de la mâchoire, du tractus intestinal et des glandes gastriques, de la musculature, du système immunitaire, de la rétine, la croissance, le rythme cardiaque, et le changement de pigmentation de la peau, tandis que les goitrogènes ont des effets contraires (Reddy et Lam, 1992 ; Brown, 1997 ; Lam *et al.*, 2005 ; Van der Ven *et al.*, 2006). Par ailleurs, la T₄ annule les effets des goitrogènes (Liu *et al.*, 2002). L'ensemble de ces transformations peut être si drastique du point de vue morphologique, biochimique, moléculaire et physiologique qu'on parle de métamorphose chez les poissons plats, les lamproies et les anguilles (Power *et al.*, 2001 ; Yamano, 2005).

L'effet des HT sur la métamorphose des poissons plats fait l'objet d'une littérature qui dépasse la portée de cette revue. Brièvement, l'activation des follicules thyroïdiens et une forte augmentation des taux de HT sont fortement corrélées au climax de la métamorphose et les changements associés à cette transformation sont induits et accélérés par un traitement au HT et inhibés par les goitrogènes (Miwa et Inui, 1987 ; Tagawa *et al.*, 1990a ; de Jesus *et al.*, 1998 ; Schreiber et Specker, 1998 ; Power *et al.*, 2001 ; Yamano, 2005). Au cours des premières semaines, sous l'action permissive des HT, la larve symétrique et pélagique s'aplanit pour devenir asymétrique et benthique, un œil migre de l'autre côté de la tête (Tagawa et Aritaki, 2005), les glandes gastriques se développent (Huang *et al.*, 1998), la forme de ses globules rouges change (Miwa et Inui, 1991) et la composition protéique des muscles adopte la composition adulte (Yamano *et al.*, 1994).

Yamano et Miwa (1998) ont constaté que l'expression des isoformes de TR α et de TR β varie au cours de la progression de la métamorphose du cardeau hirame : TR α A atteint un bref maximum au climax tandis que deux isoformes de TR β augmentent au climax et restent élevés jusqu'à la fin de la métamorphose. Ces motifs d'expression sont spécifiques aux tissus et aux stades de la métamorphose, ce qui suggère que les TR seraient les intermédiaires de l'action multiple et coordonnée des HT lors de la

métamorphose. Cette hypothèse est appuyée par la forte augmentation de l'expression de TR α au climax de la métamorphose et par la montée graduelle de l'expression de TR β suite à la métamorphose de l'anguille (Kawagami *et al.*, 2003b) et du turbot (Marchand *et al.*, 2004), ainsi que par l'expression tissu- et stade-spécifique des TR chez les poissons en transition larve-juvénile (Liu *et al.*, 2000 ; Nowell *et al.*, 2001 ; Power *et al.*, 2001). De plus, D2 est surexprimée lors de la métamorphose du turbot (Marchand *et al.*, 2004).

Notons qu'à l'inverse des poissons plats, la métamorphose de la lamproie est induite suite à une baisse des HT (Wright et Youson, 1977 ; Youson *et al.*, 1994) et est inhibée par les HT (Manzon et Youson, 1997). Ainsi, la plupart des goitrogènes (sauf le PTU) stimulent la métamorphose (Manzon *et al.*, 2001). De plus, l'activité des déiodinases dans l'intestin semble contribuer à cette baisse coordonnée des HT, en passant de la ORD à la IRD au début de la métamorphose (Eales *et al.*, 2000). Par contre, le mécanisme par lequel la baisse de HT stimulerait la métamorphose demeure inconnu (Yamano, 2005).

Finalement, la saumonification, la période d'adaptation des salmonidés à la vie marine, implique aussi l'action permissive des HT afin d'assurer le bon déroulement d'importants changements morphologiques (taille, forme), physiologiques (osmorégulation en eau salée, composition et réponse des muscles, pigments visuels et système olfactif) et comportementaux (dispersion et migration) (Sullivan *et al.*, 1987, Sweeting *et al.*, 1994 ; Morin *et al.*, 1995 ; Specker *et al.*, 2000 ; Coughlin *et al.*, 2001 ; Edeline *et al.*, 2005). Le taux de T₄ démontre un pic clair lors de la saumonification et les changements dans l'activité des déiodinases dans divers tissus (foie, cerveau, rétine, branchies) seraient corrélés avec cette période (Eales *et al.*, 1993 ; Morin *et al.*, 1993 ; Sweeting *et al.*, 1994 ; Morin *et al.*, 1995 ; Specker *et al.*, 2000, Plate *et al.*, 2002, Orozco *et al.* 2002).

6.2. Croissance

Comme il a été observé chez les larves de poisson, les HT contribuent directement à la croissance, en accélérant la prise de poids et la taille (et croissance squelettique) des individus (Higgs *et al.*, 1977, 1979 ; Higgs *et al.*, 1982 ; Woo *et al.*, 1991 ; Toguyeni

et al., 1996 ; Brown, 1997 ; Gomez *et al.*, 1997 ; Kang et Devlin, 2003). L'administration de T_4 et surtout de T_3 permettent une augmentation de la consommation de nourriture et du taux de conversion de celle-ci (ce taux est calculé en divisant le poids de la nourriture consommée par le gain de poids de l'animal) (Higgs *et al.*, 1979). À l'inverse, les goitrogènes, tels le PTU et le perchlorate d'ammonium ou de potassium, inhibent la croissance (Brown, 1997 ; Kang et Devlin, 2003 ; Crane *et al.*, 2005 ; Van der Ven *et al.*, 2006), tandis qu'une hyperthyroïdie provoque des déformations morphologiques (Higgs *et al.*, 2002 ; Kang et Devlin, 2003).

Le processus par lequel les HT stimule la croissance n'est pas connu en détail et les études sont souvent contradictoires. Par exemple, une augmentation du métabolisme des lipides par les HT est suggérée par certains travaux, entre autres par la présence d'un TRE dans le promoteur du gène de la lipase (De *et al.*, 1988 ; Varghese et Oommen, 1999 ; Oku *et al.*, 2002 ; Kiessling *et al.*, 2005). À l'inverse, d'autres équipes n'observent pas cet effet ou alors un effet inverse (Farbridge et Leatherland, 1988 ; Woo *et al.*, 1991 ; Kao *et al.*, 1999), ou encore suggèrent plutôt un rehaussement direct ou indirect du métabolisme des glucides par T_3 (Fagerlund *et al.*, 1984 ; Higgs *et al.*, 1992 ; Ma *et al.*, 2004). Par contre, il est clair que le rôle permissif des HT dans la croissance implique des interactions parfois complexes avec plusieurs facteurs, dont la GH (Farbridge et Leatherland, 1988 ; Kang et Devlin, 2003), l'alimentation, le sexe, et les stéroïdes sexuels (Higgs *et al.*, 1977 ; Leatherland et Farbridge, 1992 ; Toguyeni *et al.*, 1996 ; Bœuf *et al.*, 1999 ; Valente *et al.*, 2003 ; Eales *et al.*, 2004). Par exemple, tandis que la GH stimule la désiodation de T_4 à T_3 (MacLatchy et Eales, 1992 ; Leatherland et Farbridge, 1992), la T_3 induit la transcription de l'ARNm et/ou la synthèse de GH et d facteur de croissance insulino-mimétique de type I (IGF-I) (Moav et McKeown, 1992 ; Melamed *et al.*, 1995 ; Schmid *et al.*, 2003). Un TRE a été identifié dans le promoteur du gène de la GH du saumon de l'Atlantique, au niveau duquel la T_3 se lie aux TR pour réguler l'expression de GH (Farchi-Pisanty *et al.*, 1997 ; Sternberg et Moav, 1999). De plus, une diminution de la quantité ou de la qualité de la ration alimentaire a un effet généralement répressif sur le système thyroïdien, notamment au niveau de la désiodation (Flood et Eales, 1983, Kühn *et al.*, 1998 ; Van der Geyten *et al.*, 1998 ; Finnson et Eales, 1999 ; Plohman *et al.*, 2002b) et de la réponse de l'axe

hypothalamo-hypophysaire (Leatherland et Farbridge, 1992). Le rôle permissif des HT sur la croissance est donc dépendant du régime énergétique du poisson.

6.3. Reproduction

Comme pour le développement et la croissance, le lien entre le HT et la reproduction a été soulevé suite à l'observation de corrélations avec les taux d'HT. Ces corrélations ont été revues en détail par Cyr et Eales (1996), qui décrivent aussi les travaux expérimentaux qui précisent et approfondissent nos connaissances sur les interrelations entre les HT et la reproduction chez les poissons. Depuis 1996, plusieurs études sont venues contribuer à l'état des connaissances sur ce sujet, surtout dû à l'application des techniques de biologie moléculaire. Malgré le nombre de facteurs confondants qui interagissent avec les HT ainsi que les différences entre les espèces au niveau de la physiologie et des stratégies de reproduction, il est maintenant bien accepté que les HT ont un effet permissif dans le développement du système reproducteur des poissons.

6.3.1. Maturation sexuelle de la femelle

La maturation sexuelle des téléostéens vivant dans les climats tempérés se fait habituellement sur une base annuelle, et comprend donc une série d'événements coordonnés. Brièvement, chez les femelles, l'ovogenèse débute sous l'effet de la gonadotrophine plasmatique (GTH ; certaines espèces auraient deux GTH : GTH_I, semblable à l'hormone de stimulation folliculaire (FSH) et GTH_{II}, semblable à la lutéostimuline (LH)), qui stimule la sécrétion des stéroïdes sexuels, dont l'E₂, par les cellules thécales et de la granulosa de l'ovocyte pré-vitellogénique (Cyr et Eales, 1996 ; Patino et Sullivan, 2002). L'E₂ circule jusqu'au foie et se lie à son récepteur pour induire la vitellogenèse. La VTG est alors incorporée dans l'ovocyte du stade vitellogénique, où elle est accumulée et clivée pour former les composantes principales du vitellus. La maturation finale et l'ovulation de l'ovocyte seraient régulées par la GTH (ou spécifiquement GTH_{II}) qui stimule une progestagène, l'hormone d'induction de la maturation (*maturation-inducing hormone* (ou *steroid*), MIH) (Ng *et al.*, 1997 ; Patino et Sullivan, 2002).

De façon générale, outre certains téléostéens d'eau douce indiens (dont la perche grimpeuse), les taux d'HT sont augmentés lors de l'ovogenèse et baissent au moment de la fraie ou peu après (Cyr et Eales, 1996), ce qui a été observé récemment chez le bar d'Amérique (Mylonas *et al.*, 1997, 1998), le flétan de l'Atlantique (Björnsson *et al.*, 1998), la morue (Comeau *et al.*, 2000), le denté commun (Pavlidis *et al.*, 2000) mais pas chez le cyprin doré (Sohn *et al.*, 1999a). La baisse des taux plasmatiques des HT (surtout pour T₃, et ce, de façon plus constante que pour T₄) serait induite par la montée de l'E₂, tel que démontré expérimentalement par des traitements à l'E₂ chez la truite arc-en-ciel (Cyr et Eales, 1989b ; Holloway et Leatherland, 1997 ; Mercure *et al.*, 2001 ; Wiens et Eales, 2005) et le saumon d'Atlantique (McCormick *et al.*, 2005), parmi d'autres espèces, sauf les poissons d'eau douce indiens (revu par Cyr et Eales 1996).

Les mécanismes par lesquels l'E₂ diminue le taux de T₃ incluent notamment une diminution marquée de la désiodation hépatique de T₄ et de T₃ (Cyr *et al.*, 1988 ; Yamada *et al.*, 1993 ; Cyr et Eales, 1996 ; Wiens et Eales, 2005), une augmentation de l'IRD rénale de T₃ (Wiens et Eales, 2005), et une modification de la liaison des HT aux protéines de transport (Cyr et Eales, 1989a, 1992). Ceci est aussi reflété par une diminution de l'expression hépatique de D1 et de D2 par l'estrogène éthinylestradiol (EE2) de manière concentration-dépendante chez des femelles gravides du poisson zèbre (Hoffmann *et al.*, 2006). L'E₂ diminuerait aussi la capacité des récepteurs nucléaires de lier la T₃ (Bres *et al.*, 1990).

À l'inverse, la T₃ (et plus faiblement, T₄) augmente la production d'E₂ en synergie avec la GTH et stimule le développement ovarien à des doses physiologiques ; si le taux de T₃ est trop élevé, cet effet disparaît (Cyr et Eales, 1988a, 1988b ; Cyr et Eales, 1996). Puisque la GTH induit la production de l'E₂ par l'entremise de l'AMPc, la T₃ permet une augmentation de l'activité de l'AMPc en inhibant l'action de la PDE, qui est responsable de la dégradation de l'AMPc (Cyr et Eales, 1989b). Le rôle de HT dans la stimulation de la production d'E₂ au début du développement ovocytaire est appuyé par le constant que l'activité hépatique des voies de la ORD est plus élevée chez la truite arc-en-ciel (D2) et le tilapia (D1 et D2) au début de la vitellogenèse, ce qui correspond avec l'augmentation du taux de T₃ plasmatique (Ruby et Eales, 1999,

Orozco *et al.*, 2003a). Les HT pourraient aussi jouer un rôle dans la maturation finale de l'ovocyte, en concert avec la GTH_{II} (Cyr et Eales, 1996), bien que cet effet n'est pas retrouvé de manière constante dans les études (Ng *et al.*, 1997). Curieusement, le PTU provoque chez le poisson zèbre une augmentation du nombre d'ovocytes mais une diminution dose-dépendante de la taille de ces dernières (Van der Ven *et al.*, 2006).

Récemment, l'expression des TR fut détectée dans l'ovaire du poisson zèbre (Liu *et al.*, 2000), de l'anguille (Kawagami *et al.*, 2003a , 2003b) et du cyprin doré mature et immature (Nelson et Habibi, 2006). La présence des TR dans l'ovaire de ces poissons et autres espèces (Cyr et Eales, 1996) permet donc aussi une activité génomique de la T₃ dans l'ovaire. Par exemple, la T₃ induit aussi l'expression (Datta *et al.*, 2002) d'une protéine ovarienne qui favorise l'activité de la 3 β -hydroxystéroïde déshydrogénase (3 β -HSD), une enzyme qui régule la conversion de précurseurs stéroïdiens en hormone active, par exemple de la prégnénolone en progestérone (Datta *et al.*, 1999). Dans l'ovaire, on observe une activité ORD chez le turbot (D1) et la truite (D1, D2 dans l'ovaire pré-vitellogénique) qui agirait en tant que producteur de T₃ local (Mol *et al.*, 1998, Sambroni *et al.*, 2001).

L'ovogenèse est un processus qui demande un fort apport énergétique : si les femelles n'ont pas accumulé de réserves d'énergie suffisantes, leurs gonades ne se développent pas et elles demeurent immatures (Henderson *et al.*, 1996). Ainsi, vu l'interaction des HT avec la croissance et l'état métabolique, l'ensemble de ces observations suggèrent que les HT contribuent de façon permissive au signal hormonal qui dirige l'allocation de l'énergie vers la maturation ovocytaire plutôt que vers la croissance somatique lorsque les réserves d'énergie sont suffisantes (Cyr et Eales, 1996).

6.3.2. Maturation sexuelle du mâle

Chez le poisson mâle, c'est aussi la GTH qui stimule la stéroïdogénèse et la spermatogénèse. Les principaux androgènes sont la testostérone (T) et la 11-kétotestotérone (11-KT) tandis que la dihydrotestérone (DHT) est faiblement produite ou absente (revu par Schulz et Miura, 2002). Les androgènes induisent la maturation

coordonnée des cellules germinales dans des tubules, nommées spermatocystes, cernées de cellules de Sertoli. La maturation des cellules germinales se caractérise par une série de stades, qui sont caractérisés par la présence de différents types cellulaires qui se succèdent. Le premier stade comprend uniquement des spermatogonies (mitose), puis apparaissent les spermatocytes (méiose) et les spermatides. Ces derniers signalent le début de la spermiogenèse, un processus comprenant la condensation de la chromatine, la réduction du volume du noyau, et le développement du flagelle; les spermatides deviennent ainsi des spermatozoïdes matures (Schulz et Miura, 2002).

À l'instar des femelles, les taux d'HT sont généralement corrélés avec le développement gonadique (Cyr et Eales, 1996). Cette tendance est particulièrement marquée chez les espèces anadromes, chez qui l'état thyroïdien diminue suite au développement des testicules chez les mâles, lors de la migration vers la zone de fraie. Ensuite, les taux d'HT remontent au moment de la fraie ou lorsque le poisson entre en phase de croissance (Cyr et Eales, 1996). Par exemple, un pic des taux de T_3 et de T_4 survient suite à l'émission du sperme de la truite arc-en-ciel (Holloway *et al.*, 1999), ce qui suggère un rôle des HT lors de la période de recrudescence testiculaire. Par exemple, un traitement de T_4 accélère le début de la spermatogenèse chez la carpe (Timmermans *et al.*, 1997). De façon encore plus probante, une hypothyroïdie induite par la thiourée suivant la fraie chez le poisson-chat d'Afrique perturbe la remise en marche de la spermatogenèse, tel qu'indiqué histologiquement et par la modification des fonctions de la vésicule séminale (Swapna *et al.*, 2006). Entre autre, la carence en T_3 à ce stade réprime les taux d'androgènes lors de la prochaine phase pré-fraie, possiblement par l'entremise d'une inhibition de l'axe hypothalamo-hypophyso-gonadique (voir section 3.3.3) (Swapna *et al.*, 2006).

À l'inverse de l' E_2 , les androgènes tendent à stimuler l'état thyroïdien, en augmentant le taux de T_3 , et de façon moindre ou négative pour T_4 (MacLatchy et Eales, 1988 ; Cyr et Eales 1996 ; Holloway *et al.*, 1997), sauf chez le saumon coho juvéniles (Yamada *et al.*, 1993). Cet effet dépend du régime énergétique du poisson puisque l'augmentation du taux de T_3 est seulement significative chez les poissons jeûnés (Holloway *et al.*, 1997). La désiodation de T_4 est aussi parfois favorisée par les androgènes (MacLatchy et Eales, 1988 ; Cyr et Eales, 1996) mais pas de façon constante (Yamada *et al.*, 1993).

Le rôle des HT dans la différenciation et la maturation du système reproducteur mâle a surtout été étudié chez les mammifères, surtout en observant l'effet des goitrogènes (St-Pierre *et al.*, 2003 ; Holsberger et Cooke, 2005). Par exemple, le PTU induit une augmentation du poids testiculaire, du nombre de cellules de Sertoli et de la spermatogenèse chez le rat en prolongeant la période de développement des cellules de Sertoli (Cooke *et al.*, 1991, De França *et al.*, 1995). Ces effets sont exactement reproduits chez le tilapia traité au PTU au début de la spermatogenèse (Matta *et al.*, 2002). Les récepteur des HT sont présents dans le testicule (Cyr et Eales 1996) et leur expression a récemment été démontrée dans les testicules de cyprins dorés immatures et matures (Nelson et Habibi, 2006). La suite des travaux de Matta permettrait de confirmer si la T_3 agit sur le développement des cellules de Sertoli des poissons via le récepteur $TR\alpha 1$ comme chez les souris (Holsberger *et al.*, 2005). À l'instar des femelles, l'activité hépatique de la D1 et de la D2 est augmentée lors de la différenciation gonadique du tilapia et au début de la maturation sexuelle (Orozco *et al.*, 2003a). Finalement, l'expression stade-spécifique de D2 dans les testicules de truite arc-en-ciel, et la production locale de T_3 qui découlerait de l'activité de D2, tend à confirmer le rôle des HT dans la maturation des gonades, puisque son expression triple au début de la spermatogenèse (Sambroni *et al.*, 2001).

6.3.3. Interactions HT et GnRH, GTH, TRH et TSH

L'interaction entre les hormones de l'axe hypothalamo-hypophysaire et les HT est un autre champ d'étude en développement. Les premiers travaux sur l'effet des hormones de libération des gonadotrophines (*gonadotropin-releasing hormone* ; GnRH) et des GTH sur les HT n'ont pas indiqués de tendance claire (Cyr et Eales, 1996) mais deux études récentes démontrent que les GnRH stimulent la sécrétion de T_4 par la glande thyroïde *in vivo* chez le *Channa gachua*, et deux espèces de carpes (Roy *et al.*, 2000), et chez les deux sexes d'un poisson plat (*Verasper moseri*), du saumon coho et du cyprin doré (Chiba *et al.*, 2004). Les GnRH semblent agir directement sur les thyrocytes puisqu'elles stimulent la biosynthèse dose-dépendante de T_4 par les follicules thyroïdiens isolés *in vitro* (Roy *et al.*, 2000, Chiba *et al.*, 2004) et n'induisent pas la sécrétion de la TSH chez le saumon coho (Larsen *et al.*, 1998). De

plus, la T₃ inhibe la transcription d'une forme des GnRH de poisson dans le cerveau du tilapia mâle (Parhar *et al.*, 2000), probablement via un TRE dans le promoteur de ce gène (Kitahashi *et al.*, 2005). T₃ réduit aussi la traduction des GnRH et la sécrétion de LH du poisson-chat d'Afrique (Swapna *et al.*, 2006). Ces études doivent être approfondies afin de comprendre la prévalence et les implications physiologiques de ces interactions.

La TSH, et peut-être aussi la TRH, joueraient un rôle particulier dans les gonades de poissons. Le récepteur de la TSH (TSHR) a été cloné dans les gonades du bar d'Amérique et sa séquence est identique au TSHR exprimé par la glande thyroïde (Kumar *et al.*, 2000). Ceci est la première étude qui signale la présence de ce récepteur dans les gonades d'un vertébré. Le TSHR est exprimé dans les cellules germinales de l'ovaire et du testicule et induit la transcription d'un gène rapporteur en présence de la TSH et de la LH ; un rôle de la TSH dans la gamétogenèse est alors proposée (Kumar *et al.*, 2000). Depuis, un TSHR fonctionnel a été cloné et identifié dans le testicule et l'ovaire du poisson-chat africain (Vischer et Bogerd, 2003) et le barbus de rivière (Goto-Kazeto *et al.*, 2003) et varie selon le stade de maturation dans le testicule et l'ovaire de la limande à queue jaune (Rahman *et al.*, 2003) mais n'était pas exprimé dans l'ovaire du saumon amago (Oba *et al.*, 2000). Quant à la TSH β , elle est exprimée de manière stade-spécifique dans les gonades de la limande à queue jaune (Rahman *et al.*, 2003) et dans l'ovaire de la truite arc-en-ciel (von Schalburg 2005). De plus, son expression gonadique est modifiée lors du changement de sexe de deux espèces d'épinéphèle (Wang *et al.*, 2004). Finalement, la TRH est surexprimée dans l'ovaire précoce de truite arc-en-ciel comparativement à l'ovaire normal (von Schalburg *et al.*, 2005). D'autres recherches sont nécessaires pour comprendre le rôle et le mode d'action de ces produits d'expression dans les gonades de poissons.

Chapitre II

Les modulateurs endocriniens du système thyroïdien des poissons

7. Les modulateurs endocriniens : une problématique mondiale

Plus de 80,000 composés chimiques d'origine anthropogénique sont utilisés quotidiennement à travers le monde, et un grand nombre de ceux-ci se retrouvent dans l'air, dans le sol, dans l'eau, et ce, dans tous les écosystèmes de la planète (Carpenter *et al.*, 2002). Plusieurs de ces contaminants ont la capacité d'interagir avec le système endocrinien, entre autres avec les hormones sexuelles et les HT ; ils sont alors nommés modulateurs endocriniens (ME). Les ME peuvent perturber la biosynthèse, la sécrétion, le transport, le métabolisme, la liaison, l'action et/ou l'élimination des hormones endogènes (Fisher, 2004). En ce faisant, elles peuvent dérégler diverses fonctions physiologiques de ces hormones, dont la croissance, le développement et la reproduction. Les effets des ME sont particulièrement inquiétants puisqu'ils peuvent affecter non seulement la santé d'un organisme mais aussi sa capacité reproductrice et la santé de sa progéniture, et ainsi nuire aux générations subséquentes d'une population (Fisher, 2004, Brown *et al.*, 2004b). Les ME agissent parfois par des voies multiples et parallèles, et plusieurs ME peuvent agir en concert pour produire des effets additifs, opposés ou peut-être même synergiques (Kortenkamp et Altenburger, 1999, Silva *et al.* 2002). De plus les effets des ME peuvent aussi être transmis le long de la chaîne alimentaire et de manière intergénérationnelle. Par exemple, la consommation de poissons exposés aux xénoestrogènes par des rates en période de lactation modifie la fonction reproductrice de sa progéniture mâle (Aravindakshan *et al.*, 2004b). De par le nombre de ME connus et potentiels présents dans l'environnement, la variété des organismes exposés et la complexité du système endocrinien, les écotoxicologues sont confrontés à un défi de taille sur ce dossier (Boudou and Ribeyre, 1997).

Les poissons sont particulièrement vulnérables aux ME puisqu'ils sont exposés à une soupe de contaminants aquatiques durant la totalité de leur cycle de vie. Les premières études chez les poissons se sont surtout penchées sur les xénoestrogènes, des ME qui agissent sur les hormones sexuelles. Les effets des xénoestrogènes sont observés chez plusieurs espèces (dont le doré jaune) à travers le monde, et affectent plusieurs paramètres du système reproducteur (Jobling *et al.*, 1998 ; Folmar *et al.*, 2001 ; Aravindakshan *et al.*, 2004a). La cascade des HT des poissons est aussi sensible aux effets directs des ME, en plus de subir des modifications via ses interrelations avec d'autres systèmes endocriniens ; entre autres, de nombreux xénoestrogènes modifient aussi les HT (Brown *et al.*, 2004b). Ainsi, depuis les années 90, le nombre d'études qui se penchent sur les ME agissant sur les HT se multiplie, tout comme les nouveaux outils d'études, surtout chez des modèles expérimentaux de rats, d'amphibiens et de poissons (DeVito *et al.*, 1999 ; Crane *et al.*, 2005 ; Degitz *et al.*, 2005 ; Opitz *et al.*, 2005 ; Lehigh Shirey *et al.*, 2006 ; Van der Ven *et al.*, 2006).

7.1. Implications pour la santé humaine

Les humains sont exposés aux ME dans l'environnement, notamment par l'alimentation. Plusieurs ME ont été mesurés dans les tissus, l'urine, le lait maternel et le sang (plasma et sang ombilical) d'humains, et ce, sur tous les continents (Koch *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2005, Schecter *et al.*, 2005). La consommation d'aliments contaminés par des ME (par ex., poissons des Grands Lacs), serait associée à la diminution des taux des HT (Persky *et al.*, 2001 ; Turyk *et al.*, 2006). De manière plus pointue, certaines études ont observé des corrélations négatives entre les taux d'HT et la concentration sanguine ou tissulaire de différents ME, surtout les biphényles polychlorés (BPC) et le plomb (Schell *et al.*, 2004 ; Boas *et al.*, 2006 ; Turyk *et al.*, 2006). Par contre, ces effets ne sont pas toujours constants et sont difficiles à isoler des multiples facteurs confondants, dont le fait que les humains sont toujours exposés à des mélanges de ME. La plupart des études se sont limitées à la mesure des taux d'HT, donc il n'est pas possible de dire si les faibles baisses des HT observées, qui demeurent à des niveaux physiologiques, ont des répercussions sur la santé. Par contre, à la lumière des expériences sur les animaux, l'hypothèse a été avancée que les processus physiologiques qui dépendent des HT, notamment le développement du

système nerveux central, seraient particulièrement à risque (Brouwer *et al.*, 1998 ; Colborn, 2002 ; Zoeller *et al.*, 2002 ; Boas *et al.*, 2006). L'étude des effets des ME sur les HT permet donc de mieux comprendre les mécanismes d'action des ME auxquels sont exposés les humains et la faune, et de développer des outils pour évaluer ces effets.

8. Sources et types de modulateurs thyroïdiens retrouvés en milieu aquatique

Depuis les années 70, de nombreux cas de modulation des HT ont été recensés chez des vertébrés exposés à des contaminants aquatiques, dont les oiseaux, les reptiles, les amphibiens, les mammifères (surtout marins) et les poissons (Rolland, 2000 ; Colborn, 2002 ; Brown *et al.*, 2004b). Chez les poissons, des changements histologiques sont souvent observés au niveau de la glande thyroïde (Rolland, 2000 ; Carletta *et al.*, 2002 ; Brown *et al.* 2004b). Brown et collaborateurs (2004b) ont effectué une revue détaillée des effets des ME sur la cascade des HT des poissons. La somme des études qu'ils ont sondées, ainsi que les travaux subséquents cités dans les prochaines sections, met en évidence la multitude de composés ayant la capacité de modifier la cascade des HT, ainsi que la variété de sources d'où proviennent ces ME.

8.1. Métaux et polluants organiques persistants (POP)

Les poissons exposés à des mélanges de contaminants retrouvés dans l'environnement présentent souvent des modifications de la cascade des HT (Brown *et al.*, 2004b). Ces mélanges comprennent généralement des métaux ainsi que des polluants organiques persistants (POP), tels les BPC, les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), les dioxines et les furanes et divers pesticides. Les métaux proviennent de sources naturelles, d'activités minières et industrielles, et se retrouvent dans plusieurs types d'effluents et d'émissions atmosphériques. Les POP ainsi que l'anion persistant du perchlorate sont soit produits pour diverses applications ou sont issus des sous-produits de procédés industriels. Finalement, les agents ignifuges qui reçoivent actuellement le plus d'attention sont le bisphénol A (BPA) et ses dérivés, et les *polybrominated diphenyl ethers* (PBDE). Bien que les concentrations de plusieurs POP ont beaucoup diminué depuis la mise en place de réglementations plus strictes, les taux des organohalogènes de nouvelle génération croissent toujours, tels ceux des

agents ignifuges. Ainsi, les POP se retrouvent tous de façon quasi-ubiquitaire dans l'environnement.

De manière générale, les mélanges environnementaux contenant des POP et des métaux diminuent les taux d'HT des poissons (Brown *et al.*, 2004b). De façon individuelle, les effets des ME sur la cascade des HT sont plutôt variables, ce qui n'est pas nécessairement surprenant compte tenu la variété d'espèces de poissons et de types, de concentrations, de durées d'exposition et de critères d'évaluation (*endpoints*) utilisées.

- Chez la plupart des vertébrés, les BPC, les HAP, les dioxines et les furanes diminuent les taux d'HT, un effet qui passerait entre autres par l'activation du cytochrome P 4501A (CYP1A) via le récepteur Ah (*aryl hydrocarbon receptor*). Par contre, les poissons seraient beaucoup moins sensibles à ces POP et à l'activation de cette voie, et présentent même parfois des élévations des taux d'HT (Brown *et al.*, 2004b ; Coimbra *et al.*, 2005). Par contre, le β -naphthoflavone, un inducteur du CYP1A, diminue le taux de T_4 libre (Teles *et al.*, 2005a).

- Les métaux cibleraient plus particulièrement les voies de régulation périphérique des HT, dont la désiodation (Brown *et al.*, 2004b). La plupart des métaux, dont le chrome et le cuivre, tendent à diminuer les taux d'HT, surtout la T_4 , un effet qui est accentué suite à une courte exposition au β -naphthoflavone (Teles *et al.*, 2005b). Les perchaudes adultes exposées toute leur vie à des mélanges de métaux lourds ont des taux de T_3 et de T_4 diminués en été ; cet effet n'est pas détecté chez les perchaudes d'un an et moins pris aux mêmes sites (Levesque *et al.*, 2003 ; Gravel *et al.*, 2005). L'arsenic, trouvé sous plusieurs formes dans l'environnement, n'a qu'un faible effet sur le système thyroïdien du poisson, puisque les changements histologiques de la glande thyroïde induits par l'ion arséniate sont transitoires et ne sont pas additifs aux effets du perchlorate (voir ci-dessous) (Liu *et al.*, 2006).

- L'action des pesticides organochlorés et organophosphorés touche directement la glande thyroïde, tel qu'indiqué par des coupes histologiques. Ces composés modifient probablement aussi la régulation périphérique, puisque dans plusieurs cas, le ratio $T_3:T_4$ est soit augmenté ou diminué (Brown *et al.*, 2004b ; dimecron : Thangavel *et*

al., 2005). Par exemple, l'Endosulfan, un pesticide organochloré, diminue les taux de T_4 et de rT_3 mais pas de T_3 , et provoque des modifications dans l'activité des déiodinases dans plusieurs tissus (Coimbra *et al.*, 2005). L'atrazine, un herbicide populaire, nuit aux mécanismes physiologiques qui permettent la transition vers l'eau salée du saumon d'Atlantique, un processus qui implique les HT, mais ce, sans modifier les taux de T_3 et de T_4 (Waring et Moore, 2004). L'herbicide ioxynil et le pentachlorophénol (PCP), un pesticide utilisé pour la préservation du bois, compétitionnent fortement avec la T_3 pour la liaison aux protéines de transport du saumon du Japon (Ishihara *et al.*, 2003). Finalement, les cours d'eau recevant le ruissellement des terres agricoles contiennent des mélanges de pesticides ; l'exposition à ce genre de mélange est associée avec une élévation des taux des HT chez le meunier noir de la Rivière Yamaska (Dorval *et al.*, 2005).

- Les effets délétères des agents ignifuges sur les HT ont surtout été observés chez les rats et les amphibiens (Darnerud, 1993; Kitamura *et al.*, 2005; Balch *et al.*, 2006), mais quelques études récentes suggèrent que les poissons seraient affectés de la même manière : la bioaccumulation d'un mélange de congénères de PBDE chez le touladi provoque une baisse du taux de T_4 qui persiste plusieurs mois après la fin de l'exposition (Tomy *et al.*, 2004). Bien qu'ils n'aient pas mesuré les taux d'HT, Timme-Laragy et collaborateurs (2006) ont observé des retards au niveau de l'éclosion et des déformations de la courbe de la queue chez des choquemorts exposés à de faibles doses de DE-71, un mélange commercial de PBDE. Ceci suggère la possibilité d'un dérèglement des HT puisque l'éclosion et la courbure de la queue sont reconnues comme étant reliées à l'action des HT. Un autre agent ignifuge, le BPA compétitionne avec la T_3 pour la liaison aux protéines de transport du saumon du Japon (Ishihara *et al.*, 2003).

- Bien que le perchlorate ne soit pas un polluant organique, il est persistant dans l'environnement et se retrouve dans plusieurs systèmes aquatiques et parfois dans l'eau potable. Le perchlorate est un anion généralement couplé à l'ammonium ou au sodium, et forme un ingrédient principal des propergols solides. Il est libéré dans l'environnement suite à son utilisation dans les roquettes, les munitions, les feux d'artifices, les coussins gonflables et autres procédés militaires et industriels (Brown *et al.* 2004b, Crane *et al.*, 2005). Le perchlorate inhibe l'incorporation de l'iode par la

glande thyroïde, et touche toute la cascade des HT. Il cause des changements histologiques tels l'hypertrophie et l'hyperplasie de la glande thyroïde, modifie les taux d'HT (habituellement vers le bas), et provoque des retards et des problèmes de développement chez les poissons (Brown, 1997 ; Manzon et Youson, 1997, 2002 ; Manzon *et al.*, 2001 ; Patino *et al.*, 2003 ; Bradford *et al.*, 2005 ; Crane *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2006).

8.2. Effluents municipaux

Les effluents municipaux contiennent des concentrations quantifiables de centaines de produits pharmaceutiques, d'entretien et de soins personnels, ainsi que des sous-produits de procédés industriels, dont les POP (Brown *et al.*, 2004b). La présence de xénoestrogènes dans ces effluents est bien connue. Par exemple, on y retrouve couramment de l'éthinylestradiol (EE2) et l'estrone, issus de l'utilisation des contraceptifs oraux, du BPA et des alkylphénols, une famille de surfactants présents dans les détergents, et de nombreuses autres solutions utilisées lors de procédés industriels (Aerni *et al.*, 2004, Servos *et al.*, 2005). Malgré l'interaction entre l'E₂ et le système thyroïdien des poissons (voir section 6.3.1), peu de travaux ont été réalisés sur l'effet des xénoestrogènes sur les HT des poissons (Brown *et al.*, 2004b). De plus, les xénoestrogènes font habituellement parti d'un mélange complexe où ils sont associés à plusieurs autres types de contaminants qui pourraient agir en concert sur la cascade des HT des poissons.

Récemment, il a été observé qu'une exposition à l'EE2 diminue l'expression hépatique de D1 et D2 de manière concentration-dépendante chez des femelles gravides du poisson zèbre (Hoffmann *et al.*, 2006). Chez le saumon d'Atlantique, un alkylphénol, le 4-nonylphénol (NP) inhibe l'adaptation à la salinité et la saumonification, qui est un processus qui implique les HT (voir section 6.1.2.) (Madsen *et al.*, 2004). De plus, cette inhibition est associée à une diminution dose-dépendante du taux de la T₄ sept jours après l'injection de NP, quoique la baisse du taux de T₃ n'est pas en constante en fonction de la dose (McCormick *et al.*, 2005). Ces premiers résultats ont été observés suite à une injection de NP mais une étude suggère que le NP administré par voie alimentaire serait éliminé rapidement par la voie

biliaire, et n'a donc aucun effet sur les taux d'HT (Keen *et al.*, 2005). Finalement, le NP, ainsi que l'octylphénol et le diéthylstilbestrol, compétitionnent avec la T₃ pour la liaison aux protéines de transport du saumon coho (Ishihara *et al.*, 2003).

Brown et collaborateurs (2004b) ont identifiés plusieurs produits pharmaceutiques et de soin personnel qui pourraient potentiellement modifier les HT des poissons. Cet effet a été confirmé chez le tilapia pour l'acide acétylsalicylique (ASA), un inhibiteur de la cyclooxygénase. En effet, une dose d'ASA suffisante pour réduire le taux de prostaglandine amène une baisse significative du taux plasmatique de la T₃ mais pas de la T₄ (van Anholt *et al.* 2003).

8.3. Effluents des usines de pâtes et papier

Les usines de pâtes et papier utilisent d'importantes quantités d'eau lors de leurs opérations et produisent des milliers de litres d'effluents à chaque jour. La plupart des effluents subissent un traitement primaire, lorsque les composés solides sont récoltés par décantation. Depuis les années 90, de plus en plus de pays, dont le Canada, exigent maintenant un traitement secondaire de nature biologique, qui réduit de façon importante la toxicité et la demande biologique en oxygène de l'effluent, en réduisant la teneur en acides gras et résineux, et en contaminants organiques, dont la majorité des BPC, des dioxines et des furanes (McMaster *et al.*, 2003) (voir section 11). Bien que les taux de plusieurs POP ont considérablement diminué dans ces effluents depuis la mise en place de traitement secondaires, des mélanges complexes de nombreuses substances utilisés lors des procédés de fabrication de la pâte et libérés par le bois se retrouvent dans l'environnement. De plus, plusieurs contaminants organiques produits avant les nouvelles réglementations demeurent stables dans les sédiments pendant plusieurs décennies (Kukkonen *et al.*, 1999). La présence de plusieurs types de contaminants est couramment observée dans les écosystèmes recevant ces effluents, entre autres dans les tissus des poisson : les acides résiniques, les phytoestrogènes (des xénoestrogènes dérivés des plantes) tels que le genistein, les phytostérols (particulièrement le β -sitostérol), les surfactants (dont le NP), les composés organiques chlorés, les pesticides (dont le PCP), le BSA, et les biocides (MacLatchy et

Van der Kraak, 1995 ; Kiparissis *et al.*, 2001 ; Sepúlveda *et al.*, 2001 ; Lacorte *et al.*, 2003).

Malgré le grand nombre de contaminants présents dans les effluents des usines de pâtes et papier qui pourraient modifier les HT, très peu d'équipes ont mesurés les effets de ces effluents sur les HT des poissons. Avant 1992, date de la mise en application de la loi canadienne sur les effluents, le taux de T₄ était plus élevé chez les meuniers noirs pris à proximité des effluents d'une usine ontarienne de pâte de sulfate blanchie (*bleached kraft mill effluent*, BKME) comparativement à un site de référence (Munkittrick *et al.*, 1991). Plus récemment, des carassins vivant dans un étang recevant des BKME ayant subi un traitement secondaire avaient des taux plus élevés de T₃ que ceux du site de référence, une différence qui était significative chez les mâles (n = 10-13) mais non chez les femelles (n = 4-5) (Kukkonen *et al.*, 1999). Par contre, des truites arc-en-ciel juvéniles exposées à des effluents traités ne démontraient aucun effet sur les taux d'HT, tandis qu'une exposition à une forte dose d'effluents non-traités causait une légère diminution de T₃ (Mattsson *et al.*, 2001). Chez l'omble commun au stade larvaire, un mélange de phytostérols contenant plus de 75% de β -sitostérol n'a pas modifié les taux d'HT (Honkanen *et al.*, 2005).

Parallèlement, il a été démontré à plusieurs reprises que les poissons exposés à des effluents d'usines de pâtes et papier démontrent des troubles de la reproduction, surtout chez les femelles. Les troubles observés, tels que les diminutions des taux de VTG et des hormones stéroïdiennes (chez les mâles et les femelles), la réduction de la taille des ovaires et des œufs, et les retards dans la maturation sexuelle (à l'intérieur d'une saison ou de la vie du poisson) sont généralisés aux usines de plusieurs pays. Ces effets sont diminués mais non éliminés par l'absence du chlore lors du blanchiment ou par l'amélioration des procédés de traitement des effluents (Gagnon *et al.*, 1995 ; Leblanc *et al.*, 1997 ; Munkittrick *et al.*, 1998 ; Janz *et al.*, 2001 ; Sepúlveda *et al.*, 2002, 2004 ; Sandström et Neuman, 2003). Les troubles observés sont causés par les ME par l'entremise d'un ou plusieurs mécanismes : en modifiant directement les cascades hormonales, en activant le CYP1A, en stimulant l'apoptose dans les ovaires, et en engendrant un stress oxydatif (Hewitt *et al.*, 2000 ; Janz *et al.*, 2001 ; Denslow *et al.*, 2003 ; Leusch et MacLatchy, 2003 ; Oakes *et al.*, 2003 ; Sepúlveda *et al.*, 2004). Parallèlement, les poissons exposés aux BKME démontrent

souvent un taux de croissance accéléré, et sont significative plus gros au moment de leur première maturation (Gagnon *et al.*, 1995 ; Sandström et Neuman, 2003 ; Lowell *et al.*, 2005). La combinaison des troubles du développement sexuel avec une croissance avantagée suggère que les HT pourraient très bien être impliquées directement ou indirectement dans ces effets ; cette hypothèse restent à confirmer.

9. Mode d'action et biomarqueurs des modulateurs du système thyroïdien

Les contaminants qui modifient les HT peuvent cibler un ou plusieurs des compartiments de la cascade présentée dans la Figure 2, dont la régulation centrale, le transport, la régulation périphérique (désiodation ou élimination), ainsi que l'activité de la T_3 au niveau de son récepteur. De plus, les voies de rétroaction biologique tendent à redresser le taux physiologique de ces hormones en cas de perturbation de l'homéostasie, ce qui complique l'interprétation des résultats observés (Eales et Brown, 1993 ; Brown *et al.*, 2004a, 2004b ; Crane *et al.*, 2006). Deux revues présentent en détail le choix des mesures de l'état thyroïdien dans l'étude des contaminants sur les HT des poissons, et suggèrent particulièrement l'intérêt d'inclure l'activité et/ou l'expression des déiodinases (Eales et Brown, 1993 ; Eales *et al.*, 1999). Puisque les HT interagissent avec plusieurs systèmes chez les poissons, les effets observés sur les HT pourraient découler de l'action directe du contaminant sur la cascade des HT ou encore d'un effet indirect (Brown *et al.*, 2004b). En d'autres termes, si le ou les composés en question modifient un processus physiologique relié aux HT, par exemple l'alimentation et la régulation d'autres hormones, une modulation des HT pourrait éventuellement apparaître (voir section 6). Il est donc impératif de tenir compte de l'état physiologique du poisson, particulièrement lors des périodes de développement, de croissance et de reproduction, qui impliquent tous l'action des HT. Ces périodes pourraient d'ailleurs être particulièrement vulnérables à l'action des modulateurs des HT (Power *et al.*, 2001 ; Brown *et al.*, 2004a, 2004b).

De par toutes ces difficultés d'interprétation, la majorité des études se contentent de comparer les changements dans l'état thyroïdien entre des poissons exposés et un groupe de référence. Puisqu'il est difficile de déterminer le mode d'action des contaminants sur la cascade des HT avec un seul biomarqueur, une suite de biomarqueurs qui comprend la mesure d'effets à plusieurs étapes de la cascade est

recommandée, telle que celle proposée par Eales *et al.* (1999), ce qui permet de cibler le ou les compartiments affectés (Brown *et al.*, 2004a, 2004b). Le développement de nouveaux types de biomarqueurs, ainsi des tests *in vitro*, serviraient à approfondir l'interprétation des effets des modulateurs des HT, et à élucider les modes d'action de ces contaminants (DeVito *et al.*, 1999; Eales *et al.*, 1999 ; Brown *et al.*, 2004b).

9.1. Biomarqueurs du dérèglement de la cascade des HT chez les poissons

L'axe hypothalamo-hypophysaire de la cascade des HT est sensible aux contaminants. Un examen histologique de la glande thyroïde permet d'évaluer la morphologie de la glande, la hauteur des thyrocytes, le volume du colloïde et l'aire des follicules (Eales et Brown, 1993 ; Bradford *et al.*, 2005). Ces paramètres sont des biomarqueurs d'un changement au niveau de la régulation centrale mais ne permettent pas d'évaluer si les taux d'HT circulants ont été modifiés ou si l'homéostasie a été maintenue (Eales *et al.*, 1999, Brown *et al.*, 2004b). La mesure des taux plasmatiques (ou sériques) des HT (généralement T_3 et T_4 , et parfois rT_3) par radioimmunoessai (RIA), est probablement le critère d'évaluation le plus souvent utilisé actuellement pour évaluer l'effet d'un contaminant sur la cascade des HT. Ces taux intègrent la biosynthèse de T_4 , la désiodation dans les tissus qui libèrent la T_3 (et la rT_3) dans le sang, la clairance des HT, et indiquent la disponibilité des HT au niveau de l'organisme. Par contre, l'analyse des HT nécessite un certain volume de sang, à la faute duquel il faut extraire les HT des tissus des poissons (Crane *et al.*, 2004). L'interprétation de ces taux est aussi compliquée par le nombre de voies qui contribuent au maintien de l'homéostasie des HT, ainsi que par les variations physiologiques des HT, qu'elles soient quotidiennes, saisonnières ou reliées à un stress ou au cycle biologique (Cyr *et al.*, 1998 ; Leiner *et al.*, 2003).

Le taux plasmatique de l'hormone active T_3 et sa production locale au sein d'un tissu ou de la cellule étant dépendants de la désiodation, il est d'un grand intérêt d'étudier l'effet de contaminants sur l'activité des déiodinases (Eales *et al.*, 1999). De plus, tel que discuté à la section 4.1.4, les déiodinases participent activement à la régulation périphérique des HT en cas d'hypo- et d'hyperthyroïdie. Chez les poissons, l'activité des déiodinases (ORD : D1 et D2 ; IRD : D3) dans divers tissus (foie, cerveau, branchies, rein) est sensible aux contaminants aquatiques tels certains congénères des

BPC, les pesticides, et les métaux (Waring et Brown, 1997 ; Chaurasia et Kar, 1999 ; Adams *et al.*, 2000 ; Brown *et al.*, 2004b ; Coimbra *et al.*, 2005). Chez d'autres espèces, dont le rat, la poule et le *Xenopus laevis*, la désiodation est aussi modifiée par ces contaminants, ainsi que par les dioxines, l'hexachlorobenzène, le NP, d'autres xénoestrogènes, et certains produits pharmaceutiques (Schuur *et al.*, 1997 ; Gould *et al.*, 1999 ; Wade *et al.*, 2002 ; Schmutzler *et al.*, 2004 ; Alvarez *et al.*, 2005 ; Eravci *et al.*, 2005 ; Beck *et al.*, 2006). Par contre, l'évaluation de l'activité des déiodinases ne permet pas de conclure si le contaminant agit directement sur l'enzyme ou si la modification de l'activité survient pour compenser la baisse (ou la hausse) du taux d'hormone, comme l'a suggéré Beck et ses collaborateurs (2006).

Certains contaminants pourraient aussi agir sur les voies métaboliques des HT, en activant ou en inhibant les enzymes de conjugaison des HT (voir section 4.2). Par exemple, l'action des ST du poisson zèbre peut être inhibée par des phytoestrogènes, et les dioxines et les BPC coplanaires activent les UDPGT et le CYP 1A pour diminuer les taux d'HT chez le rat (Ohkimoto *et al.*, 2004 ; Nishimura *et al.*, 2005 ; Fisher *et al.*, 2006). Il reste à démontrer si les xénobiotiques peuvent ainsi causer un dérèglement des HT des poissons (Brown *et al.*, 2004b).

À l'instar des xénoestrogènes et du récepteur aux estrogènes, les modulateurs thyroïdiens pourraient aussi mimer la T_3 au niveau des récepteurs nucléaires et ainsi stimuler l'expression de gènes sous le contrôle de HT. Par contre, aucun gène T_3 -dépendant n'a été identifié jusqu'à maintenant chez les poissons qui servirait de biomarqueur *in vivo* fiable, semblable à la VTG pour les xénoestrogènes (voir section 9.1.1.). Certaines équipes ont alors choisi d'évaluer l'effet des xénobiotiques sur les processus physiologiques HT-dépendants, par exemple, le développement, la métamorphose, la saumonification, le comportement, ainsi que l'angiogenèse (Brown, 1997 ; Manzon *et al.*, 2001 ; Crane *et al.*, 2005, 2006 ; McCormick *et al.*, 2005 ; Liu *et al.*, 2006 ; Timme-Laragy *et al.*, 2006 ; Van der Ven *et al.*, 2006). Ce genre d'évaluation est de plus en plus utilisé avec le *Xenopus laevis*, chez qui la métamorphose est très sensible aux modulateurs des HT (Degitz *et al.*, 2005 ; Opitz *et al.*, 2005).

Certains tests *in vitro* aident à mieux comprendre le mode d'action des ME, bien qu'on perd l'intégration de la toxicocinétique (absorption, distribution, métabolisme, élimination) qui définit le potentiel d'action du contaminant (Sugiyama *et al.*, 2005). Des analyses de compétition permettent d'identifier les xénobiotiques qui compromettent ou déplacent la liaison entre les HT et leurs protéines de transport, favorisant ainsi l'élimination du surplus des HT libres que se retrouve dans le sang (Ishihara *et al.*, 2003 ; Marchesini *et al.*, 2006). Les tests *in vitro* sont aussi utiles pour identifier les composés qui ont un effet agoniste ou antagoniste envers les TR, c'est-à-dire qu'ils peuvent imiter la T₃ ou inhiber l'action de la T₃ au niveau du complexe transcriptionnel (Moriyama *et al.*, 2002). Une lignée cellulaire issue d'une tumeur adénohypophysaire de rat, la GH3, libère la GH et prolifère de manière T₃-dépendante, indique si un contaminant peut se lier aux TR (Gutleb *et al.* 2005 ; Kitamura *et al.*, 2005). Un autre moyen d'évaluer l'activité d'un contaminant sur la transcription de gènes T₃-dépendant est l'incorporation d'un gène rapporteur, tel que la luciférase, couplé à un TRE dans une lignée cellulaire qui exprime les TR (Yamada-Okabe *et al.*, 2004 ; Sugiyama *et al.*, 2005). Par contre, la plupart de ces tests *in vitro* ont été développés chez des modèles animaux tels le rat ou la souris, et plus récemment chez le *Xenopus*. Puisqu'il existe des différences entre les protéines de transport, les voies métaboliques et les TR des mammifères et ceux des poissons, ces outils sont limités dans l'évaluation des xénobiotiques sur les HT des poissons.

9.1.1. Biomarqueurs moléculaires

Depuis quelques années, l'utilisation de l'expression de gènes en tant que biomarqueurs moléculaires pour étudier les effets de ME devient de plus en plus fréquente. Les avantages de ce genre d'outil sont nombreux : ils permettent d'évaluer de manière très sensible l'effet d'une exposition *in vivo* sur l'expression d'un gène ou d'une suite de gènes, nécessitent peu de tissus pour l'extraction d'ARN, et aident à cibler les modes et les sites d'action des contaminants (Denslow *et al.*, 2004 ; Opitz *et al.*, 2005 ; Hoffmann *et al.*, 2006 ; Hook *et al.*, 2006 ; Lehigh Shirey *et al.*, 2006).

Aucun gène n'a jusqu'à maintenant été identifié et validé en tant que biomarqueur moléculaire d'une modulation des HT chez les poissons, bien que les déiodinases ont été suggérées (Eales *et al.*, 1999). Tel que discuté dans la section 4.1.4, l'expression

des trois déiodinases est modifiée chez les poissons en état d'hypo- ou d'hyperthyroïdie (Van der Geyten *et al.*, 2001 ; Garcia-G *et al.*, 2004 ; Bres *et al.*, 2006). Chez des femelles gravides du poisson zèbre, une exposition à l'EE2 diminue l'expression hépatique de D1 et D2 de manière concentration-dépendante (Hoffmann *et al.*, 2006). De plus, la D2 est plus exprimée dans le foie de choquemorts vivants dans un site hautement contaminé, quoique cette différence s'est avérée non-significative lors d'analyses subséquentes (Meyer *et al.*, 2005). Chez les têtards de *Xenopus* en métamorphose, l'expression de D2 et D3 est diminuée par un traitement aux BPC tandis que la TTR est surexprimée (Lehigh Shirey *et al.*, 2006). Le pesticide acetochlor, à son tour, diminue l'expression de D3 dans la queue du *Xenopus* lorsque la métamorphose est induite par un traitement aux HT (Crump *et al.*, 2002).

D'autres gènes candidats ont été proposés. Toujours chez le *Xenopus*, l'expression du gène TR β est sensible aux BPA, à divers composés phénoliques et à l'acetochlor (Crump *et al.*, 2002 ; Iwamuro *et al.*, 2003 ; Kudo and Yamauchi, 2005 ; Opitz *et al.*, 2005). Les techniques de l'écotoxicogénomique, par exemple les macro- ou les microréseaux d'ADNc, permettent de mesurer l'expression de centaines ou de milliers de gènes à la fois suite à l'exposition à des contaminants environnementaux (Crump *et al.*, 2002 ; Denslow *et al.*, 2004 ; Hoffmann *et al.*, 2006 ; Hook *et al.*, 2006). Contrairement aux résultats de microréseaux de l'équipe de Hoffmann (2006) confirmés par PCR quantitatif chez les femelles gravides du poisson zèbre, Hook et collaborateurs (2006) n'ont pas observé de modulation pour D1 ou D2 chez des truites arc-en-ciel mâles suite à une exposition à l'EE2. De plus, D1 ou D2 n'ont pas été modulées suite à l'exposition d'autres composés dont le chrome et un agent ignifuge (BDE-47) (Hook *et al.*, 2006).

Dans leur ensemble, les biomarqueurs moléculaires demeurent un outil en développement, et d'autres études sont nécessaires afin de perfectionner les techniques et l'interprétation des résultats obtenus, afin de cibler les gènes qui apportent des informations significatives (Lettieri, 2006).

Chapitre III

Le doré jaune et la Rivière des Outaouais

10. Le doré jaune

10.1. Distribution et cycle biologique du doré jaune

Membre de la famille des percidés, le doré jaune (*Sander vitreus*) est à la fois abondant et répandu : sa distribution s'étend, au sud, à partir du bassin du Mississippi et, au Canada, du Québec jusqu'aux Territoires du Nord-Ouest (Figure 4). Il préfère les eaux turbides des lacs peu profonds, c'est-à-dire où l'eau n'est pas trop froide (Colby 1979). Par contre, il est aussi présent dans les rivières et dans les lacs clairs, en autant qu'il puisse y trouver un refuge de la lumière du jour. Il est par ailleurs commun tout au long de la Rivière des Outaouais, où il occupe une place centrale dans la chaîne alimentaire.

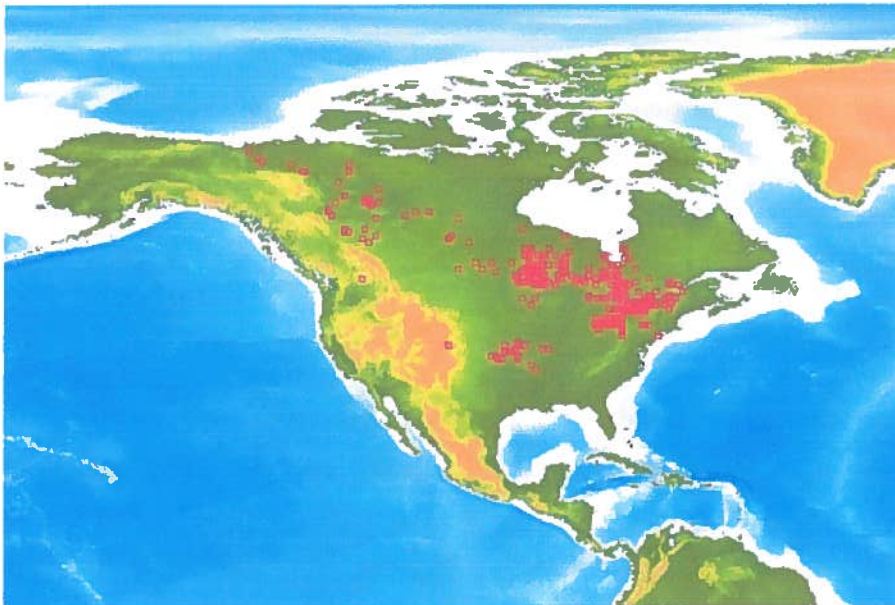


Figure 4 : Distribution du doré jaune en Amérique du nord

Carte générée par le répertoire de Fishbase (www.fishbase.org, consulté le 12 juillet 2006)

En effet, le doré jaune adulte est un piscivore vorace et peu sélectif, ce qui maximise son bénéfice énergétique et lui permet une croissance accélérée (Graeb *et al.*, 2005). Il apprécie particulièrement les perchaudes (*Perca flavescens*) et autres poissons fourrages de la famille des percidés et des cyprinidés (Vander Zanden *et al.*, 1997), et peut cannibaliser ses cousins de petite taille si d'autres sources de nourritures se font rares. À l'état larvaire et juvénile, il consomme plutôt du zooplancton, des larves d'insecte et des macroinvertébrés benthiques, jusqu'à ce qu'il atteigne une taille qui lui permette d'ajouter les petits poissons à son menu (Galarowicz et Wahl 2005). Pour ce qui est de ses prédateurs, notons le brochet (*Esox lucius*), le maskinongé (*Esox masquinongy*), en plus du pêcheur.

Atteignant jusqu'à 80 cm de longueur, le doré jaune peut vivre au-delà de 20 ans, quoique la taille et l'âge maximal de chaque population varient grandement selon les régions (Henderson *et al.*, 2003). La régulation du cycle annuel de reproduction du doré jaune par les stéroïdes sexuels est conforme à ce qu'on observe chez d'autres espèces de poisson, avec quelques exceptions (Malison *et al.*, 1994). Tel que la plupart des autres téléostéens d'eau douce, le doré jaune présente une forte augmentation du taux d'E₂ au début de la vitellogénèse et de testostérone au moment de la spermatogénèse, en parallèle avec l'augmentation de l'index gonadosomatique (Malison *et al.*, 1994, Henderson *et al.*, 1996). La particularité du doré jaune est que la croissance gonadique débute plus tôt que chez les autres poissons qui fraient au printemps (avril-mai). La croissance gonadique débute en septembre chez les mâles et en d'octobre chez les femelles, plutôt que vers la fin de l'hiver (Malison *et al.* 1994).

Les dorés jaunes femelles ont un taux de croissance plus élevé que les mâles, ce qui leur permet d'emmagasiner la grande quantité d'énergie nécessaire à la production d'œufs pour la fraie printanière (Henderson *et al.*, 2003; Shuter *et al.*, 2005). L'investissement énergétique dans la reproduction (plutôt que dans la croissance somatique) est moindre chez les grands prédateurs, tels le doré jaune, que chez les espèces qui occupent un rang plus bas dans la chaîne alimentaire (Shuter *et al.*, 2005). En conséquence, si les dorés jaunes femelles n'accumulent pas de réserves d'énergie suffisantes au début de l'automne, leurs gonades ne se développent pas et les femelles demeurent immatures (Henderson *et al.*, 1996). Ainsi, les femelles matures sont plus

grosses que les mâles du même âge, et leur première maturation sexuelle survient à un âge plus avancé, vers 4-5 ans plutôt que vers 2-3 ans (Henderson et Morgan, 2002).

Le doré jaune est sensible aux ME puisque ses hormones sexuelles sont modifiées par la présence de xénoestrogènes dans les effluents municipaux, même que les mâles exposés à ces effluents expriment la VTG (Folmar *et al.*, 2001). Par contre, à la connaissance de l'auteur, aucun travail n'a été publié sur les taux ou la cascade des HT de cette espèce, ni sur l'effet des ME sur sa cascade thyroïdienne.

10.2. Importance écologique et économique

En tant que grand prédateur, le doré jaune exerce une influence dite descendante (« top-down ») sur la chaîne alimentaire, modifiant la structure des populations de ses proies. Plusieurs études démontrent que l'abondance, la structure des classes d'âge, la distribution des tailles et le taux de croissance des perchaudes varie selon la présence et l'abondance du doré jaune (Hartman et Margraf 1993 ; Olson *et al.*, 2001 ; Bertolo et Magnan 2005). Outre les percidés, le doré jaune peut exercer un effet direct ou indirect (p. ex., lorsque le prédateur s'intéresse préférentiellement à une autre espèce) sur plusieurs espèces, dont le meunier noir (*Catostomus commersoni*) et les poissons forages (Bertolo et Magnan 2005).

Du point de vue économique, la pêche du doré jaune est une activité de grande envergure. En 2000, le doré jaune fut l'espèce la plus fréquemment pêchée en Ontario, avec des prises de plus de 18 millions de poissons par jour. Les pêcheurs sportifs de cette province affirment préférer cette espèce aux autres poissons et y consacrent 25 % de leurs jours de pêche (Gouvernement de l'Ontario, 2005). En plus des retombées économiques qui découlent de la pêche sportive, la pêche commerciale de doré jaune est une industrie viable dans certaines régions. Par exemple, au Manitoba, le doré jaune est l'espèce commerciale la plus importante en terme de production et de revenus, avec plus de 21 millions \$ CA rapportés pour l'année 2000-2001 (Government of Manitoba, 2003). Suivant l'importance économique de cette espèce, des programmes de gestion des populations ont été mis en place, entre autres dans les Grand Lacs.

11. La Rivière des Outaouais

La Rivière des Outaouais, longue de 1271 km, sert de frontière entre l'Ontario et le Québec avant de se déverser dans le fleuve Saint-Laurent avec un débit annuel moyen de 2 000 m³/s (Gouvernement du Québec, Ministère de l'Environnement et de la Faune (GQ-MEF), 1996) (Figure 5). La Rivière est bordée d'environ 250 communautés où vivent 1,7 million habitants, dont plus de la moitié dans les municipalités d'Ottawa et de Gatineau (Sentinelle Outaouais, 2006). Outre l'usage domestique de ces habitants, de nombreuses industries profitent de la Rivière des Outaouais et de son bassin versant : des milliers de fermes, plus de 50 centrales hydro-électriques (dont cinq grands barrages sur la Rivière des Outaouais), neuf usines de pâtes et papier (dont six sur la Rivière) et une installation de recherche et de développement nucléaire : les Laboratoires de Chalk River, dirigés par l'Énergie atomique du Canada limitée (EACL). De plus, plusieurs municipalités déversent leurs eaux usées dans la Rivière des Outaouais, par l'entremise de plus de 90 usines de traitement des eaux et même parfois sans traitement (GQ-MEF, 1996 ; Sentinelle Outaouais, 2006). Toutes ces activités ont un impact sur la santé environnementale de la Rivière des Outaouais, en plus des sources de pollution non ponctuelles (ruissellement, dépôts atmosphériques etc.).

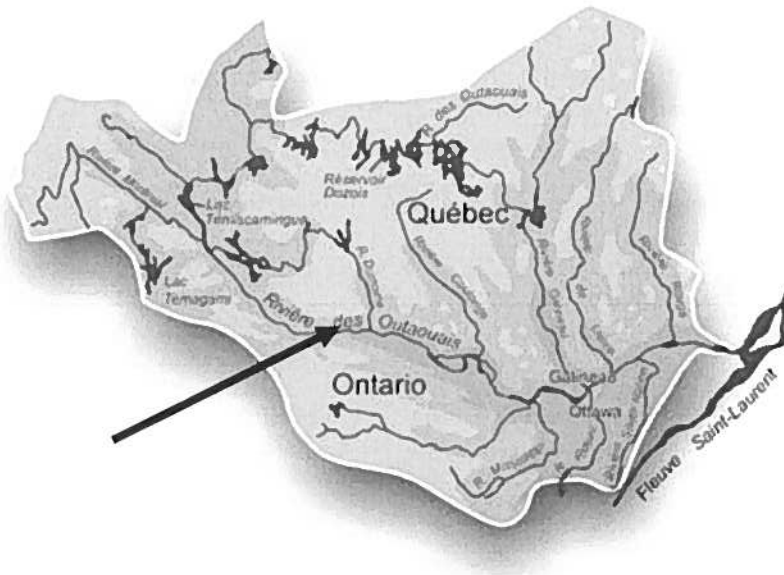


Figure 5 : Carte de la Rivière des Outaouais

(Ressources naturelles du Canada, http://geoscape.nrcan.gc.ca/ottawa/river_f.php, consulté le 12 juillet 2006).

Les usines de traitement des eaux municipales et les usines de pâtes et papier sont donc les principales sources ponctuelles de ME dans la Rivière des Outaouais. Les effluents de ces usines sont d'ailleurs concentrés dans la zone la plus peuplée du bassin versant, amenant une détérioration de la qualité de l'environnement aquatique en aval des villes d'Ottawa et de Gatineau (GQ-MEF, 1996 ; Direction de la Santé Publique de l'Outaouais (DPSO), 1999, Sentinelles Outaouais 2006). Notamment, cinq des six usines de pâtes et papiers sur la Rivière se situent à proximité des villes d'Ottawa et de Gatineau et produisent des milliers de mètres cubes d'effluents à chaque jour (Tableau 6). La mise à jour des procédés de traitement et les études de suivi des effluents d'usines de pâtes et papiers se sont soldées par une amélioration considérable de la qualité des effluents au Canada depuis l'adoption de lois fédérales, soit une première loi en 1971, suivi du Règlement sur les effluents des fabriques de pâtes et papiers, de la *Loi sur les Pêches*, en vigueur depuis 1992 (McMaster *et al.*, 2003 ; Lowell *et al.*, 2005). Par exemple, suivant le traitement primaire (décantation), la mise en place obligatoire d'un procédé de traitement secondaire (biologique) des effluents par les usines de la région a permis de diminuer considérablement la toxicité et la demande biologique en oxygène de l'effluent, ainsi que la présence de BCP, de dioxines et de furanes (DPSO, 1999 ; McMaster *et al.*, 2003). Par contre, la mise en application des règlements est inégale et les infractions sont rarement punies par le gouvernement (DPSO, 1999 ; Sentinelle Outaouais, 2006).

Tableau 6 : Usines de pâtes et papier déversant leurs effluents dans la Rivière des Outaouais (DPSO, 1999 ; Sentinelle Outaouais, 2006)

Usine	Lieu ^b	Débit d'effluent - 2002 (m ³ /jour)	Type de traitement secondaire
Bowater Produits forestiers	Gatineau, QC	72 246	Non disponible (ND)
Smurfit-Stone	Portage-Du-Fort, QC	67 355	Étangs aérés
Fraser Papers	Thurso, QC	70 632	Boues activées
Papier Masson	Masson-Angers, QC	29 991	Boues activées
Papiers Scott	Hull, QC	11 965	Avec Domtar
Domtar ^a (précédemment E.B. Eddy)	Ottawa, ON	28 900	Bio-filtration
Tembec/Spruce Falls	Témiscamingue, QC	158 264	ND

^aDomtar annonce en novembre 2005 la fermeture permanente de deux des trois machines à papier de cette usine (Domtar, 2005).

^bQuébec (QC), Ontario (ON)

Quant aux eaux usées municipales, d'importants investissements dans les infrastructures de la région ont permis une amélioration dans la qualité des effluents depuis 1979, dont des réductions d'agents pathogènes, de la demande en oxygène, et de la surcharge des éléments nutritifs (GQ-MEF, 1996 ; Direction de la santé publique de l'Outaouais, 1999 ; Sentinelles Outaouais, 2006). Par contre, comme il a été reconnu au Canada et à travers le monde, même les effluents municipaux traités contiennent des centaines de composés différents, dont les xénoestrogènes, les produits pharmaceutique et de nombreux autres contaminants d'origine domestique qui sont reconnus en tant que ME (voir section 8.2). À noter, aucunes données ne sont actuellement disponibles sur les taux de contaminants spécifiques dans la Rivière des Outaouais.

12. Le doré jaune de la Rivière des Outaouais

Le doré jaune est présent tout au long de la Rivière des Outaouais, ainsi que dans plusieurs lacs et rivières du bassin versant. Des indications anecdotiques de la part de pêcheurs sportifs suggèrent l'apparition d'anormalités, depuis une dizaine d'années, chez les dorés jaunes pris dans la Rivière en aval des villes de Gatineau et d'Ottawa (Henri Fournier, communication personnelle). Ils rapportent que les femelles de grande taille, qui auraient normalement des gonades matures remplies d'œufs, étaient toujours immatures. La suivie des populations par la Direction de l'aménagement de la faune de l'Outaouais, du Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune du Québec (MRNF), a permis de confirmer cette observation. Les biologistes du MRNF ont noté l'état de maturité sexuelle selon l'âge des poissons, déterminé à partir des anneaux des otolithes. Ainsi, les dorés jaunes femelles en aval d'Ottawa et de Gatineau atteignent la maturité sexuelle trois à quatre ans après leur consœurs en amont, c'est-à-dire entre l'âge de sept et huit ans plutôt qu'à l'âge normal de quatre ou cinq ans (Figure 6A). Aucun retard n'a été relevé dans la maturation des mâles, qui sont prêts à frayer à l'âge attendu, vers deux ou trois ans (Figure 6B). La cause de ce retard chez les femelles n'est pas connue.

De par le rôle que jouent les HT dans la maturation sexuelle des poissons femelles, il est proposé qu'un dérèglement des HT pourrait être relié à ce retard. Le but de ces

travaux de recherche présentés dans ce mémoire est donc d'évaluer si les HT sont modifiées chez le doré jaune de la Rivière des Outaouais en aval d'Ottawa et de Gatineau, et de développer de nouveaux outils pour étudier l'effet des ME sur les HT des poissons.

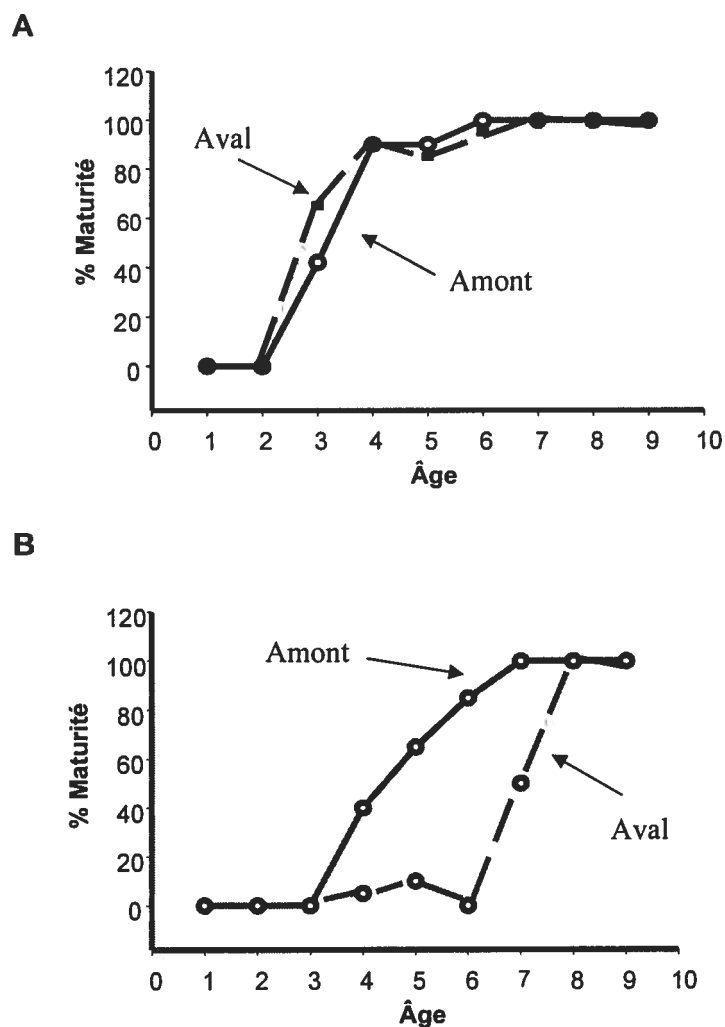


Figure 6 : Relation entre l'âge et la maturité sexuelle du doré jaune de la Rivière des Outaouais

L'âge à la maturité des mâles (A) et des femelles (B) a été comparé en amont et en aval de Gatineau et Ottawa. (Source : MRNF).

DEUXIÈME PARTIE

ARTICLE

Contribution de l'étudiante

L'auteur de ce mémoire a effectué toutes les expériences dans l'article qui suit, à l'exception de l'échantillonnage des dorés jaunes dans la Rivière des Outaouais, qui fut effectué en octobre 2003, avant le début de la maîtrise de l'étudiante. L'échantillonnage des dorés jaune en mars 2006, ainsi que les analyses d'hormones par radioimmunoessai (RIA), la conception des amorces dégénérées, le clonage des déiodinases, l'optimisation des protocoles de PCR (*touchdown*, régulier et en temps réel), et l'analyse des données furent tous effectués par l'étudiante sous la supervision de son directeur de recherche.

Résumé en français

Les hormones thyroïdiennes (HT) jouent un rôle dans l'initiation de la maturation ovarienne des poissons. Ainsi, un retard dans la maturation sexuelle des dorés jaunes femelles (*Sander vitreus*) exposés à un mélange de contaminants dans la Rivière des Outaouais suggère la présence de modulateurs endocriniens. Les objectifs de cette étude étaient d'évaluer les effets du mélange de contaminants dans la Rivière des Outaouais sur les HT de dorés jaunes immatures et de développer un biomarqueur moléculaire de l'état thyroïdien chez le doré jaune. Des dorés jaunes ont été capturés dans la Rivière des Outaouais à Deep River, un site de référence, à Rivière Blanche, en aval de l'émissaire des usines de traitement des eaux usées d'Ottawa et de Gatineau, et à Plaisance, en aval d'une usine de pâtes et papier. Comparativement à Deep River, les dorés jaunes à Plaisance avaient un taux plasmatique de thyroxine (T_4) deux fois plus élevé, un taux de triiodothyronine (T_3) 1,5 fois plus élevé, et un ratio molaire $T_3:T_4$ diminué de 50%. Le taux plasmatique de T_3 était aussi 1,5 fois plus élevé à Rivière Blanche qu'à Deep River. Trois déiodinases, une famille d'enzymes responsable de la conversion de la pro-hormone T_4 en T_3 , l'HT active, ainsi que de l'inactivation de ces deux hormones, furent partiellement clonées chez le doré jaune. L'expression de l'ARN messager des déiodinases a été évaluée par PCR en temps réel. Les taux hépatiques d'ARNm des déiodinases de type I et de type III n'étaient pas modifiés entre les sites, tandis qu'ils étaient augmentés pour la déiodinase de type II à Rivière Blanche comparé aux autres sites. La réponse de ce nouveau biomarqueur moléculaire diffère de ce qui était attendu selon les effets d'une hyperthyroïdie expérimentale sur l'expression des déiodinases d'autres poissons ; ceci suggère que d'autres paramètres sont nécessaires afin d'interpréter des changements dans les taux plasmatiques des HT chez les poissons exposés à des contaminants environnementaux.

THYROID DISRUPTION IN WALLEYE (*SANDER VITREUS*) EXPOSED TO ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS: CLONING AND USE OF IODOTHYRONINE DEIODINASES AS MOLECULAR BIOMARKERS

Michelle Picard-Aitken,¹ Henri Fournier,² Richard Pariseau,² David J. Marcogliese,³
and Daniel G. Cyr^{1*}

¹INRS-Institut Armand-Frappier, Université du Québec, Pointe-Claire, QC, H9R 1G6 Canada; ²Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune, Gatineau, QC, J8Y 3R7 Canada; Fluvial Ecosystem Research - St. Lawrence Centre Research Group, Environment Canada, Montreal, QC, H2Y 2E7 Canada

Short title: Thyroid disruption and deiodinases in walleye

Keywords: Thyroid hormones; Fish; Teleost; Endocrine disruptors; Deiodinase; cDNA

*Address for correspondence:

Dr. Daniel G. Cyr
INRS-Institut Armand-Frappier
Université du Québec
245, Hymus boul.
Pointe-Claire, QC, H9R 1G6
Canada
Email: daniel.cyr@iaf.inrs.ca
Tel. (514) 630-8833
Fax (514) 630-8850

Abstract

Thyroid hormones play a role in the initiation of ovarian maturation in fish. Thus, reports of delayed sexual maturation in female walleye (*Sander vitreus*) exposed to multiple contaminants in the Ottawa River suggest the presence of endocrine disrupting chemicals. The objectives of this study were to assess the effects of environmental contaminants in the Ottawa River on thyroid hormones of immature walleye and to develop a molecular biomarker of thyroid status. Walleye were sampled in the Ottawa River at Deep River, a reference site, at Rivière Blanche, downstream from the Ottawa and Gatineau municipal wastewater treatment plants outflows, and at Plaisance, downstream from a pulp and paper mill. Plasma thyroid hormone levels were measured by radioimmunoassay. Walleye at Plaisance had 2-fold elevated levels of thyroxine (T_4) and 1.5-fold elevated levels triiodothyronine (T_3), whereas the molar ratio of $T_3:T_4$ was reduced by over 50% compared to Deep River. Plasma T_3 levels were also elevated by approximately 1.5-fold at Rivière Blanche. Three iodothyronine deiodinases, a family of enzymes responsible for converting the prohormone T_4 to biologically active T_3 , as well as for inactivating these two hormones, were partially cloned in walleye. A real-time PCR assay of deiodinase expression indicated that hepatic mRNA levels of type I and type III deiodinase were not modified between sites, whereas they were increased for type II deiodinase at Rivière Blanche as compared to the other sites. The response of this novel molecular biomarker indicates a divergence with that expected based on the effects of experimentally-induced hyperthyroidism on fish deiodinase expression; additional endpoints are therefore necessary to interpret changes in thyroid hormones levels in fish exposed to environmental contaminants.

Introduction

The presence and effects of endocrine disrupting chemicals (EDC) in the environment are a growing concern. Many EDCs target thyroid hormones (TH), which play a permissive role in development, growth and reproduction of fish (Cyr & Eales 1996; Power *et al.* 2001; Brown *et al.* 2004). Fish are often used to indicate the presence of xenoestrogens, but their use as sentinels of TH disrupting chemicals remains to be developed (Brown *et al.* 2004).

Fish in the Ottawa River are exposed to a complex mixture of EDCs from several sources, such as agricultural run-off, outflows from municipal sewage treatment plants, and pulp and paper mills. These outflows are concentrated in or near the adjacent cities of Ottawa and Gatineau. Recent population surveys have revealed delays of 3-4 years in the sexual maturation of female walleye (*Sander vitreus*) downstream from these sites (H Fournier and R Pariseau, unpublished observation). As TH are involved in several aspects of fish reproduction, including ovarian maturation, thyroid disruption could be implicated in the observed delay (Cyr & Eales 1996).

The fish thyroid follicles secrete primarily thyroxine (T_4), a prohormone which is converted to biologically active triiodothyronine (T_3) in peripheral tissues (Eales *et al.* 1999). T_3 is formed by the removal of iodine from the outer ring of T_4 (outer-ring deiodination, T_4 ORD), a process catalyzed by two microsomal iodothyronine deiodinases, type I (Dio1) and type II (Dio2). A third microsomal enzyme, Dio3, is responsible for inner ring deiodination (IRD) of T_4 and T_3 , forming the inactive reverse T_3 (rT_3) and 3',3- T_2 . The catalytic centres of all three iodothyronine deiodinases contain a rare selenocysteine (Sec) residue which is essential to their activity toward iodothyronines. On the mRNA transcript, the Sec residue is encoded

by UGA (normally a stop codon); a Sec Insertion Sequence (SECIS) at the 3' end of the mRNA is essential for proper translation of this codon (Bianco *et al.* 2002). All vertebrate deiodinases cloned to date contain a UGA-encoded Sec and one of two SECIS elements (Bianco *et al.* 2002; Bres *et al.* 2006).

Iodothyronine deiodinases are important regulators of peripheral thyroid status in vertebrates. These enzymes have been studied for their role in TH-driven physiological processes, particularly amphibian metamorphosis (Eales *et al.* 1999; Brown 2005). Deiodinase activity in fish is sensitive to nutritional state, stress, other hormones (17 β -estradiol (E₂), growth hormone), as well as environmental contaminants such as metals, polychlorinated biphenyls and pesticides (Cyr *et al.* 1988; Eales *et al.* 1999; Adams *et al.* 2000; Brown *et al.* 2004; Coimbra *et al.* 2005; Wiens & Eales 2005). As such, Eales *et al.* (1999) have recommended including a measure of deiodination in a suite of assays to screen for thyroid disruption in fish. Indeed, the three hepatic deiodinases respond to hypo- and hyperthyroidism at both the activity and expression level (Van der Geyten *et al.* 2001; Garcia-G *et al.* 2004; Bres *et al.* 2006).

Information on thyroid function and deiodinases is currently lacking in walleye. The walleye, a member of the Percidae family, is a top piscivore, and as such, regulation of its growth and reproductive cycles differs from that of other species commonly used as sentinels for EDCs, such as salmonids and cyprinids (Malison *et al.* 1994; Shuter *et al.* 2005). Considering the role of TH in growth and reproduction, walleye may represent a unique model in which to study disruption of the thyroid system from an evolutionary and ecological standpoint. It has been suggested that immature and developing fish may be more sensitive to EDCs acting

on thyroid status (Brown *et al.* 2004). Immature walleye were chosen for this study, as this also reduces the interference of endogenous sex steroids on thyroid status.

The aims of this study were to determine if plasma TH levels were disrupted in immature walleye exposed to multiple contaminants in the Ottawa River, and to investigate the presence of deiodinases in this species. As such, the three deiodinases were partially cloned and their tissue distribution examined in immature walleye. Finally, hepatic deiodinase mRNA levels were examined in immature walleye from the Ottawa River.

1. Material and Methods

1.2. Study area

Based on previous surveys indicating delayed age at maturation in females, three sites were selected in the Ottawa River (Fig. 1). At the reference site upstream from Ottawa/Gatineau, Deep River (46°8'54"N, 77°32'1"W), there are no significant effluent outfalls and age at maturation of female fish was normal. Delayed maturation had been observed downstream from the Ottawa/Gatineau municipal effluent outfall at Rivière Blanche (45°29'40"N, 75°32'40"W), as well as at the second downstream sampling area, Plaisance/Papineauville (45°35'12"N, 75°5'26"W and 45°36'46"N, 74°59'13"W). This second site also receives effluent from a bleached kraft pulp and paper mill in Thurso, Quebec and from four additional upstream pulp and paper mills. Several hydroelectric dams prevent fish from migrating between Deep River and the downstream sites.

1.3. Animals

Immature walleye ($n \geq 19$) were captured from each site in October 2003 using trap nets, gill nets or electrofishing in accordance with the Canadian Council on Animal Care guidelines; all efforts were made to ensure comparable handling times and fishing methods between sites. Preliminary studies indicated that hepatic deiodinase expression was not dependant on capture method. Fish were anaesthetized in tricaine methanesulfonate (MS222, Boreal, St-Catherines, ON, Canada) and bled from the caudal vein with a heparinised syringe. Plasma was separated by centrifugation, and frozen at -86°C . Livers were immediately frozen on dry ice, and stored at -86°C . The condition factor was determined for each fish as $K = [\text{body weight (g)} \times 100] / \text{total length}^3 \text{ (mm)}$. Immature fish were defined as having a gonadosomatic index (GSI) of less than 1 ($\text{GSI} = [\text{weight gonads} \times 100] / \text{body weight}$).

Immature walleye ($n = 4$) were also obtained from a fish hatchery (Station Piscicole Trois Lacs, Wotton, QC, Canada) in March 2006. As described previously, the fish were anaesthetized, and 11 tissues (liver, posterior kidney, spleen, intestine, stomach, heart, gills, whole brain, eye, muscle and skin) were removed, snap frozen on dry ice, and stored at -86°C .

1.4. T_4 and T_3 radioimmunoassays

Total circulating plasma T_4 and T_3 levels were measured by solid-phase radioimmunoassay (RIA) (Omeljaniuk *et al.* 1984), with the following modifications. All reagents were obtained from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada), except for $[^{125}\text{I}]\text{T}_3$ and $[^{125}\text{I}]\text{T}_4$ (Perkin Elmer, Boston, MA). T_3 and T_4 were assayed separately on Poly-Prep columns (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada) prepared with 0.4g (dry wt) of Sephadex G-25 (fine) (GE Healthcare, Baie D'Urfe, QC, Canada). Analyses

were conducted at room temperature on 100 μ l of plasma for T₄ and 50 μ l for T₃. For the T₄ RIA, plasma samples were incubated for 4 h, and the bound fraction was eluted with 2 ml of barbital buffer. For the T₃ RIA, incubations were performed overnight (14-16 h), and in all instances, barbital buffer was replaced by phosphate buffer (0.1 M Na₂HPO₄ and 0.03 M EDTA, pH 7.4) (Cyr & Eales 1986). Samples were assayed in a randomized order and in duplicate when possible. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 12.2% and 16.6% respectively for T₄, and 10.1% and 12.8% for T₃, which is comparable to values found in the literature for this method. The limit of detection (LOD) was determined for each assay using the regression curve; the mean LOD was 0.20 ng/ml for T₄ and 0.27 ng/ml for T₃.

1.5. Cloning of iodothyronine deiodinases by RT-PCR

Total RNA was extracted from walleye liver using the acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform method (Chomczynski & Sacchi, 1987), or from walleye tissues with the Absolutely RNA Miniprep Kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA), according to the manufacturer's instructions. Absence of genomic DNA contamination was confirmed by PCR on RNA extracts prior to reverse transcription (RT). The RT reaction was performed in a 20 μ l solution with a final concentration of 1X PCR Buffer (GE Healthcare) to which was added, 3.5 mM MgCl₂, 1 mM dNTP, 2.5 μ M pd(T)₁₂₋₁₈, 1 U/ μ l RNAGuard (GE Healthcare), and 1 U/ μ l M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen, Burlington, ON, Canada). A 1 μ g aliquot of template RNA was denatured at 65°C for 10 min, and incubated with the reaction solution at room temperature for 10 min, and subsequently at 42°C for 60 min.

Degenerate PCR primers were designed for each of the deiodinases based on the coding sequences of vertebrate deiodinases listed in GenBank. For each

deiodinase, we aligned the open reading frames of known nucleotide sequences to identify conserved regions in which to derive the degenerate primers (Table 1). PCR was performed on 3 µl of cDNA obtained by RT in a 25 µl solution of 1X PCR Buffer (GE Healthcare), in addition to 0.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.5 µM of both reverse and forward primers, as well as 1.25 U Taq polymerase (GE Healthcare). Touchdown PCR was carried out for 30 cycles of 94°C for 45s, 58-43°C (-0.5°C/cycle) for 45s, and 72°C for 90s, followed by 10 additional cycles with a set Ta of 50°C. Amplified products were separated on a 1.5% agarose gel and extracted from the gel with the QIAEX[®] II Gel Extraction Kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada). Amplicons were cloned in the pCR-II plasmid with the TOPO TA Cloning[®] Kit (Invitrogen), according to the manufacturer's instructions. The inserts were purified from stab cultures, and several clones for each deiodinase were sequenced using an automated sequencer (DNA Landmarks, St-Jean-sur-Richelieu, QC, Canada). Homology of the cloned walleye sequence with published nucleotide and deduced amino acid sequences was confirmed with WU-BLAST2 (European Bioinformatics Institute, www.ebi.ac.uk). Cloned sequences have been deposited in GenBank (accession numbers to be provided).

1.6. Tissue distribution determination by semi-quantitative RT-PCR

Walleye-specific primers for each deiodinase were designed from the cloned sequences (Table 1). The RT and semi-quantitative PCR reactions were conducted under the same conditions as described previously, but at a single Ta rather than with the touchdown protocol. For each primer pair, PCR reactions were performed on pooled samples over a range of cycle numbers to ensure that the products were analyzed in the linear range of the amplification reaction (data not shown); PCR

conditions are listed in Table 1. Amplified products were separated on a 1.5% agarose gel, stained with ethidium bromide and analyzed densitometrically with the BioRad Fluor-S Multi Imager and Multi-Analyst software (Bio-Rad). Deiodinase mRNA levels were normalized with *bactin* mRNA levels obtained from the same RT reaction.

1.7. Real-time PCR

Real-time PCR was performed on reverse-transcribed total hepatic RNA using walleye-specific primers (Table 1). A 2 µl aliquot of the RT reaction was amplified in a 15 µl solution containing 1X Platinum® SYBR® Green qPCR SuperMix UDG (Invitrogen, Burlington, ON, Canada), and 0.3 µM of both reverse and forward primers. The PCR cycling protocols were optimized to maximize the reaction efficiency and ensure that only the target product was contributing to the SYBR Green fluorescence signal. In all cases, the cycling program used (95°C for 2 min, and 95°C for 15 s, Ta for 30 s, and 72°C for 30 s for 40 cycles) yielded a single product as indicated by the melt curve. Amplifications for *dio1* and *dio3* were performed on the Eppendorf mastercycler® ep realplex⁴ with a Ta of 62°C and 65°C, respectively. Amplification of *dio2* was performed on the Rotor-Gene RG3000 with a Ta of 58°C. Results were analyzed according to delta-delta Ct method, using *bactin* as the housekeeping gene (Livak & Schmittgen 2001). Samples were assayed in duplicate and in randomized order and identical sample pools were run in each assay to calibrate for inter-assay variation.

1.8. Statistics

Statistical differences between hormone concentration and deiodinase expression were determined by one-way ANOVA, followed by the Holm-Sidak

multiple comparisons method. When data failed the Kolmogorov-Smirnov normality test, a Kruskal-Wallis one-way analysis of variance on ranks was performed instead, followed by a Dunn's test. Correlations were assessed using the Pearson's product moment correlation. Outliers were removed from the mRNA expression dataset following Dixon's test. Statistical analyses were performed on SigmaStat software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA), and considered significant when $p < 0.05$.

2. Results

2.1. Plasma TH levels in walleye from the Ottawa River

Immature walleye were captured at three sites in the Ottawa River in October of 2003: upstream from Ottawa and Gatineau at Deep River, and downstream at Rivière Blanche and Plaisance (Fig. 1). Total length, weight and condition factor (K) were not significantly different between sites (data not shown). No significant differences were observed between male and female immature walleye for any of the parameters or biomarkers measured in this study; therefore, sexes were grouped for all analyses.

Plasma T_4 levels were significantly higher at Plaisance, where they were 2-fold higher than at other sites (Fig. 2A). Plasma T_3 levels were significantly elevated at both downstream sites by approximately 1.5-fold as compared to Deep River (Fig. 2B). Finally, the molar ratio of plasma $T_3:T_4$ was depressed by more than 50% at Plaisance compared to both other sites, although only the difference with Rivière Blanche was significant (Fig. 2C).

This is the first report of plasma TH in walleye. Plasma T_4 levels ranged from 0.2 to 2.3 ng/ml at Deep River, but were found as high as 8.3 ng/ml at Plaisance.

Plasma T₃ levels ranged from 2 to 11 ng/ml Deep River, but were increased to 19 ng/ml in certain fish from Rivière Blanche and Plaisance.

2.2. Cloning of walleye deiodinases by RT-PCR

The RT-PCR cloning strategy for walleye deiodinases using degenerate primers yielded an amplification product of the predicted size for all three deiodinases. These products were sequenced and subjected to WU-BLAST2 homology analysis. Each of the three cloned deiodinase nucleotide sequences was similar to known fish sequences. Furthermore, the deduced amino acid sequences of all three deiodinases contained a putative Sec residue within a region highly homologous to the catalytic centre of fish deiodinases: NFGSxxSecPPF, where xx is CT for *dio1*, AT for *dio2* and CS for *dio3*.

Briefly, four putative *dio1* clones of 315 bp were sequenced (Fig. 3A, Fig 4A), and found to share 74-90% nucleotide identity with known fish *dio1* cDNA sequences, as determined by WU-BLAST2 (Sanders *et al.* 1997; Orozco *et al.* 2003; Thisse *et al.* 2003; Klaren *et al.* 2005). The deduced amino acid sequence similarity ranged from 90-95% with other fish Dio1 sequences. Five additional clones were sequenced and found to contain an 11-bp insert downstream from the Sec residue not present in the first walleye *dio1* sequence (Fig. 4B). The resulting deduced protein is not homologous to other fish Dio1 following the insert. This suggests the presence of a splice variant for *dio1* in walleye.

For *dio2* (Fig. 3B), homology analysis of the 268-bp cloned product with published fish *dio2* sequences indicated 72-86% nucleotide identity and 68-86% amino acid similarity (Sambroni *et al.* 2001; Van der Geyten *et al.* 2001 ; Orozco *et al.* 2002; Sutija *et al.* 2003; Thisse *et al.* 2003; Marchand *et al.* 2004). The 531-bp

sequence obtained for walleye *dio3* (Fig. 3C) shared 69-90% nucleotide identity and 82-94% amino acid similarity with cloned fish *dio3* sequences (Adams 1999; Sanders *et al.* 1999; Sutija *et al.* 2004; Bres *et al.* 2006).

2.3. Tissue distribution of deiodinase mRNA expression

Tissue distribution of deiodinase mRNA expression was evaluated by semi-quantitative RT-PCR in immature hatchery-raised walleye (n = 4). *dio1* was expressed in all 11 tissues analyzed (liver, kidney, spleen, intestine, stomach, gills, brain, eye, heart, skeletal muscle and skin), but not in the negative water control (not shown) (Fig. 5A). Relative mRNA levels were highest in skeletal muscle, followed by heart, and skin, whereas all of the other tissues contained similar amounts of *dio1* mRNA. Hepatic *dio2* mRNA levels were significantly higher as compared to all other tissues ($p < 0.001$) (Fig. 5B). *dio2* was also expressed in brain, stomach, eye, intestine, skin, and weakly in gills. *dio2* mRNA levels were negligible in kidney, heart, and detected above baseline levels in the muscle and spleen of only one fish. *dio3* mRNA relative expression was highest in liver and whole eye, followed by brain, gill, and skin (Fig. 5C). *dio3* was also detected in muscle, stomach, spleen and intestine, but not in kidney or heart.

2.4. Hepatic deiodinase mRNA levels in walleye from the Ottawa River

Using primers designed from the cloned sequences, a real-time PCR assay was optimized and used to determine hepatic deiodinase mRNA levels in immature walleye from the Ottawa River. Due to variability in *dio3* mRNA levels spanning four orders of magnitude, Dixon's test for outliers was performed and identified a sub-population of individuals with highly elevated *dio3* mRNA levels. These individuals

(one to three at each site) were removed from the dataset. Hepatic *dio2* mRNA levels were significantly higher at Rivière Blanche than at Deep River, but not significantly different from fish captured at Plaisance. There were no significant differences in hepatic mRNA levels for either *dio2* or *dio3* in walleye captured at different sites in the Ottawa River (Fig. 6).

2.5. Relationships between TH levels and deiodinase expression

To explain why the levels of hepatic deiodinase mRNAs did not reflect the pattern of changes in plasma TH levels at the three sites, Pearson's product moment correlation analyses were conducted on T_4 , T_3 and $T_3:T_4$ molar ratios, as well as on *dio1*, *dio2* and *dio3* expression from all fish, including the sub-population that had been previously identified as outliers.

There was a significant negative Pearson's correlation between plasma T_3 concentrations and *dio3* hepatic mRNA levels (-0.549 , $p < 0.001$). Also, *dio2* hepatic mRNA levels was negatively correlated with *dio3* levels (-0.439 , $p < 0.01$). No other correlations were observed between hormone levels, ratios or deiodinase mRNA levels when the data from all sites were grouped. However, if sites were examined individually, a significant positive correlation emerged between the molar ratio of plasma $T_3:T_4$ and hepatic *dio3* mRNA levels at Plaisance (0.998 , $p < 0.001$), whereas fish from the two other sites tended to display a negative relationship (-0.377 , $p = 0.112$).

3. Discussion

Few field studies have examined thyroid disruption in fish exposed to environmental contaminants, and none to date have included a measure of

deiodination (Brown *et al.* 2004). Furthermore, little is known on thyroid function and the effect of EDCs on fish which rely on piscivory. In this study, immature walleye exposed to multiple contaminants in the Ottawa River were used as a model to assess thyroid disruption in a top aquatic predator. To develop this model, the presence of deiodinases in walleye was investigated, and the use of hepatic iodothyronine deiodinase mRNA levels was evaluated as a molecular biomarker of thyroid disruption.

Plasma TH in immature walleye are sensitive to the presence of EDCs, as indicated by significant changes in plasma TH levels and molar ratio between exposed and reference sites. Specifically, plasma T₃ was elevated at Rivière Blanche, whereas T₃ and T₄ were both elevated at Plaisance compared to Deep River (reference site). The 50% reduction in the plasma T₃:T₄ molar ratio was also specific to Plaisance. The different results between the two exposed sites suggest a possible contaminant gradient in the Ottawa River downstream from Ottawa/Gatineau; for instance, at Plaisance, the contaminant load likely integrates those from both municipal and pulp and paper mills outflows. However, there are no available comprehensive datasets on contaminant levels in the Ottawa River.

To the best of our knowledge, this is the first report of plasma levels of T₄ and T₃ in walleye. While T₄ levels are comparable with those observed in most other freshwater teleosts, plasma T₃ concentrations observed in immature walleye exceed those generally observed in other species, such as tilapia and rainbow trout (Cyr & Eales 1986; Van der Geyten *et al.* 2001; Wiens & Eales 2005). In immature yellow perch (*Perca flavescens*), another member of the Percidae family, plasma T₄ levels were much higher than in walleye, at approximately 20 ng/ml, whereas plasma T₃ levels were much lower at 1-2 ng/ml (Hontela *et al.* 1995). The positive T₃:T₄ ratio in

walleye suggests that peripheral thyroid status is differentially regulated in this species as compared to other freshwater teleosts; as a top predator, it possible that walleye require higher levels of plasma T_3 than species occupying a lower trophic level.

Overall, these results suggests an increased availability of these hormones in exposed walleye, as peripheral tissues can draw from a greater pool of TH for deiodination, or to mediate physiological effects (Eales *et al.* 1999). A change in physiological state and/or in thyroid status in EDC-exposed walleye is also suggested by the depressed molar ratio of plasma $T_3:T_4$ at Plaisance (Eales *et al.* 1999). This ratio may indicate a shift in systemic deiodination of T_4 to T_3 , and supports the investigation of deiodination in these fish (Eales *et al.* 1999).

As no information was available on walleye deiodinases, these three enzymes were partially cloned in this species. Sequences obtained from the RT-PCR cloning strategy were identified as *dio1*, *dio2* and *dio3* based on the strong similarity with both nucleotide and deduced amino acid sequences in other vertebrates. In addition, the tissue distribution patterns observed for each of these enzymes are supported by those found in the literature for fish.

The cloned walleye *dio1* was similar to known fish *dio1*s, ranging from 74-90% for nucleotide identity and from 90-94% similarity for the deduced amino acid sequence. In immature walleye, *dio1* mRNA expression was observed in all 11 tissues analyzed, indicating constitutive expression of *dio1* in this species. In tilapia, sea bream and killifish, *dio1* mRNA expression has been observed mainly in kidney and liver, as well as in brain, gut, testis and gill, albeit at lower levels (Sanders *et al.* 1997, Orozco *et al.* 2003; Klaren *et al.* 2005). Constitutive *dio1* expression is therefore not common to all teleosts, especially as euthyroid tilapia express negligible hepatic *dio1* (Van der Geyten *et al.* 2001; Orozco *et al.* 2003). This suggests that *dio1* plays a

larger role in walleye than in other teleosts. This is also the first time *dio1* expression has been observed in the heart, muscle, stomach, spleen, skin and eye of a teleost species.

The presence of a transcript variant in five of the nine sequenced walleye *dio1* clones is unexpected. The 11-base insert within the coding sequence introduces a frame-shift resulting in premature stop codon (UGA) at position 253 of the cloned *dio1* variant, which suggests that a non-functional Dio1 isoform is expressed in walleye. Both transcripts were observed following two separate cloning reactions performed on hepatic RNA extracted from different individuals, which may indicate the simultaneous presence of multiple Dio1 isoforms in liver. Studies of the walleye *dio1* gene are ongoing to confirm if the 11-base insert is a novel exon giving rise to a splice variant.

To the best of our knowledge, splice variants have not been reported for any vertebrate *dio1*. However, at least three known splice variants exist in human *dio2*, producing changes within the coding region (Ohba *et al.* 2001). For fish *dio2* and *dio3*, multiple mRNA transcripts have been observed by Northern blot, suggest tissue-specific splice variants for killifish *dio2*, lungfish *dio2*, and tilapia *dio3*, but not for rainbow trout *dio2* or lungfish *dio3* (Sanders *et al.* 1999; Sambroni *et al.* 2001; Orozco *et al.* 2002; Sutija *et al.* 2003, 2004). Bres *et al.* (2006) cloned an alternative form of the 3' end of rainbow trout *dio3* mRNA, with a modified SECIS element and polyadenylation signal. Alternative splicing has thus been suggested as a post-translational regulatory mechanism of deiodinase mRNA expression (Sutija *et al.* 2003; Bres *et al.* 2006).

Homology of the walleye *dio2* nucleotide and deduced amino acid sequences with other fish *dio2*s ranged between 72-86% and 68-86%, respectively. The pattern

of walleye *dio2* tissue distribution closely matches the literature for fish species, with hepatic *dio2* expression surpassing that from all other tissues. Liver is the main source of peripheral T₃ in most teleosts, although *dio2* mRNA expression is also present in fish gonads, and eye, and in certain species in kidney, brain, gills, and heart, but not in muscle (Sambroni *et al.* 2001; Van der Geyten *et al.* 2001; Orozco *et al.* 2002; Sutija *et al.* 2003; Bres *et al.* 2006). This is in accordance with the presence of a walleye *dio2* transcript in liver, brain, eye, and weakly in gills, as well as its absence from muscle. In lamprey, the intestine has been identified as a main site of Dio2 activity, especially during developmental changes, supporting its expression in the immature walleye digestive tract (Eales *et al.* 1999).

The cloned product identified as walleye *dio3* was highly similar to other fish *dio3*s, for both the nucleotide (69-90%) and deduced amino acid (82-94%) sequences. The tissue distribution of walleye *dio3* expression is also in accordance with the high *dio3* mRNA levels in liver, brain, and gills of other fish species (Sanders *et al.* 1999; Sutija *et al.* 2004; Bres *et al.* 2006). This is the first report of *dio3* expression in eye or retina of a fish, but is consistent with the key role played by TH in regulating salmonid eye development (Deutschlander *et al.* 2001). The presence of *dio3* expression in immature walleye skin may also point to a developmental role of this enzyme, as suggested by Fenton *et al.* (1997), who observed that skin Dio3 activity decreased in juvenile and adult rainbow trout in correlation with increasing age, weight and length.

To evaluate the use of hepatic deiodinase mRNA levels as a molecular biomarker of thyroid disruption, a real-time PCR assay was performed on samples from immature walleye captured in the Ottawa River. Hepatic *dio1* and *dio3* mRNA levels were not modified in these fish, but a significant increase in *dio2* mRNA

expression was observed at Rivière Blanche as compared to Deep River (reference site). This is unexpected in light of the elevated T_3 levels in Rivière Blanche walleye: hyperthyroidism, induced by oral administration of T_3 for one week (rainbow trout), or short-term (<24h) immersion in T_3 or T_4 (killifish), caused a decrease in hepatic *dio2* mRNA levels (Garcia-G *et al.* 2004; Bres *et al.* 2006). The same treatments also induced an increase in *dio3* mRNA levels in rainbow trout liver and a decrease in *dio1* mRNA levels in killifish liver (Garcia-G *et al.* 2004; Bres *et al.* 2006). In short, the elevated plasma levels of T_3 in immature walleye from Rivière Blanche and Plaisance did not induce a change in hepatic deiodinase mRNA transcription that followed the pattern induced by experimental hyperthyroidism in fish. However, it has not yet been demonstrated whether deiodinase expression is regulated by T_3 in walleye, or in any top predator teleost. Also, the interindividual variability often seen in field animals may contribute to the absence of a significant change in deiodinase mRNA levels. For instance, one study using differential display identified *dio2* expression as being up-regulated in killifish from an estuary contaminated with several contaminants, including polyaromatic hydrocarbons; however this difference was not significant when verified by cDNA macroarray, a discrepancy which the authors attributed to interindividual variability (Meyer *et al.* 2005).

To better understand the variability in hepatic deiodinase mRNA levels within sites, particularly in *dio3* expression, plasma TH levels were correlated with deiodinase expression in walleye captured in the Ottawa River. Combining all sites, a significant negative correlation was found between plasma T_3 and hepatic *dio3*. Again, this is unexpected, as T_3 has been shown to up-regulate hepatic *dio3* expression and Dio3 activity, not decrease it (Fines *et al.* 1999; Mol *et al.* 1999; Bres *et al.* 2006). This suggests exogenous or endogenous factors other than T_3 are

responsible for the variability in *dio3* expression. A certain degree of interindividual variability might have occurred due to short-term changes in nutritional status and/or physical disturbances prior to or at the time of capture, both of which induce rapid changes in hepatic Dio3 activity and peripheral thyroid status of fish (Johnston *et al.* 1996; Van der Geyten *et al.* 1998; Plohman *et al.* 2002). For example, in lake sturgeon, a non-teleost, variations in food quality unveiled a negative correlation between hepatic Dio3 (T₃IRD) activity and T₃ (Plohman *et al.* 2002).

As the correlation between *dio3* mRNA levels and plasma T₃ concentrations was not site-specific, and also because the high variability in *dio3* mRNA levels was observed at all sites, this suggests that modified *dio3* expression, and subsequent change in Dio3 activity, was not the cause of increased TH levels in walleye exposed to EDCs in the Ottawa River. Other reports indicate that mRNA levels often correspond poorly to enzymatic activity for all three fish deiodinases, which moderates any conclusions as to the relation between deiodinase mRNA levels and their activity (Van der Geyten *et al.* 2001; Garcia-G *et al.* 2004; Sutija *et al.* 2004; Bres *et al.* 2006). Alternative splicing has been suggested as a mechanism of post-transcriptional regulation of deiodinases in fish, particularly for *dio2* and *dio3* (Sutija *et al.* 2003; Bres *et al.* 2006). Another possible hypothesis is that capture stress, while comparable between sites in this study, induced a rapid change in hepatic deiodinase expression that obscured the finer relationships between plasma TH levels, deiodinase activity and mRNA levels that were present prior to capture.

The negative correlation between hepatic *dio2* and *dio3* expression in walleye liver is consistent with their opposite roles in regulating peripheral thyroid status, as they catalyze the activation and deactivation of TH, respectively. More difficult to interpret is the almost perfect positive correlation between the T₃:T₄ molar ratio and

dio3 mRNA expression observed only at Plaisance, and which goes against the trend observed at the two other sites. This might indicate an alternative response to TH homeostasis disruption at Plaisance compared to the other sites, which is suggested by the elevated levels of T₄ and the depressed T₃:T₄ molar ratio observed only at this site. However, without additional studies, it is not possible to determine the underlying cause of this correlation.

Interpretation of biomarkers of thyroid disruption is complicated by the fact that several components of the thyroid cascade are sensitive to EDCs, and that these components respond to each other via compensatory biofeedback mechanisms, blurring the distinction between direct and indirect effects of EDCs (Brown *et al.* 2004). As such, a suite of biomarkers has been recommended, including plasma TH levels and deiodination in peripheral tissues (Eales *et al.* 1999). The results presented here indicate that deiodinase mRNA levels respond in an unexpected manner to walleye chronically exposed to EDCs, and suggest that additional endpoints are necessary to interpret changes in TH levels.

Thyroid hormone levels were elevated in immature walleye from the Ottawa River at the same sites as those where delays in reproductive status had been previously observed in female walleye. Thyroid status has been linked on both a temporal and experimental basis with reproductive status (Cyr & Eales, 1988a,b, 1989, 1996). At latitudes comparable to the Ottawa River, the endocrine switch allocating energy to reproduction occurs in the fall (October-November), when E₂ and testosterone levels begin to rise in females, at the same time as when elevated levels of TH were observed in this study (Malison *et al.* 1994; Henderson *et al.* 1996, 2002). Thus, disruption of the interactions between sex steroids and elevated TH levels during a critical period of commitment to reproduction could be related to the

observed delayed sexual maturation in female fish exposed to contaminants in the Ottawa River.

Overall, this study suggests an association between elevated thyroid hormone levels in immature walleye and the presence of contaminants in the Ottawa River, particularly at Plaisance. The deiodinases cloned in walleye provide a new tool to study the regulation of thyroid status in a predatory fish. However, the hepatic mRNA levels of these enzymes were not consistent with the observed changes in plasma TH levels, and indicate that additional biomarkers are needed to assess thyroid disruption by environmental contaminants. Further studies are in progress to better understand the effect of the EDCs present in the Ottawa River on thyroid and reproductive status in fish, as well as to develop the use of molecular biomarkers of thyroid disruption.

Acknowledgments

Julie Dufresne and Mary Gregory are thanked for their technical assistance.

Funding

This study was financed by the Valorisation Recherche Québec-Réseau de Recherche en Écotoxicologie du Saint-Laurent, Environment Canada, the city of Gatineau and the Ministère des Ressources Naturelles et de la Faune (QC). M. Picard-Aitken was supported by the Fondation Armand-Frappier and the Fonds québécois de la recherche sur la nature et les technologies. There are no conflicts of interest that would prejudice this study's impartiality.

References

Adams. BA 1999 The effects of polychlorinated biphenyls 77 and 126 on the thyroidal

status of a marine flatfish, the American plaice (*Hippoglossoides platessoides*), MSc Thesis. Winnipeg: University of Manitoba.

Adams BA, Cyr DG & Eales JG 2000 Thyroid hormone deiodination in tissues of American plaice, *Hippoglossoides platessoides*: characterization and short-term responses to polychlorinated biphenyls (PCBs) 77 and 126. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **127** 367-378.

Aravindakshan J, Paquet V, Gregory M, Dufresne J, Fournier M, Marcogliese DJ & Cyr DG 2004 Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicol. Sci.* **78** 156-165.

Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ & Larsen PR 2002 Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr. Rev.* **23** 38-89.

Bres O, Plohm JC & Eales JG 2006 A cDNA for a putative type III deiodinase in the trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence of holding conditions and thyroid hormone treatment on its hepatic expression. *Gen. Comp. Endocrinol.* **145** 92-100.

Brown DD 2005 The role of deiodinases in amphibian metamorphosis. *Thyroid* **15** 815-821.

Brown SB, Adams BA, Cyr DG & Eales JG 2004 Contaminant effects on the teleost fish thyroid. *Environ. Toxicol. Chem.* **23** 1680-1701.

Chomczynski P & Sacchi N 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* **162** 156-159.

Coimbra AM, Reis-Henriques MA & Darras VM 2005 Circulating thyroid hormone levels and iodothyronine deiodinase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following dietary exposure to Endosulfan and Aroclor 1254. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **141** 8-14.

- Cyr DG & Eales JG 1986 The effects of sodium ipodate (ORagrafin) on thyroid function in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63** 86-92.
- Cyr DG & Eales JG 1988a Influence of thyroidal status on ovarian function in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.* **248** 81-87.
- Cyr DG & Eales JG 1988b *In vitro* effects of thyroid hormones on gonadotropin-induced estradiol-17 β secretion by ovarian follicles of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **69** 80-87.
- Cyr DG & Eales JG 1989 T₃ enhancement of *in vitro* estradiol-17 β secretion by oocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*, is dependent on cAMP. *Fish Physiol. Biochem.* **6** 255-259.
- Cyr DG & Eales JG 1996 Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. *Rev. Fish. Biol. Fish.* **6** 165-200.
- Cyr DG, MacLatchy DL & Eales JG 1988 The influence of short-term 17 β -estradiol treatment on plasma T₃ levels and *in vitro* hepatic T₄ 5'-monodeiodinase activity in immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **69** 431-8.
- Deutschlander ME, Greaves DK, Haimberger TJ & Hawryshyn CW 2001 Functional mapping of ultraviolet photosensitivity during metamorphic transitions in a salmonid fish, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* **204** 2401-2413.
- Eales JG, Brown SB, Cyr DG, Adams BA & Finnson KW 1999 Deiodination as an index of chemical disruption of thyroid hormone homeostasis and thyroidal status in fish. In *Environmental Toxicology and Environmental Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment*, pp 136-164. Eds DS Henshel, MC Black & MC Harrass. West Conshohocken, PA, USA: American Society for Testing and Materials.
- Fenton B, Orozco A & Valverde C 1997 Kinetic characterisation of skin inner-ring

deiodinative pathway and its correlation with circulating levels of reverse triiodothyronine in developing rainbow trout. *J. Endocrinol.* **154** 547-554.

Fines GA, Plohman J & Eales JG 1999 Effect of experimental 3,5,3'-triiodothyronine hyperthyroidism on thyroid hormone deiodination in brain regions and liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Can. J. Zool.* **77** 1185-1191.

Garcia-G C, Jeziorski MC, Valverde-R C & Orozco A 2004 Effects of iodothyronines on the hepatic outer-ring deiodinating pathway in killifish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **135** 201-209.

Henderson BA, Collins N, Morgan GE & Vaillancourt A 2003 Sexual size dimorphism of walleye (*Stizostedion vitreum vitreum*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **60** 1345-1352.

Henderson BA, Wong JL & Nepszy S.J. 1996 Reproduction of walleye in Lake Erie: allocation of energy. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **53** 127-133.

Hontela A, Dumont P, Duclos D & Fortin R 1995 Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Environ. Toxicol. Chem.* **14** 725-731.

Johnston CE, Gordillo C & Eales JG 1996 Transition from a hatchery to a laboratory environment induces inner-ring monodeiodination pathways for thyroid hormones in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Can. J. Zool.* **74** 2178-2183.

Klaren PH, Haasdijk R, Metz JR, Nitsch LM, Darras VM, Van der Geyten S & Flik G 2005 Characterization of an iodothyronine 5'-deiodinase in gilthead seabream (*Sparus auratus*) that is inhibited by dithiothreitol. *Endocrinology* **146** 5621-5630.

Livak KJ & Schmittgen TD 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25** 402-8.

Malison JA, Procarione LS, Barry TP, Kapuscinski AR & Kayes TB 1994 Endocrine

and gonadal changes during the annual reproductive cycle of the freshwater teleost, *Stizostedion vitreum*. *Fish Physiol. Biochem.* **13** 473-484.

Marchand O, Duffraisse M, Triqueneaux G, Safi R & Laudet V 2004 Molecular cloning and developmental expression patterns of thyroid hormone receptors and T₃ target genes in the turbot (*Scophthalmus maximus*) during post-embryonic development. *Gen. Comp. Endocrinol.* **135** 345-357.

Meyer JN, Volz DC, Freedman JH & Di Giulio RT 2005 Differential display of hepatic mRNA from killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a Superfund estuary. *Aquat. Toxicol.* **73** 327-341.

Mol KA, van der Geyten S, Kuhn ER & Darras VM 1999 Effects of experimental hypo- and hyper-thyroidism on iodothyronine deiodinases in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Fish Physiol. Biochem.* **20** 201-207.

Ohba K, Yoshioka T & Muraki T 2001 Identification of two novel splicing variants of human type II iodothyronine deiodinase mRNA. *Mol. Cell. Endocrinol.* **172** 169-175.

Omeljaniuk RJ, Cook RF & Eales JG 1984 Simultaneous measurement of thyroxine and triiodothyronine in trout plasma using a solid-phase radioimmunoassay. *Can. J. Zool.* **62** 1451-1453.

Orozco A, Jeziorski MC, Linser PJ, Greenberg RM & Valverde-R C 2002 Cloning of the gene and complete cDNA encoding a type 2 deiodinase from *Fundulus heteroclitus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **128** 162-167.

Orozco A, Villalobos P, Jeziorski MC & Valverde-R C 2003 The liver of *Fundulus heteroclitus* expresses deiodinase type 1 mRNA. *Gen. Comp. Endocrinol.* **130** 84-91.

Plohman JC, Dick TA & Eales JG 2002 Thyroid of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*. II. Deiodination properties, distribution, and effects of diet, growth, and a T₃ challenge. *Gen. Comp. Endocrinol.* **125** 56-66.

- Power DM, Llewellyn L, Faustino M, Nowell MA, Bjornsson BT, Einarsdottir IE, Canario AV & Sweeney GE 2001 Thyroid hormones in growth and development of fish. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* **130** 447-459.
- Sambroni E, Gutieres S, Cauty C, Guiguen Y, Breton B & Lareyre JJ 2001 Type II iodothyronine deiodinase is preferentially expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and gonads. *Mol. Reprod. Dev.* **60** 338-350.
- Sanders JP, Van der Geyten S, Kaptein E, Darras VM, Kuhn ER, Leonard JL & Visser TJ 1997 Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. *Endocrinology* **138** 5153-5160.
- Sanders JP, Van der Geyten S, Kaptein E, Darras VM, Kuhn ER, Leonard JL & Visser TJ 1999 Cloning and characterization of type III iodothyronine deiodinase from the fish *Oreochromis niloticus*. *Endocrinology* **140** 3666-3673.
- Shuter BJ, Lester NP, LaRose J, Purchase CF, Vascotto K, Morgan G, Collins NC & Abrams PA 2005 Optimal life histories and food web position: linkages among somatic growth, reproductive investment and mortality. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* **62** 738-746.
- Sutija M, Longhurst TJ & Joss JM 2003 Deiodinase type II and tissue specific mRNA alternative splicing in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **132** 409-417.
- Sutija M, Longhurst TJ & Joss JM 2004 Deiodinase type III in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **136** 152-161.
- Thisse C, Degraeve A, Kryukov GV, Gladyshev VN, Obrecht-Pflumio S, Krol A, Thisse B & Lescure A 2003 Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. *Gene Expr. Patterns* **3** 525-532.
- Van der Geyten S, Mol KA, Pluymers W, Kuhn ER & Darras VM 1998 Changes in

plasma T3 during fasting/refeeding in tilapia (*Oreochromis niloticus*) are mainly regulated through changes in hepatic type II iodothyronine deiodinase. *Fish Physiol. Biochem.* **19** 135-143.

Van der Geyten S, Toguyeni A, Baroiller JF, Fauconneau B, Fostier A, Sanders JP, Visser TJ, Kuhn ER & Darras VM 2001 Hypothyroidism induces type I iodothyronine deiodinase expression in tilapia liver. *Gen. Comp. Endocrinol.* **124** 333-342.

Wiens SC & Eales JG 2005 The effects of 17 β -estradiol injections on thyroid hormone deiodination pathways in liver and other tissues of female and male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of sexual maturity. *Can. J. Zool.* **83** 596-603.

Figure Legends

Fig. 1. Schematic map of the Ottawa River, indicating the reference site (Deep River), downstream contaminated sites (Rivière Blanche, Plaisance/Papineauville) where walleye were captured.

Fig. 2. Plasma T_4 (A) and T_3 (B), and molar ratio of plasma $T_3:T_4$ (C) in immature walleye captured at three sites in the Ottawa River. Plasma hormone levels were measured by solid-phase RIA and are expressed at the mean $\pm$ SEM. Different letters indicated significant differences between sites ($p < 0.05$, unless indicated: * $p < 0.01$ or ** $p < 0.001$).

Fig. 3. Putative *dio1* (A), *dio2* (B) and *dio3* (C) products amplified by touchdown PCR with degenerate primers. Lane 1 contains the 100-bp molecular ladder; Lane 2 contains the RT-PCR product amplified from walleye mRNA. Expected amplicon sizes were 359-bp, 299-bp and 576-bp for *dio1*, *dio2* and *dio3*, respectively. Products of the expected size were extracted from the gel, cloned and sequenced.

Fig. 4. (A) Nucleotide and deduced amino acid sequences of walleye *dio1* 315-bp cDNA fragment. X = selenocysteine. (B) Nucleotide and deduced amino acid sequences of walleye *dio1* cDNA 326-bp transcript variant. X = selenocysteine. The 11-base insert is underlined.

Fig. 5. Tissue distribution of *dio1* (A), *dio2* (B), and *dio3* (C) mRNA levels in immature hatchery-raised walleye measured by semi-quantitative RT-PCR. L = liver, K = kidney, Sp = spleen, I = intestine, St = stomach, G = gills, B = brain, E = whole

eye, H = heart, M = skeletal muscle, Sk = skin. RT-PCR was performed with walleye-specific primers within the linear range of the reactions. RT-PCR amplification products were analysed by densitometry on ethidium bromide-stained agarose gels. Deiodinase mRNA levels ($n = 4$) were normalized to *bactin* mRNA levels and are expressed as the mean $\pm$ SEM.

Fig. 6. Hepatic deiodinase mRNA levels in immature walleye captured at three sites in the Ottawa River. Hepatic *dio1*, *dio2* and *dio3* mRNA levels were measured by real-time PCR and normalized to *bactin* mRNA levels using the delta-delta Ct method of relative quantitation. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Different letters indicate significant differences between sites ($p < 0.05$).

Table 1. Primer pairs and PCR conditions used in to study deiodinases in walleye

Primer	Name	5'-3' Sequence	Primer pair	Product length (bp)	Ta (°C)	Real-time Ta (°C)	Cycles ^a
<i>Degenerate</i>							
A	<i>dio1-F</i>	GCAACAGRCRCCTGGTGCTGART	B	359	TCD	-	40
B	<i>dio1-R</i>	AGSCCCWYNNCTCCCTTGTA	A	404 ^b	TCD	-	40
C	<i>dio2-F-369</i>	TGCCRCCTKCTGGACTTYG	D	431 ^b	TCD	-	40
D	<i>dio2-R-753</i>	GGKCCGTHCCTCCMAGGTA	C, H	459 ^b	TCD	-	40
E	<i>dio2-F-102</i>	TGYCTCTTCTSGCKCTCTAYGACTC	F	539 ^b , 299	TCD	-	40
F	<i>dio2-R-508</i>	GGGTGWCCTCTCTATGTAGACCA	E	576	TCD	-	40
G	<i>dio2-F-80</i>	YYTGCHGGBTTCTTCTCCMACTG	F				
H	<i>dio2-F-237</i>	TTYCTBCTGGAYGCMTACAACAGGT	D, I				
I	<i>dio2-R-513</i>	GGGTGDCCTCTCTATGTA	H				
J	<i>dio3-F</i>	TGCTSTGGYTBCTGGAYTTC	K				
K	<i>dio3-R</i>	YGTAAAGVCKCTCRAARTAGGCTCC	J				
<i>Walleye-specific</i>							
L	<i>dio1-SV-F</i>	GTTCAGCAACTCGTCAAGG	M	248	54	62	35, 40
M	<i>dio1-SV-R</i>	TCAGGCAGAGCAACCATCTTTA	L				
N	<i>dio2-SV-F</i>	TCCAAAGTGGTGAAAGGTCCCTGAT	O	194	58	58	34, 40
O	<i>dio2-SV-R</i>	AAAGCTGGCAGGTGGTTGATGAAG	N				
P	<i>dio3-SV-F</i>	CGCGTCGTAAGCCAGTACCT	Q	215	56	65	29, 40
Q	<i>dio33-SV-R</i>	GCTGCGTTGGACGAGTTGT	P				
<i>Reference gene</i>							
R	<i>bactin-R</i>	GCTTGCTGATCCACATCTG	S	206	55	60.5, 58 ^c	25
S	<i>bactin-F</i>	GGACCTGTACGCCAACAC	R				

TCD = touchdown PCR, 58-43. Ta = Annealing temperature, F = forward strand, R = reverse strand, SV = *Sander vitreus* (walleye)

^aFor semi-quantitative PCR, the number of cycles was set in the linear range of the amplification reaction, determined by performing the reaction over a range of cycles. For touchdown and real-time PCR, all reactions were carried out for 40 cycles

^bA product of the expected size was amplified from rainbow trout mRNA but not from walleye mRNA.

^cDetermination of the optimal Ta on the Eppendorf mastercycler[®] ep realplex⁴ was performed using the instrument's gradient technology and set at 60.5°C for *bactin*. On the Rotor-Gene RG3000, *dio2* and *bactin* amplifications were carried out simultaneously at a common Ta of 58°C.

Figure Legends

Fig. 1. Schematic map of the Ottawa River, indicating the three sampling sites (arrows) and selected cities.

Fig. 2. Plasma T_4 (A) and T_3 (B), and molar ratio of plasma $T_3:T_4$ (C) in immature walleye captured at three sites in the Ottawa River. Plasma hormone levels were measured by solid-phase RIA and are expressed at the mean $\pm$ SEM. Different letters indicated significant differences between sites ($p < 0.05$, unless indicated: * $p < 0.01$ or ** $p < 0.001$).

Fig. 3. Putative D1 (A), D2 (B) and D3 (C) products amplified by touchdown PCR with degenerate primers. Lane 1 contains the 100-bp molecular ladder; Lane 2 contains the RT-PCR product amplified from walleye mRNA. Expected amplicon sizes were 359-bp, 299-pb and 576-bp for D1, D2 and D3, respectively. Products of the expected size were extracted from the gel, cloned and sequenced.

Fig. 4. (A) Nucleotide and deduced amino acid sequences of walleye D1 315-bp cDNA fragment. X = selenocysteine. (B) Nucleotide and deduced amino acid sequences of walleye D1 cDNA 326-bp transcript variant. X = selenocysteine. The 11-base insert is underlined.

Fig. 5. Tissue distribution of D1 (A), D2 (B), and D3 (C) mRNA levels in immature hatchery-raised walleye measured by semi-quantitative RT-PCR. L = liver, K = kidney, Sp = spleen, I = intestine, St = stomach, G = gills, B = brain, E = whole eye, H

= heart, M = skeletal muscle, Sk = skin. RT-PCR was performed with walleye-specific primers within the linear range of the reactions. RT-PCR amplification products were analysed by densitometry on ethidium bromide-stained agarose gels. Deiodinase mRNA levels ($n = 4$) were normalized to β -actin mRNA levels and are expressed as the mean $\pm$ SEM.

Fig. 6. Hepatic deiodinase mRNA levels in immature walleye captured at three sites in the Ottawa River. D1, D2 and D3 mRNA levels were measured by real-time PCR and normalized to β -actin mRNA levels using the delta-delta Ct method of relative quantitation. Data are expressed as the mean $\pm$ SEM. Different letters indicate significant differences between sites ($p < 0.05$).

FIGURE 1

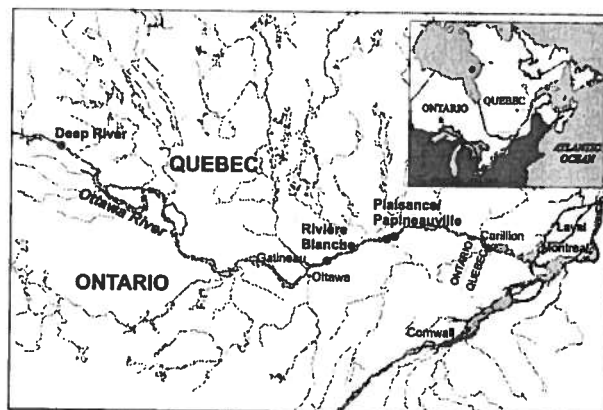
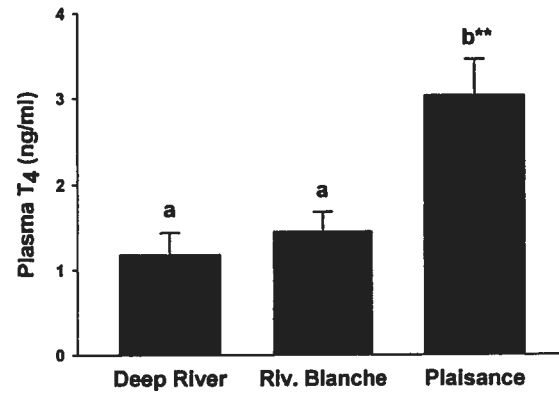
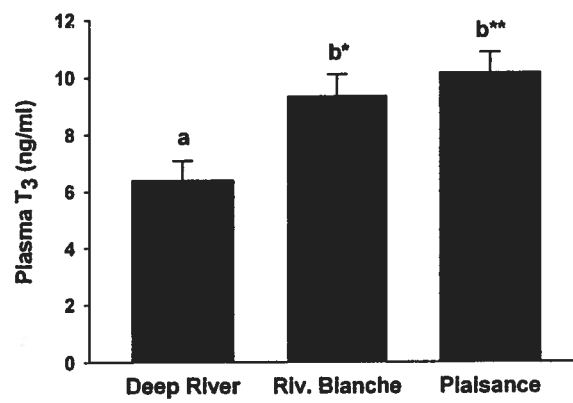


FIGURE 2

A



B



C

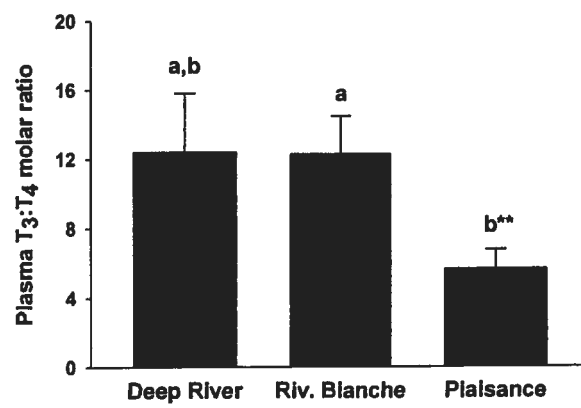


FIGURE 3

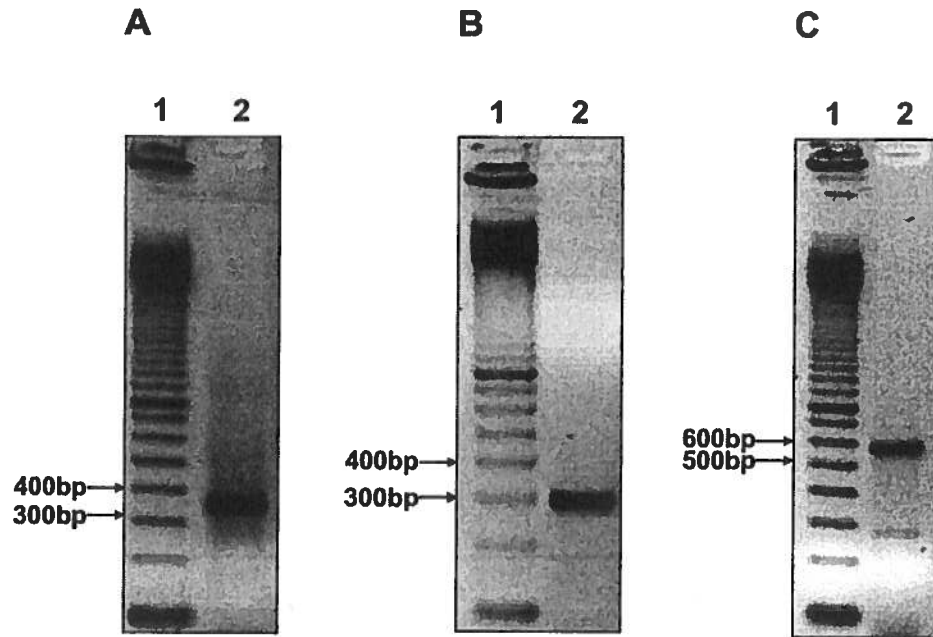


FIGURE 4

A

```

1 TTTGGAAGTTGCACCTGACCCCCGTTTATGTACAACTTGAGGAGTTCAAGCAACTCGTC 60
  F G S C T X P P F M Y K L E E F K Q L V
61 AAGGACTTCAGCGATGTAGCTGACTTTCTTGTGATCTACATCGCCGAGGCACATGCAACA 120
  K D F S D V A D F L V I Y I A E A H A T
121 GACGGTTTGGCCTTTACCAACAACCTTGACATCAACCAGCACCGGAGCCTGGAGGACAGG 180
  D G L A F T N N F D I N Q H R S L E D R
181 CTGTCTGCAGCACAGATCTTGGTTCAAAAGGAGCCCCAGTGTCCCGTGGTTGTGGATGAA 240
  L S A A Q I L V Q K E P Q C P V V V D E
241 ATGAATAATGTCTCTGCCATAAAGTATGGTGTCTGCCTGAGAGGCTTTATGTGCTGCAG 300
  M N N V S A I K Y G A L P E R L Y V L Q
301 GCTGGGAAGTTGTC 315
  A G K V V

```

B

```

1 TTTGGAAGTTGCACCTGACCCCCGTTTATGTACAACTTGAGGAGTTCAAGCAACTCGTC 60
  F G S C T X P P F M Y K L E E F K Q L V
61 AAGGACTTCAGCGATGTAGCTGACTTTCTTGTGATCTACATCGCCGAGGCACATGCAACA 120
  K D F S D V A D F L V I Y I A E A H A T
121 GGTGAGAGAAAGACGGTTTGGCCTTTACCAACAACCTTGACATCAACCAGCACCGGAGCC 180
  G E R K T V W P L P T T L T S T S T G A
181 TGGAGGACAGGCTGTCTGCAGCACAGATCTTGGTTCAAAAGGAGCCCCAGTGTCCCGTGG 240
  W R T G C L Q H R S W F K R S P S V P W
241 TTGTGGATGAAATGAATAATGTCTCTGCCATAAAGTATGGTGTCTGCCTGAGAGGCTTT 300
  L W M K - I M S L P - S M V L C L R G F
301 ATGTGCTGCAGGCTGGGAAAGTTGTC 326
  M C C R L G K L

```

FIGURE 5

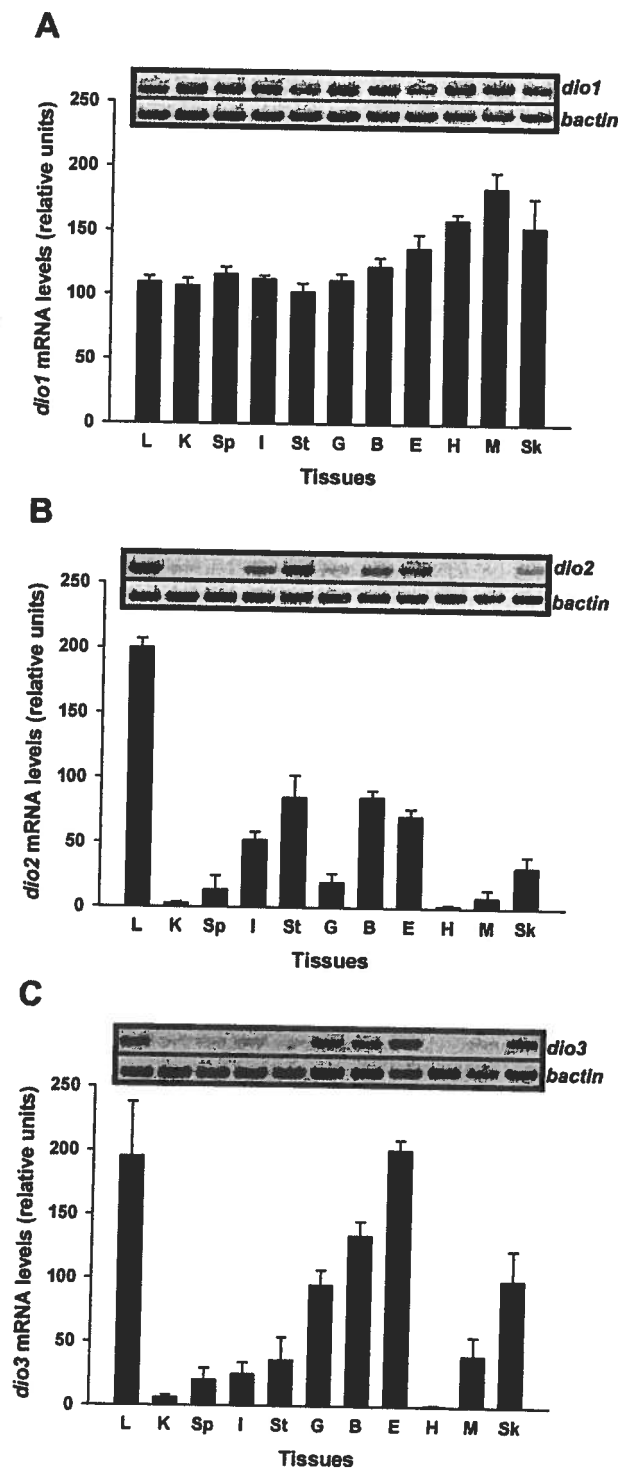
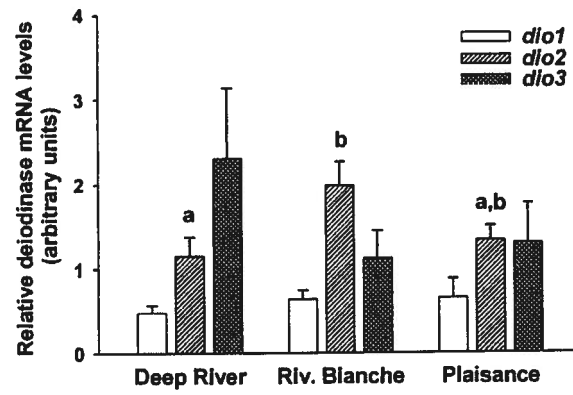


FIGURE 6



TROISIÈME PARTIE

DISCUSSION ET CONCLUSIONS

Discussion et conclusions

La présence dans l'environnement de substances ayant la capacité de moduler le système endocrinien des animaux est reconnue depuis les années 90. Ceci soulève d'importantes questions quant aux effets de ces ME sur la faune, sans compter les répercussions potentielles sur la santé des humains (Carpenter *et al.*, 2002 ; Brown *et al.*, 2004b). La présence de ME dans la Rivière des Outaouais est suggérée par un retard de 3-4 ans dans la maturation sexuelle des femelles du doré jaune en aval des effluents municipaux des villes d'Ottawa et de Gatineau et d'usines de pâtes et papier (Henri Fournier, observation personnelle). En raison du rôle que jouent les HT dans la maturation sexuelle des poissons (Cyr et Eales, 1996), l'hypothèse a été émise que cet effet pourrait être relié à un dérèglement des HT chez les dorés jaunes.

À la connaissance de l'auteur, il n'existe pas d'informations sur le système thyroïdien du doré jaune, une espèce d'importance autant écologique qu'économique. Les espèces de poissons généralement utilisées comme sentinelles de la présence des ME occupent un rang plus bas dans la chaîne alimentaire (p. ex., Jobling *et al.*, 1998 ; Zhou *et al.*, 1999 ; Aravindakshan *et al.*, 2004a ; Brown *et al.*, 2004b). En tant que grand prédateur et par la durée de son cycle biologique, le doré jaune se démarque de ces espèces au niveau de la régulation de sa croissance et de sa reproduction (Malison *et al.*, 1994 ; Henderson *et al.*, 2003 ; Shuter *et al.*, 2005). Puisque les HT sont impliquées dans la régulation de la croissance et de la reproduction, nous proposons le doré jaune comme modèle des grands prédateurs pour l'étude du système thyroïdien, et des effets des ME sur ce système. Ceci est donc le premier rapport d'une étude sur les HT et les déiodinases du doré jaune.

Eales et collaborateurs (1999) recommandent d'inclure une mesure de la déiodination dans l'étude des contaminants sur le système thyroïdien des poissons. Ainsi, les travaux de recherche présentés dans ce mémoire avaient comme objectif d'examiner les taux d'HT chez les dorés jaunes immatures de la Rivière des Outaouais, de

déterminer la présence et la localisation des trois déiodinases chez le doré jaune, et d'évaluer si le taux hépatique d'ARNm des déiodinases pourrait servir de biomarqueur moléculaire d'une modulation des HT chez le doré jaune de la Rivière des Outaouais. Ce genre de biomarqueur serait d'une grande utilité, puisqu'il nécessite peu de tissu et permet ainsi d'identifier *in vivo* l'effet des contaminants sur des petits poissons, dont ceux en développement, qui seraient particulièrement sensibles aux modulations des HT. Les travaux présentés dans ce mémoire sont les premiers qui cherchent à valider un biomarqueur moléculaire de l'effet des contaminants sur le système thyroïdien du poisson.

Les taux plasmatiques de T_3 et de T_4 ont été mesurés par radioimmunoessai chez les dorés jaunes immatures de la Rivière des Outaouais. Ceci est la première étude qui rapporte les taux plasmatiques d'HT du doré jaune. Le taux plasmatique de T_3 était 10 fois plus élevé que celui de T_4 chez le doré jaune, tandis que ces taux sont du même ordre de grandeur chez les salmonidés et le tilapia ; de plus, le taux de T_4 dépasse celui de T_3 chez la perchaude immature (Cyr et Eales, 1988a, Hontela *et al.*, 1995 ; Van der Geyten *et al.*, 2001 ; Wiens et Eales, 2005). Ceci suggère que le doré jaune, un grand prédateur, requiert de plus hauts taux plasmatiques d'HT que les autres téléostéens, même ceux de la famille des percidés.

De plus, les taux plasmatique de T_3 et de T_4 étaient plus élevés chez les dorés jaunes immatures de Plaisance et de Rivière Blanche (T_3 seulement), en aval d'Ottawa et de Gatineau, comparativement au site de référence en amont. En revanche, le ratio molaire de $T_3:T_4$ étaient plus bas à Plaisance uniquement. Ces résultats représentent la première mention d'une modulation des HT dans une espèce habitant dans la Rivière des Outaouais. Ceci suggère une plus grande disponibilité des HT aux tissus périphériques, ainsi qu'une modification dans la régulation des taux d'HT.

Pour le deuxième objectif, afin d'adresser le manque d'information sur le système thyroïdien du doré jaune, les trois déiodinases, la D1, la D2 et la D3, ont été clonées chez le doré jaune suivant une stratégie par RT-PCR avec des amorces dégénérées. Bien que seulement une partie de la séquence codante ait été clonée, plusieurs facteurs nous permettent de conclure que les trois séquences obtenues correspondent aux

déiodinases chez le doré jaune (voir Article). Avec le tilapia, le doré jaune est ainsi un des premiers poissons chez qui les trois déiodinases ont été clonées.

La D1 du doré jaune est la cinquième D1 à être clonée chez les poissons (Sanders *et al.*, 1997 ; Orozco *et al.*, 2003 ; Thisse *et al.*, 2003 ; Klaren *et al.*, 2005). Ces travaux de recherche amènent de nouvelles informations sur l'expression de cette enzyme. En effet, la D1 est exprimée de manière constitutive dans tous les tissus sondés chez le doré jaune immature, ce qui n'est pas le cas pour la D1 chez les autres téléostéens post-larvaires étudiés jusqu'à maintenant (Sanders *et al.*, 1997 ; Orozco *et al.*, 2003 ; Klaren *et al.*, 2005). La D1 pourrait donc jouer un rôle plus large chez le doré jaune que chez ces autres espèces. Par ailleurs, la possibilité d'un épissage alternatif chez la D1 reste à confirmer, mais serait la première indication d'un tel phénomène pour cette enzyme.

La D2 du doré jaune est la sixième D2 à être clonée chez les poissons (Van der Geyten *et al.* 2001 ; Orozco *et al.*, 2002 ; Sambroni *et al.*, 2002 ; Sutija *et al.*, 2003 ; Thisse *et al.*, 2003 ; Marchand *et al.*, 2004). Sa forte expression dans le foie confirme les observations d'autres études quant à la localisation tissulaire de la D2 chez les poissons. La D3 clonée chez le doré jaune se joint aux quatre séquences de D3 déjà connues chez les poissons (Adams, 1999 ; Sanders *et al.*, 1999 ; Sutija *et al.*, 2004 ; Bres *et al.*, 2006). La présence du produit de transcription de cette enzyme dans le foie, dans les branchies, dans le cerveau et dans la peau correspond au profil d'expression observé dans la littérature. Ceci est par contre la première indication de l'expression de D3 dans l'œil et dans la peau, et appuie un rôle de l'activité des déiodinases dans le développement de ces tissus chez les poissons (Fenton *et al.*, 1997 ; Deutschlander *et al.*, 2001).

Pour le troisième objectif, dans le but de développer un nouveau biomarqueur moléculaire d'un dérèglement des HT, nous avons mis en place un essai par PCR en temps réel afin d'évaluer le taux d'ARNm des trois déiodinases chez le doré jaune. La seule différence observée chez les dorés jaunes immatures de la Rivière des Outaouais fut pour la D2 : le taux hépatique de l'ARNm de D2 était plus élevé à Rivière Blanche comparativement aux deux autres sites. Ainsi, les taux d'HT plus élevés chez les dorés jaunes de Rivière Blanche et de Plaisance comparativement à ceux de Deep River ne

semblent pas réguler les taux hépatiques d'ARNm des déiodinases, selon ce qui est observé dans la littérature. En effet, lors d'hyperthyroïdie induite par immersion ou par injection, les taux d'ARNm de D1 et de D2 diminuaient, tandis que ce taux augmentait pour D3 (Van der Geyten *et al.*, 2001 ; Garcia-G *et al.*, 2004 ; Bres *et al.*, 2006). Par contre, la régulation de l'expression des déiodinases par les HT reste à être démontrée chez le doré, et n'a d'ailleurs jamais encore été étudiée chez un grand prédateur téléostéen.

L'expression hépatique des déiodinases, et surtout de D3, présentait de fortes variations inter-individuelles. Cette variabilité pourrait être due à la forte sensibilité de D3 à des facteurs externes, tels l'alimentation ou les perturbations physiques (Johnston *et al.*, 1996 ; Plohman *et al.*, 2002). Il se peut que le stress de capture, bien que comparable entre les sites, ait masqué les interactions entre les taux plasmatiques d'HT et l'expression et l'activité des déiodinases hépatiques, et ce, dans l'ensemble des sites. D'autres biomarqueurs moins variables, par exemple l'activité des déiodinases, devraient s'ajouter au design expérimental des études ultérieures afin de cibler plus précisément l'effet des contaminants environnementaux sur la cascade des HT chez le doré jaune (Eales *et al.*, 1999 ; Brown *et al.*, 2004b). Cela dit, ces travaux de recherche sont les premiers à évaluer l'expression des déiodinases comme biomarqueur d'une perturbation des HT chez les poissons habitant dans leur milieu naturel.

Plusieurs contaminants présents à Rivière Blanche et Plaisance, dont ceux retrouvés dans les effluents municipaux et des usines de pâtes et papier, ont la capacité de moduler le système endocrinien des poissons, dont les HT (Brown *et al.*, 2004). La présence de xénoestrogènes dans la Rivière des Outaouais est confirmée par l'induction de la vitellogénine chez les queues à tache noire mâles en aval d'Ottawa et de Gatineau (Aravindakshan *et al.*, 2004a). Les interactions entre les hormones sexuelles et les HT sont bien documentées chez les poissons ; l'E₂ et les xénoestrogènes retrouvés dans les effluents municipaux, tel le NP, réduisent typiquement les taux d'HT (Cyr et Eales, 1988a,b, 1989, 1996; Brown *et al.*, 2004b ; McCormick *et al.*, 2005 ; Wiens and Eales, 2005). Par contre, puisque les taux d'HT se trouvent augmentés et non diminués chez le doré jaune de la Rivière des Outaouais, les xénoestrogènes ne seraient probablement pas les seuls contaminants impliqués

dans la modulation des HT observée lors de cette étude. De plus, le site de Rivière Blanche, où seul le taux de T_3 est augmenté, est situé près de l'émissaire de l'usine de traitement des eaux de la ville de Gatineau, tandis que Plaisance, où les taux d'HT sont plus fortement modulés, est à plusieurs kilomètres en aval de cet émissaire.

Les dorés jaunes capturés à Plaisance n'étaient donc exposés qu'à des concentrations très diluées d'effluents municipaux provenant d'Ottawa et de Gatineau; par contre, ils ont été pêchés immédiatement en aval de l'usine de pâtes et papier de Thurso, QC. Ceci confirme que les taux d'HT du doré jaune peuvent être augmentés suite à une exposition à ce type d'effluent, tel qu'observé chez deux cyprinidés, le meunier noir et le carassin (Munkittrick *et al.*, 1991 ; Kukkonen *et al.*, 1999). Il est aussi possible que les dorés jaunes se déplacent librement en aval des barrages hydroélectriques à Gatineau, et ainsi entre Rivière Blanche et Plaisance. Dans ce cas, les résultats présentés suggèrent qu'une exposition à court terme aux contaminants présents à Plaisance seraient plus susceptibles de moduler les HT chez le doré jaune que ceux présents à Rivière Blanche.

Des modulations des taux d'HT ont été observées aux même sites que ceux où la maturation sexuelle des dorés jaunes femelles démontre un retard de 3-4 ans. Un lien entre ces deux phénomènes est donc suggéré par ces travaux, compte tenu le rôle que jouent les HT dans l'initiation de la maturation ovarienne des poissons (Cyr et Eales, 1996). De plus, l'exposition à des effluents d'usines de pâtes et papier est souvent reliée à des anomalies chez la reproduction chez les femelles, dont un retard dans la maturation sexuelle (Gagnon *et al.*, 1995 ; Munkittrick *et al.*, 1998 ; Sépulveda *et al.*, 2001, 2004 ; Sandström et Neuman, 2003). Plusieurs études rapportent par ailleurs un taux de croissance accru et un indice de condition (K) plus élevé chez les poissons exposés à ce type d'effluent, ce qui a été attribué à une dérégulation métabolique (possiblement d'origine endocrinienne) et/ou un enrichissement nutritif par les effluents. (Gagnon *et al.*, 1995 ; Munkittrick *et al.*, 1998 ; Sandström et Neuman, 2003). La combinaison d'irrégularités au niveau de la reproduction et du métabolisme suggère un dérèglement potentiel des HT.

Par ailleurs, les dorés jaunes immatures de cette étude ont été pris en octobre, précisément au moment où le signal endocrinien déclenche l'initiation de la

maturation sexuelle chez les femelles (Malison *et al.*, 1994 ; Henderson *et al.*, 2003). Le lien entre les effluents des usines de pâtes et papier, le retard de la maturation sexuelle des femelles et les hormones thyroïdiennes reste à confirmer, mais est appuyé par les résultats de la présente étude.

Toutefois, il est nécessaire de souligner qu'aucunes mesures des contaminants aquatiques n'ont été effectuées aux sites ciblés dans cette étude, ni dans les tissus des dorés jaunes qui y habitent. Le lien de cause à effet entre les contaminants présents dans la Rivière des Outaouais et la hausse des taux d'HT chez le doré jaune est donc circonstanciel, et doit être démontré suivant des expositions contrôlées aux effluents ou aux contaminants présents dans le système. Ce type d'expérience permettrait de différencier entre les effets directs des effluents sur la régulation des HT chez le poisson et les effets indirects, par exemple ceux qui modifieraient la chaîne trophique et ainsi l'alimentation des prédateurs dans l'écosystème. Les travaux présentés dans ce mémoire ont permis d'identifier un site, Plaisance, où il serait pertinent de continuer les recherches, particulièrement en ce qui a trait aux contaminants présents dans les effluents de l'usine de pâtes et papier à Thurso.

Dans cette optique, des expériences sont actuellement en cours pour déterminer l'effet des effluents de pâtes et papier déversés à Plaisance sur l'expression des déiodinases hépatiques chez des poissons immatures exposés en aquarium. Ainsi, il sera possible d'évaluer la réponse de ce nouveau biomarqueur un contexte contrôlé, et aussi de comparer l'expression des déiodinases avec d'autres biomarqueurs qui sont potentiellement moins variables, tel l'activité des déiodinases hépatiques ou l'expression d'autres gènes régulés par les HT, dont les TR.

En somme, les trois objectifs fixés ont été atteints lors des travaux de recherche présentés dans ce mémoire. Ceci est le premier rapport d'une modulation des HT chez le doré jaune. Il serait intéressant de confirmer si ce dérèglement est causé par les effluents des usines de pâtes et papier situés sur la Rivière des Outaouais, et si la modulation des HT est reliée aux retards dans la maturation des dorés femelles. Deuxièmement, les séquences et la distribution de l'expression tissulaire des trois déiodinases chez le doré jaune contribuent aux connaissances sur l'endocrinologie de cette espèce modèle des grands prédateurs. Finalement, l'évaluation de l'expression

des déiodinases hépatiques en tant que nouveau biomarqueur moléculaire indique que ce paramètre ne reflète pas le dérèglement des HT subi par les dorés jaunes dans la Rivière des Outaouais. Il serait alors pertinent d'inclure d'autres biomarqueurs d'une modulation du système thyroïdien, afin de mieux comprendre la réponse de ce poisson aux contaminants environnementaux.

Liste des références

- ADAMS, B.A. 1999. The effects of polychlorinated biphenyls 77 and 126 on the thyroidal status of a marine flatfish, the American plaice (*Hippoglossoides platessoides*). Mémoire de maîtrise, Winnipeg, University of Manitoba, 175 p.
- ADAMS, B. A., D. G. Cyr et J. G. Eales. 2000. Thyroid hormone deiodination in tissues of American plaice, *Hippoglossoides platessoides*: characterization and short-term responses to polychlorinated biphenyls (PCBs) 77 and 126. Comparative Biochemistry and Physiology, C: Toxicology and Pharmacology, vol. 127, p. 367-378.
- AERNI, H. R., B. Kobler, B. V. Rutishauser, F. E. Wettstein, R. Fischer, W. Giger, A. Hungerbühler, M. D. Marazuela, A. Peter, R. Schönenberger, A. C. Vogeli, M. J. Suter et R. I. Eggen. 2004. Combined biological and chemical assessment of estrogenic activities in wastewater treatment plant effluents. Analytical and Bioanalytical Chemistry, vol. 378, p. 688-696.
- ALVAREZ, L., S. Hernandez, R. Martinez-de-Mena, R. Kolliker-Frers, M. J. Obregon et D. L. Kleiman de Pisarev. 2005. The role of type I and type II 5' deiodinases on hexachlorobenzene-induced alteration of the hormonal thyroid status. Toxicology, vol. 207, p. 349-362.
- AOKI, Y., M. Takahashi, T. Masuda, T. Tsukamoto, M. Iigo et T. Yanagisawa. 2005. Molecular cloning of prepro-thyrotropin-releasing hormone cDNAs from the common carp *Cyprinus carpio* and goldfish *Carassius auratus*. General and Comparative Endocrinology, vol. 141, p. 84-92.
- ARAVINDAKSHAN, J., V. Paquet, M. Gregory, J. Dufresne, M. Fournier, D. J. Marcogliese et D. G. Cyr. 2004a. Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). Toxicological Sciences, vol. 78, p. 156-165.
- ARAVINDAKSHAN, J., M. Gregory, D. J. Marcogliese, M. Fournier et D. G. Cyr. 2004b. Consumption of xenoestrogen-contaminated fish during lactation alters adult male reproductive function. Toxicological Sciences, vol. 81, p. 179-189.
- BABIN, P. J. 1992. Binding of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine to trout plasma lipoproteins. American Journal of Physiology, vol. 262, p. E712-E720.
- BALCH, G. C., L. A. Velez-Espino, C. Sweet, M. Alaei et C. D. Metcalfe. 2006. Inhibition of metamorphosis in tadpoles of *Xenopus laevis* exposed to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs). Chemosphere, vol. 64, p. 328-338.
- BASSETT, J. H., C. B. Harvey et G. R. Williams. 2003. Mechanisms of thyroid hormone receptor-specific nuclear and extra nuclear actions. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 213, p. 1-11.
- BAU, F. et J. P. Parent. 2000. Seasonal variations of thyroid hormone levels in wild

- fish. Comptes Rendus de l'Académie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie, vol. 323, p. 365-372.
- BECK, V., S. A. Roelens et V. M. Darras. 2006. Exposure to PCB 77 induces tissue-dependent changes in iodothyronine deiodinase activity patterns in the embryonic chicken. General and Comparative Endocrinology, sous presse.
- BERGH, J. J., H. Y. Lin, L. Lansing, S. N. Mohamed, F. B. Davis, S. Mousa et P. J. Davis. 2005. Integrin $\alpha V\beta 3$ contains a cell surface receptor site for thyroid hormone that is linked to activation of mitogen-activated protein kinase and induction of angiogenesis. Endocrinology, vol. 146, p. 2864-2871.
- BERTOLO, A. et P. Magnan. 2005. The relationship between piscivory and growth of white sucker (*Catostomus commersoni*) and yellow perch (*Perca flavescens*) in headwater lakes of the Canadian Shield. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 62, p. 2706-2715.
- BIANCO, A. C., D. Salvatore, B. Gereben, M. J. Berry et P. R. Larsen. 2002. Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. Endocrine Reviews, vol. 23, p. 38-89.
- BJÖRNSSON, B. T., O. Halldorsson, C. Haux, B. Norberg et C. L. Brown. 1998. Photoperiod control of sexual maturation of the Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): plasma thyroid hormone and calcium levels. Aquaculture, vol. 166, p. 117-140.
- BOAS, M., U. Feldt-Rasmussen, N. E. Skakkebaek et K. M. Main. 2006. Environmental chemicals and thyroid function. European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies, vol. 154, p. 599-611.
- BOEUF, G., D. Boujard et J. Person-Le Ruyet. 1999. Control of somatic growth in turbot. J Fish Biol, vol. 55A, p. 128-147.
- BOUDOU, A. et F. Ribeyre. 1997. Aquatic ecotoxicology: from the ecosystem to the cellular and molecular levels. Environmental Health Perspectives, vol. 105, Suppl. 1, p. 21-35.
- BRADFORD, C. M., J. Rinchard, J. A. Carr et C. Theodorakis. 2005. Perchlorate affects thyroid function in eastern mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) at environmentally relevant concentrations. Environ Sci Technol, vol. 39, p. 5190-5195.
- BRES, O., D. G. Cyr et J. G. Eales. 1990. Factors influencing the affinity and capacity of T_3 -binding sites in hepatic nuclei of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Experimental Zoology, vol. 254, p. 63-71.
- BRES, O. et J. G. Eales. 1986. Thyroid hormone binding to isolated trout (*Salmo gairdneri*) liver nuclei in vitro: binding affinity, capacity, and chemical specificity. General and Comparative Endocrinology, vol. 61, p. 29-39.
- BRES, O., J. C. Plohm et J. G. Eales. 2006. A cDNA for a putative type III

deiodinase in the trout (*Oncorhynchus mykiss*): influence of holding conditions and thyroid hormone treatment on its hepatic expression. General and Comparative Endocrinology, vol. 145, p. 92-100.

BRISSON, A., J. Marchelidon et F. Lachiver. 1974. Comparative studies on the amino acid composition of thyroglobulins from various lower and higher vertebrates: phylogenetic aspect. Comparative Biochemistry and Physiology. B: Comparative Biochemistry, vol. 49, p. 51-63.

BROUWER, A., D. C. Morse, M. C. Lans, A. G. Schuur, A. J. Murk, E. Klasson-Wehler, A. Bergman et T. J. Visser. 1998. Interactions of persistent environmental organohalogenes with the thyroid hormone system: mechanisms and possible consequences for animal and human health. Toxicology and Industrial Health, vol. 14, p. 59-84.

BROWN, C. L., S. I. Doroshov, J. M. Nunez, C. Hadley, J. Vaneenennaam, R. S. Nishioka et H. A. Bern. 1988. Maternal triiodothyronine injections cause increases in swimbladder inflation and survival rates in larval striped bass, *Morone saxatilis*. Journal of Experimental Zoology, vol. 248, p. 168-176.

BROWN, D. D. 2005. The role of deiodinases in amphibian metamorphosis. Thyroid, vol. 15, p. 815-821.

BROWN, D. D. 1997. The role of thyroid hormone in zebrafish and axolotl development. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 94, p. 13011-6.

BROWN, S. B., R. E. Evans, L. Vandenbyllardt, K. W. Finnson, V. P. Palace, A. S. Kane, A. Y. Yarechewski et D. C. Muir. 2004a. Altered thyroid status in lake trout (*Salvelinus namaycush*) exposed to co-planar 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. Aquatic Toxicology, vol. 67, p. 75-85.

BROWN, S. B., B. A. Adams, D. G. Cyr et J. G. Eales. 2004b. Contaminant effects on the teleost fish thyroid. Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 23, p. 1680-1701.

CARLETTA, M. A., P. Weis et J. S. Weis. 2002. Development of thyroid abnormalities in mummichogs, *Fundulus heteroclitus*, from a polluted site. Mar Environ Res, vol. 54, p. 601-604.

CARPENTER, D. O., K. Arcaro et D. C. Spink. 2002. Understanding the human health effects of chemical mixtures. Environmental Health Perspectives, vol. 110, Suppl. 1, p. 25-42.

CERDA-REVERTER, J. M., S. Zanuy, M. Carrillo et O. Kah. 1996. Development of enzyme immunoassays for 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and L-thyroxine: time-course studies on the effect of food deprivation on plasma thyroid hormones in two marine teleosts, sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) and sea bream (*Sparus aurata* L.). General and Comparative Endocrinology, vol. 103, p. 290-300.

- CHAKRABORTI, P. et S. Bhattacharya. 1984. Plasma thyroxine levels in freshwater perch: influence of season, gonadotropins, and gonadal hormones. General and Comparative Endocrinology, vol. 53, p. 179-186.
- CHAKRABORTI, P., Rakshit, D. K. et S. Bhattacharya. 1983. Influence of season, gonadotropins, and gonadal hormones on the thyroid activity of freshwater perch, *Anabas testudineus* (Bloch). Canadian Journal of Zoology, vol. 61, p. 359-364.
- CHATTERJEE, A., Y. L. Hsieh et J. Y. Yu. 2001. Molecular cloning of cDNA encoding thyroid stimulating hormone β subunit of bighead carp *Aristichthys nobilis* and regulation of its gene expression. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 174, p. 1-9.
- CHAUBE, R. et K. P. Joy. 2005. Cyclic AMP-protein kinase a and protein kinase C mediate in vitro T activation of brain tyrosine hydroxylase in the female catfish *Heteropneustes fossilis*. Journal of Neuroendocrinology, vol. 17, p. 91-96.
- CHAURASIA, S. S. et A. Kar. 1999. An oxidative mechanism for the inhibition of iodothyronine 5'-monodeiodinase activity by lead nitrate in the fish, *Heteropneustes fossilis*. Water, Air, and Soil Pollution, vol. 111, p. 417-423.
- CHIBA, H., M. Amano, H. Yamada, Y. Fujimoto, D. Ojima, K. Okuzawa, T. Yamanome, K. Yamanori et M. Iwata. 2004. Involvement of gonadotropin-releasing hormone in thyroxine release in three different forms of teleost fish: barfin flounder, masu salmon and goldfish. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 30, p. 267-273.
- COIMBRA, A. M., M. A. Reis-Henriques et V. M. Darras. 2005. Circulating thyroid hormone levels and iodothyronine deiodinase activities in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following dietary exposure to Endosulfan and Aroclor 1254. Comparative Biochemistry and Physiology, C: Toxicology and Pharmacology, vol. 141, p. 8-14.
- COLBORN, T. 2002. Clues from wildlife to create an assay for thyroid system disruption. Environmental Health Perspectives, vol. 110, Suppl. 3, p. 363-367.
- COLBY, P.J. 1979. Synopsis of biological data on the walleye, *Stizostedion v. vitreum* (Mitchill 1818). Rome : Food and Agriculture Organization of the United Nations, 139 p.
- COMEAU, L. A., S. E. Campana, J. M. Hanson et G. A. Chouinard. 2000. Seasonal changes of thyroid hormones in field-collected Atlantic cod in relation to condition indices, water temperature and photoperiod. Journal of Fish Biology, vol. 57, p. 571-588.
- COOKE, P. S., R. A. Hess, J. Porcelli et E. Meisami. 1991. Increased sperm production in adult rats after transient neonatal hypothyroidism. Endocrinology, vol. 129, p. 244-248.
- COUGHLIN, D. J., J. A. Forry, S. M. McGlinchey, J. Mitchell, K. A. Saporetti et K. A. Stauffer. 2001. Thyroxine induces transitions in red muscle kinetics and steady swimming kinematics in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Journal of

Experimental Zoology, vol. 290, p. 115-124.

CRANE, H. M., D. B. Pickford, T. H. Hutchinson et J. A. Brown. 2004. Developmental changes of thyroid hormones in the fathead minnow, *Pimephales promelas*. General and Comparative Endocrinology, vol. 139, p. 55-60.

CRANE, H. M., D. B. Pickford, T. H. Hutchinson et J. A. Brown. 2005. Effects of ammonium perchlorate on thyroid function in developing fathead minnows, *Pimephales promelas*. Environmental Health Perspectives, vol. 113, p. 396-401.

CRANE, H. M., D. B. Pickford, T. H. Hutchinson et J. A. Brown. 2006. The effects of methimazole on development of the fathead minnow, *Pimephales promelas*, from embryo to adult. Toxicological Sciences, sous presse.

CRUMP, D., K. Werry, N. Veldhoen, G. Van Aggelen et C. C. Helbing. 2002. Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone-dependent gene expression and metamorphosis in *Xenopus laevis*. Environmental Health Perspectives, vol. 110, p. 1199-1205.

CYR, D. G., N. R. Bromage, J. Duston et 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*. General and Comparative Endocrinology, vol. 69, p. 217-225.

CYR, D. G. et J. G. Eales. 1992. Effects of short-term 17 β -estradiol treatment on the properties of T4-binding proteins in the plasma of immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Journal of Experimental Zoology, vol. 262, p. 414-419.

CYR, D. G. et J. G. Eales. 1989. Effects of short-term 17 β -estradiol treatment on the properties of T3-binding proteins in the plasma of immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Journal of Experimental Zoology, vol. 252, p. 245-251.

CYR, D. G. et J. G. Eales. 1988. In vitro effects of thyroid hormones on gonadotropin-induced estradiol-17 β secretion by ovarian follicles of rainbow trout, *Salmo gairdneri*. General and Comparative Endocrinology, vol. 69, p. 80-87.

CYR, D. G. et J. G. Eales. 1988. Influence of thyroidal status on ovarian function in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Journal of Experimental Zoology, vol. 248, p. 81-87.

CYR, D. G. et J. G. Eales. 1996. Interrelationships between thyroidal and reproductive endocrine systems in fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, vol. 6, p. 165-200.

CYR, D. G., D. R. Idler, C. Audet, J. M. McLeese et J. G. Eales. 1998. Effects of long-term temperature acclimation on thyroid hormone deiodinase function, plasma thyroid hormone levels, growth, and reproductive status of male Atlantic cod, *Gadus morhua*. General and Comparative Endocrinology, vol. 109, p. 24-36.

CYR, D. G., D. L. MacLachy et J. G. Eales. 1988. The influence of short-term 17 β -estradiol treatment on plasma T3 levels and in vitro hepatic T4 5'-monodeiodinase activity in immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*. General and Comparative

- Endocrinology, vol. 69, p. 431-438.
- DARLING, D. S., W. W. Dickhoff et A. Gorbman. 1982. Comparison of thyroid hormone binding to hepatic nuclei of the rat and a teleost (*Oncorhynchus kisutch*). Endocrinology, vol. 111, p. 1936-1943.
- DARNERUD, P. O. 2003. Toxic effects of brominated flame retardants in man and in wildlife. Environment International, vol. 29, p. 841-853.
- DATTA, M., R. J. Nagendra Prasad et S. Bhattacharya. 1999. Thyroid hormone regulation of perch ovarian 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4-isomerase activity: involvement of a 52-kDa protein. General and Comparative Endocrinology, vol. 113, p. 212-220.
- DATTA, M., R. J. Nagendra Prasad, A. K. Navneet, S. S. Roy et S. Bhattacharya. 2002. Thyroid hormone-induced protein (TIP) gene expression by 3,5,3'(-)-triiodothyronine in the ovarian follicle of perch (*Anabas testudineus*, Bloch): modulation of 3β -hydroxysteroid dehydrogenase/Delta(5)-Delta(4)-isomerase enzyme by TIP. General and Comparative Endocrinology, vol. 126, p. 334-341.
- DAVIS, P. J. et F. B. Davis. 1996. Nongenomic actions of thyroid hormone. Thyroid, vol. 6, p. 497-504.
- DE FRANCA, L. R., R. A. Hess, P. S. Cooke et L. D. Russell. 1995. Neonatal hypothyroidism causes delayed Sertoli cell maturation in rats treated with propylthiouracil: evidence that the Sertoli cell controls testis growth. Anatomical Record, vol. 242, p. 57-69.
- DE GROEF, B., S. Van der Geyten, V. M. Darras et E. R. Kuhn. 2006. Role of corticotropin-releasing hormone as a thyrotropin-releasing factor in non-mammalian vertebrates. General and Comparative Endocrinology, vol. 146, p. 62-68.
- DE JESUS, E. G., J. D. Toledo et M. S. Simpas. 1998. Thyroid hormones promote early metamorphosis in grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. General and Comparative Endocrinology, vol. 112, p. 10-16.
- DE, S., A. K. Ray et A. K. Medda. 1988. Demonstration of hepatic cytosolic malic enzyme activity as a thyroid hormone sensitive physiologic parameter in a teleost, *Heteropneustes fossilis* bloch. Hormone and Metabolic Research, vol. 20, p. 213-217.
- DEGITZ, S. J., G. W. Holcombe, K. M. Flynn, P. A. Kosian, J. J. Korte et J. E. Tietge. 2005. Progress towards development of an amphibian-based thyroid screening assay using *Xenopus laevis*. Organismal and thyroidal responses to the model compounds 6-propylthiouracil, methimazole, and thyroxine. Toxicological Sciences, vol. 87, p. 353-364.
- DENSLOW, N. D., J. Kocerha, M. S. Sepulveda, T. Gross et S. E. Holm. 2004. Gene expression fingerprints of largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to pulp and paper mill effluents. Mutation Research, vol. 552, p. 19-34.

DEVITO, M., L. Biegel, A. Brouwer, S. Brown, F. Brucker-Davis, A. O. Cheek, R. Christensen, T. Colborn, P. Cooke, J. Crissman, K. Crofton, D. Doerge, E. Gray, P. Hauser, P. Hurley, M. Kohn, J. Lazar, S. McMaster, M. McClain, E. McConnell, C. Meier, R. Miller, J. Tietge et R. Tyl. 1999. Screening methods for thyroid hormone disruptors. Environmental Health Perspectives, vol. 107, p. 407-415.

DIRECTION DE LA SANTÉ PUBLIQUE DE L'OUTAOUAIS. 1999. Profil de santé environnementale de la région de l'Outaouais. Québec : Régie Régionale de la Santé et des Services sociaux, 100 p.

DISTEFANO, J. J. 3rd, B. Ron, T. T. Nguyen, G. M. Weber et E. G. Grau. 1998. 3,5,3'-Triiodothyronine (T3) clearance and T3-glucuronide (T3G) appearance kinetics in plasma of freshwater-reared male tilapia, *Oreochromis mossambicus*. General and Comparative Endocrinology, vol. 111, p. 123-140.

DOHAN, O. et N. Carrasco. 2003. Advances in Na(+)/I(-) symporter (NIS) research in the thyroid and beyond. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 213, p. 59-70.

DORVAL, J., V. Leblond, C. Deblois et A. Hontela. 2005. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 24, p. 1273-1280.

EALES, J. G. et S. B. Brown. 1993. Measurement and regulation of thyroidal status in teleost fish. Reviews in Fish Biology and Fisheries, vol. 3, p. 299-347.

EALES, J. G., Brown, S. B., Cyr, D. G., Adams, B. A. et K.W. Finnson. 1999. Deiodination as an index of chemical disruption of thyroid hormone homeostasis and thyroidal status in fish. In D.S. Henshel, M.C. Black, and M.C. Harras (éds.). Environmental Toxicology and Risk Assessment: Standardization of Biomarkers for Endocrine Disruption and Environmental Assessment. West Conshohocken, PA : American Society for Testing and Materials, p. 136-164.

EALES, J. G., D. G. Cyr, K. W. Finnson et C. E. Johnston. 1991. Changes in plasma T₄ and T₃ levels during reconditioning and rematuration in male and female wild Atlantic salmon (*Salmo Salar*) kelts held in freshwater under two photoperiod regimes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 48, p. 2443-2448.

EALES, J. G., R. Devlin, D. A. Higgs, J. M. McLeese, J. D. Oakes et J. Plohman. 2004. Thyroid function in growth-hormone-transgenic coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Canadian Journal of Zoology, vol. 82, p. 1225-1229.

EALES, J. G., J. A. Holmes, J. M. McLeese et J. H. Youson. 1997. Thyroid hormone deiodination in various tissues of larval and upstream-migrant sea lampreys, *Petromyzon marinus*. General and Comparative Endocrinology, vol. 106, p. 202-210.

EALES, J. G., D. L. MacLatchy et R. M. Sweeting. 1993. Thyroid hormone deiodinase systems in salmonids, and their involvement in the regulation of thyroidal status. Fish Physiol Biochem, vol. 11, p. 313-321.

EALLES, J. G., J. M. McLeese, J. A. Holmes et J. H. Youson. 2000. Changes in intestinal and hepatic thyroid hormone deiodination during spontaneous metamorphosis of the sea lamprey, *Petromyzon marinus*. Journal of Experimental Zoology, vol. 286, p. 305-312.

EALLES, J. G. et S. Shostak. 1985. Free T4 and T3 in relation to total hormone, free hormone indices, and protein in plasma of rainbow trout and arctic charr. General and Comparative Endocrinology, vol. 58, p. 291-302.

EBBESSON, L. O. E., B. Th. Björnsson, S. O. Stefansson et P. Ekström. 1998. Propylthiouracil-induced hypothyroidism in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*: effects on plasma total thyroxine, total triiodothyronine, free thyroxine, and growth hormone. Fish Physiol Biochem, vol. 19, p. 305-314.

EDELIN, E., A. Bardonnnet, V. Bolliet, S. Dufour et P. Elie. 2005. Endocrine control of *Anguilla anguilla* glass eel dispersal: effect of thyroid hormones on locomotor activity and rheotactic behavior. Hormones and Behavior, vol. 48, p. 53-63.

EINARSDOTTIR, I. E., N. Silva, D. M. Power, H. Smaradottir et B. T. Björnsson. 2006. Thyroid and pituitary gland development from hatching through metamorphosis of a teleost flatfish, the Atlantic halibut. Anatomy and Embryology, vol. 211, p. 47-60.

ENEQVIST, T., E. Lundberg, A. Karlsson, S. Huang, C. R. Santos, D. M. Power et A. E. Sauer-Eriksson. 2004. High resolution crystal structures of piscine transthyretin reveal different binding modes for triiodothyronine and thyroxine. Journal of Biological Chemistry, vol. 279, p. 26411-26416.

ERAVCI, M., G. Pinna, H. Meinhold et A. Baumgartner. 2000. Effects of pharmacological and nonpharmacological treatments on thyroid hormone metabolism and concentrations in rat brain. Endocrinology, vol. 141, p. 1027-1040.

ESSNER, J. J., J. J. Breuer, R. D. Essner, S. C. Fahrenkrug et P. B. Hackett Jr. 1997. The zebrafish thyroid hormone receptor α 1 is expressed during early embryogenesis and can function in transcriptional repression. Differentiation, vol. 62, p. 107-117.

ESSNER, J. J., R. G. Johnson et P. B. Hackett Jr. 1999. Overexpression of thyroid hormone receptor α 1 during zebrafish embryogenesis disrupts hindbrain patterning and implicates retinoic acid receptors in the control of hox gene expression. Differentiation, vol. 65, p. 1-11.

FAGERLUND, U. H. M., I. McCallum, D. A. Higgs, J. R. McBride, M. D. Plotnikoff et B. S. Dosanjh. 1984. Diet composition as a factor in the anabolic efficacy of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine administered orally to steelhead trout (*Salmo gairdneri*). Aquaculture, vol. 36, p. 49-59.

FARCHI-PISANTY, O., P. B. Hackett Jr et B. Moav. 1995. Regulation of fish growth hormone transcription. Molecular Marine Biology and Biotechnology, vol. 4, p. 215-223.

FENTON, B., A. Orozco et C. Valverde. 1997. Kinetic characterisation of skin inner-

ring deiodinative pathway and its correlation with circulating levels of reverse triiodothyronine in developing rainbow trout. Journal of Endocrinology, vol. 154, p. 547-554.

FINES, G. A., J. Plohman et J. G. Eales. 1999. Effect of experimental 3,5,3'-triiodothyronine hyperthyroidism on thyroid hormone deiodination in brain regions and liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Canadian Journal of Zoology, vol. 77, p. 1185-1191.

FINNISON, K. W. et J. G. Eales. 1999. Effect of T(3) treatment and food ration on hepatic deiodination and conjugation of thyroid hormones in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, vol. 115, p. 379-386.

FINNISON, K. W. et J. G. Eales. 1997. Glucuronidation of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine by hepatic microsomes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology, C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, vol. 117, p. 193-199.

FINNISON, K. W. et J. G. Eales. 1996. Identification of thyroid hormone conjugates produced by isolated hepatocytes and excreted in bile of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, vol. 101, p. 145-154.

FINNISON, K. W. et J. G. Eales. 1998. Sulfation of thyroid hormones by liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology, C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, vol. 120, p. 415-420.

FINNISON, K. W., J. M. McLeese et J. G. Eales. 1999. Deiodination and deconjugation of thyroid hormone conjugates and type I deiodination in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, vol. 115, p. 387-397.

FISHER, J. S. 2004. Are all EDC effects mediated via steroid hormone receptors? Toxicology, vol. 205, p. 33-41.

FISHER, J. W., J. Campbell, S. Muralidhara, J. V. Bruckner, D. Ferguson, M. Mumtaz, B. Harmon, J. M. Hedge, K. M. Crofton, H. Kim et T. L. Almekinder. 2006. Effect of PCB 126 on hepatic metabolism of thyroxine and perturbations in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in the rat. Toxicological Sciences, vol. 90, p. 87-95.

FLOOD, C. G. et J. G. Eales. 1983. Effects of starvation and refeeding on plasma T4 and T3 levels and T4 deiodination in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. Canadian Journal of Zoology, vol. 61, p. 1949-1953.

FOLMAR, L. C., N. D. Denslow, K. Kroll, E. F. Orlando, J. Enblom, J. Marcino, C. Metcalfe et L. J. Guillette Jr. 2001. Altered serum sex steroids and vitellogenin induction in walleye (*Stizostedion vitreum*) collected near a metropolitan sewage treatment plant. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 40, p. 392-398.

- FRIESEMA, E. C., S. Ganguly, A. Abdalla, J. E. Manning Fox, A. P. Halestrap et T. J. Visser. 2003. Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter. Journal of Biological Chemistry, vol. 278, p. 40128-40135.
- FRITH, S. D. et J. G. Eales. 1996. Thyroid hormone deiodination pathways in brain and liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, vol. 101, p. 323-332.
- FUNKENSTEIN, B., C. J. Bowman, N. D. Denslow, M. Cardinali et O. Carnevali. 2000. Contrasting effects of estrogen on transthyretin and vitellogenin expression in males of the marine fish, *Sparus aurata*. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 167, p. 33-41.
- FUNKENSTEIN, B., V. Perrot et C. L. Brown. 1999. Cloning of putative piscine (*Sparus aurata*) transthyretin: developmental expression and tissue distribution. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 157, p. 67-73.
- GAGNON, M. M., Bussieres, D., Dodson, J. J. et P. V. Hodson. 1995. White sucker (*Catostomus commersoni*) growth and sexual maturation in pulp mill-contaminated and reference rivers. Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 14, p. 317-327.
- GALAROWICZ, T. L. et D. H. Wahl. 2005. Foraging by a young-of-the-year piscivore: the role of predator size, prey type, and density. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 62, p. 2330-2342.
- GARCIA AYALA, A., M. Villaplana, M. P. Garcia Hernandez, E. Chaves Pozo et B. Agulleiro. 2003. FSH-, LH-, and TSH-expressing cells during development of *Sparus aurata* L. (Teleostei). An immunocytochemical study. General and Comparative Endocrinology, vol. 134, p. 72-79.
- GARCIA-G, C., M. C. Jeziorski, C. Valverde-R et A. Orozco. 2004. Effects of iodothyronines on the hepatic outer-ring deiodinating pathway in killifish. General and Comparative Endocrinology, vol. 135, p. 201-209.
- GOMEZ, J. M., T. Boujard, G. Boeuf, A. Solari et P. Y. Le Bail. 1997. Individual diurnal plasma profiles of thyroid hormones in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to cortisol, growth hormone, and growth rate. General and Comparative Endocrinology, vol. 107, p. 74-83.
- GOTO-KAZETO, R., Y. Kazeto et J. M. Trant. 2003. Cloning and seasonal changes in ovarian expression of a TSH receptor in the channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 28, p. 339-340.
- GOULD, J. C., K. R. Cooper et C. G. Scanes. 1999. Effects of polychlorinated biphenyls on thyroid hormones and liver type I monodeiodinase in the chick embryo. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 43, p. 195-203.
- GOUVERNMENT DE L'ONTARIO. 2005. Le doré jaune - rapport sur l'état de la ressource dans la région du sud. Ministère des Richesses naturelles, Toronto.

GOUVERNEMENT DU QUÉBEC. 1996. Qualité des eaux de la rivière des Outaouais, 1979-1994. Direction des écosystèmes aquatiques, Ministère de l'environnement et de la faune. Québec.

GOVERNMENT OF MANITOBA. 2003. A Profile of Manitoba's Commercial Fishery. Manitoba Conservation, Fisheries Branch, Winnipeg.

GRAEB, B. D. S., T. Galarowicz, D. H. Wahl, J. M. Dettmers et M. J. Simpson. 2005. Foraging behavior, morphology, and life history variation determine the ontogeny of piscivory in two closely related predators. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 62, p. 2010-2020.

GRAVEL, A., Campbell, P. G., et A. Hontela. 2005. Disruption of the hypothalamo-pituitary- interrenal axis in 1+ yellow perch (*Perca flavescens*) chronically exposed to metals in the environment. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 62, p. 982-990.

GREENBLATT, M., C. L. Brown, M. Lee, S. Dauder et H. A. Bern. 1989. Changes in thyroid hormone levels in eggs and larvae and in iodide uptake by eggs of coho and chinook salmon, *Oncorhynchus kisutch* and *O. tshawytscha*. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 6, p. 261-278.

GUTLEB, A. C., I. A. T. M. Meerts, J. H. Bergsma , M. Schriks et A. J. Murk. 2005. T-Screen as a tool to identify thyroid hormone receptor active compounds. Environmental Toxicology and Pharmacology, vol. 19, p. 231-238.

HAMANO, K., K. Yosida, M. Suzuki et K. Ashida. 1996. Changes of thyrotropin-releasing hormone concentration in the brain and levels of prolactin and thyroxin in the serum during spawning migration of the chum salmon *Oncorhynchus keta*. General and Comparative Endocrinology, vol. 101, p. 275-281.

HAN, Y. S., I. C. Liao, W. N. Tzeng et J. Y. Yu. 2004. Cloning of the cDNA for thyroid stimulating hormone β subunit and changes in activity of the pituitary-thyroid axis during silvering of the Japanese eel, *Anguilla japonica*. Journal of Molecular Endocrinology, vol. 32, p. 179-194.

HARTMAN, K. J. et F. J. Margraf. 1993. Evidence of predatory control of yellow perch (*Perca flavescens*) recruitment in Lake Erie, U.S.A.. Journal of Fish Biology, vol. 43, p. 109-119.

HENDERSON, B. A., N. Collins, G. E. Morgan et A. Vaillancourt. 2003. Sexual size dimorphism of walleye (*Stizostedion vitreum vitreum*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 60 , p. 1345-1352.

HENDERSON, B. A. et G. E. Morgan. 2002. Maturation of walleye by age, size and surplus energy. Journal of Fish Biology, vol. 61, p. 999-1011.

HENDERSON, B. A., J. L. Wong et Nepszy S.J. 1996. Reproduction of walleye in Lake Erie: allocation of energy. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 53, p. 127-133.

- HERZOG, W., X. Zeng, Z. Lele, C. Sonntag, J. W. Ting, C. Y. Chang et M. Hammerschmidt. 2003. Adenohypophysis formation in the zebrafish and its dependence on sonic hedgehog. Developmental Biology, vol. 254, p. 36-49.
- HEWITT, L. M., J. L. Parrott, K. L. Wells, M. K. Calp, S. Biddiscombe, M. E. McMaster, K. R. Munkittrick et G. J. Van der Kraak. 2000. Characteritics of ligands for the Ah receptor and sex steroid in hepatic tissues of fish exposed to bleached kraft mill effluent. Environ Sci Technol, vol. 34, p. 4327-4334.
- HEY, J., E. Farrar, B. T. Bristow, C. Stettner et R. C. Summerfelt. 1996. Thyroid hormones and their influences on larval performance and incidence of cannibalism in walleye *Stizostedion vitreum*. Journal of the World Aquatic Society, vol. 27, p. 40-51.
- HIGGS, D. A., U. H. M. Fagerlund, J. G. Eales et J. R. McBride. 1982. Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. Comparative Biochemistry and Physiology, vol. 73B, p. 143-176.
- HIGGS, D. A., U. H. M. Fagerlund, J. R. McBride, H. M. Dye et E. M. Donaldson. 1977. Influence of combinations of bovine growth hormone, 17 α -methyltestosterone, and L-thyroxine on growth of yearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Canadian Journal of Zoology, vol. 55, p. 1048-1056.
- HIGGS, D. A., U. H. M. Fagerlund, J. R. McBride et J. G. Eales. 1979. Influence of orally administered L-thyroxine or 3,5,3'-triiodo-L-thyronine on growth, food consumption, and food conversion of underyearling coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Canadian Journal of Zoology, vol. 57, p. 1974-1979.
- HOFFMANN, J. L., S. P. Torontali, R. G. Thomason, D. M. Lee, J. L. Brill, B. B. Price, G. J. Carr et D. J. Versteeg. 2006. Hepatic gene expression profiling using Genechips in zebrafish exposed to 17 α -ethynylestradiol. Aquatic Toxicology, sous presse.
- HOLLOWAY, A. C. et J. F. Leatherland. 1997. Effect of gonadal steroid hormones on plasma growth hormone concentrations in sexually immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, vol. 105, p. 246-254.
- HOLLOWAY, A. C., M. A. Sheridan, G. Van der Kraak et J. F. Leatherland. 1999. Correlations of plasma growth hormone with somatostatin, gonadal steroid hormones and thyroid hormones in rainbow trout during sexual recrudescence. Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology, vol. 123, p. 251-260.
- HOLSBERGER, D. R. et P. S. Cooke. 2005. Understanding the role of thyroid hormone in Sertoli cell development: a mechanistic hypothesis. Cell and Tissue Research, vol. 322, p. 133-140.
- HOLSBERGER, D. R., S. E. Kiesewetter et P. S. Cooke. 2005. Regulation of neonatal Sertoli cell development by thyroid hormone receptor $\alpha 1$. Biology of Reproduction, vol. 73, p. 396-403.

- HONKANEN, J. O., A. Kostamo et J. V. Kukkonen. 2005. Toxicity of a phytosterol mixture to grayling (*Thymallus thymallus*) during early developmental stages. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 48, p. 391-396.
- HONTELA, A., P. Dumont, D. Duclos, et R. Fortin. 1995. Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 14, p. 725-731.
- HOOK, S. E., A. D. Skillman, J. A. Small et I. R. Schultz. 2006. Gene expression patterns in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, exposed to a suite of model toxicants. Aquatic Toxicology, vol. 77, p. 372-385.
- HUANG, H., L. Cai, B. F. Remo et D. D. Brown. 2001. Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlled by type II iodothyronine deiodinase in *Xenopus laevis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 98, p. 7348-7353.
- HUANG, L., A. M. Schreiber, B. Soffientino, D. A. Bengston et J. L. Specker. 1998. Metamorphosis of summer flounder (*Paralichthys dentatus*): Thyroid status and the timing of gastric gland formation. Journal of Experimental Zoology, vol. 280, p. 413-420.
- ISHIHARA, A., S. Sawatsubashi et K. Yamauchi. 2003. Endocrine disrupting chemicals: interference of thyroid hormone binding to transthyretins and to thyroid hormone receptors. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 199, p. 105-117.
- ITO, M., Y. Koide, N. Takamatsu, H. Kawauchi et T. Shiba. 1993. cDNA cloning of the β subunit of teleost thyrotropin. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 90, p. 6052-6055.
- IWAMURO, S., M. Sakakibara, M. Terao, A. Ozawa, C. Kurobe, T. Shigeura, M. Kato et S. Kikuyama. 2003. Teratogenic and anti-metamorphic effects of bisphenol A on embryonic and larval *Xenopus laevis*. General and Comparative Endocrinology, vol. 133, p. 189-198.
- JANZ, D. M., McMaster, M. E., Weber, L. P., Munkittrick, K. R. et G. Van der Kraak. 2001. Recovery of ovary size, follicle cell apoptosis, and HSP70 expression in fish exposed to bleached pulp mill effluent. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 58, p. 620-625.
- JOBLING, S., M. Nolan, C. R. Tyler, G. Brighty et J. P. Sumpter. 1998. Widespread sexual disruption in wild fish. Environmental Science and Technology, vol. 32, p. 2498-2506.
- JOHNSTON, C. E., Gordillo, C. et J.G. Eales. 1996. Transition from a hatchery to a laboratory environment induces inner-ring monodeiodination pathways for thyroid hormones in liver of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Canadian Journal of Zoology, vol. 74, p. 2178-2183.

- JONES, I., S. A. Rogers, P. Kille et G. E. Sweeney. 2002. Molecular cloning and expression of thyroid hormone receptor α during salmonid development. General and Comparative Endocrinology, vol. 125, p. 226-235.
- JONES, K. E., J. H. Brubaker et W. W. Chin. 1994. Evidence that phosphorylation events participate in thyroid hormone action. Endocrinology, vol. 134, p. 543-548.
- KAGABU, Y., T. Mishiba, T. Okino et T. Yanagisawa. 1998. Effects of thyrotropin-releasing hormone and its metabolites, Cyclo(His-Pro) and TRH-OH, on growth hormone and prolactin synthesis in primary cultured pituitary cells of the common carp, *Cyprinus carpio*. General and Comparative Endocrinology, vol. 111, p. 395-403.
- KANG, D.-Y. et Y. J. Chang. 2004. Effects of maternal injection of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3) on growth of newborn offspring of rockfish, *Sebastes schlegeli*. Aquaculture, vol. 234, p. 641-655.
- KANG, D.-Y. et R. H. Devlin. 2003. Effects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T3) and 6-n-propyl-2-thiouracil (PTU) on growth of GH-transgenic coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Fish Physiol Biochem, vol. 29, p. 77-85.
- KAO, Y., R. G. Manzon, M. A. Sheridan et J. H. Youson. 1999. Study of the relationship between thyroid hormones and lipid metabolism during KClO₄-induced metamorphosis of landlocked lamprey, *Petromyzon marinus*. Comparative Biochemistry and Physiology, C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, vol. 122, p. 363-373.
- KAWAKAMI, Y., M. Tanda, S. Adachi et K. Yamauchi. 2003. cDNA cloning of thyroid hormone receptor betas from the conger eel, *Conger myriaster*. General and Comparative Endocrinology, vol. 131, p. 232-240.
- KAWAKAMI, Y., M. Tanda, S. Adachi et K. Yamauchi. 2003. Characterization of thyroid hormone receptor alpha and beta in the metamorphosing Japanese conger eel, *Conger myriaster*. General and Comparative Endocrinology, vol. 132, p. 321-332.
- KEEN, P. L., D. A. Higgs, K. J. Hall et M. Ikonomou. 2005. Effects of dietary exposure of 4-nonylphenol on growth and smoltification of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Science of the Total Environment, vol. 349, p. 81-94.
- KIESSLING, A., J. Picknova, J. G. Eales, B. Dosanjh et D. Higgs. 2005. Age, ration level, and exercise affect the fatty acid profile of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) muscle differently. Aquaculture, vol. 243, p. 345-356.
- KIM, B. H., M. G. Ikonomou, S. J. Lee, H. S. Kim et Y. S. Chang. 2005. Concentrations of polybrominated diphenyl ethers, polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls in human blood samples from Korea. Science of the Total Environment, vol. 336, p. 45-56.
- KIPARISSIS, Y., R. Hughes, C. Metcalfe et T. Ternes. 2001. Identification of the isoflavonoid genistein in bleached kraft mill effluent. Environmental Science and Technology, vol. 35, p. 2423-2427.

KITAHASHI, T., H. Sato, Y. Sakuma et I. S. Parhar. 2005. Cloning and functional analysis of promoters of three GnRH genes in a cichlid. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 336, p. 536-543.

KITAMURA, S., T. Kato, M. Iida, N. Jinno, T. Suzuki, S. Ohta, N. Fujimoto, H. Hanada, K. Kashiwagi et A. Kashiwagi. 2005. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis. Life Sciences, vol. 76, p. 1589-1601.

KLAREN, P. H., R. Haasdijk, J. R. Metz, L. M. Nitsch, V. M. Darras, S. Van der Geyten et G. Flik. 2005. Characterization of an iodothyronine 5'-deiodinase in gilthead seabream (*Sparus auratus*) that is inhibited by dithiothreitol. Endocrinology, vol. 146, p. 5621-5630.

KOCH, H. M., H. Drexler et J. Angerer. 2004. Internal exposure of nursery-school children and their parents and teachers to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). International Journal of Hygiene and Environmental Health, vol. 207, p. 15-22.

KORTENKAMP, A. et R. Altenburger. 1999. Approaches to assessing combination effects of oestrogenic environmental pollutants. Science of the Total Environment, vol. 233, p. 131-140.

KUDO, Y. et K. Yamauchi. 2005. In vitro and in vivo analysis of the thyroid disrupting activities of phenolic and phenol compounds in *Xenopus laevis*. Toxicological Sciences, vol. 84, p. 29-37.

KUHN, E. R., K. L. Geris, S. van der Geyten, K. A. Mol et V. M. Darras. 1998. Inhibition and activation of the thyroidal axis by the adrenal axis in vertebrates. Comparative Biochemistry and Physiology, A: Molecular and Integrative Physiology, vol. 120, p. 169-174.

KUIPER, G. G., W. Klootwijk, G. Morvan Dubois, O. Destree, V. M. Darras, S. Van der Geyten, B. Demeneix et T. J. Visser. 2006. Characterization of recombinant *Xenopus laevis* type I iodothyronine deiodinase: substitution of a proline residue in the catalytic center by serine (Pro132Ser) restores sensitivity to 6-propyl-2-thiouracil. Endocrinology, vol. 147, p. 3519-3529.

KUKKONEN, J. V. K., Punta, E., Koponen, P., Paranko, J., Leppänen, H., Holopainen, I. J., et H. Hyvärinen. 1999. Biomarker responses by crucian carp (*Carassius carassius*) living in a pond of secondary treated pulp mill effluent. Water Science and Technology, vol. 40, p. 123-130.

KUMAR, R. S., S. Ijiri, K. Kight, P. Swanson, A. Dittman, D. Alok, Y. Zohar et J. M. Trant. 2000. Cloning and functional expression of a thyrotropin receptor from the gonads of a vertebrate (bony fish): potential thyroid-independent role for thyrotropin in reproduction. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 167, p. 1-9.

KUNG, M. P., S. W. Spaulding et J. A. Roth. 1988. Desulfation of 3,5,3'-triiodothyronine sulfate by microsomes from human and rat tissues. Endocrinology,

vol. 122, p. 1195-200.

KWON, J. Y., Y. J. Chang, Y. C. Sohn et K. Aida. 1999. Plasma and ovarian thyroxine levels in relation to sexual maturation and gestation in female *Sebastes inermis*. Journal of Fish Biology, vol. 54, p. 370-379.

LACORTE, S., Latorre, A., Barcélo, D., Rigol, A., Malmqvist, A. et T. Welanders. 2003. Organic compounds in paper-mill process waters and effluents. Trends in Analytical Chemistry, vol. 22, p. 727-737.

LAM, S. H., Y. M. Sin, Z. Gong et T. J. Lam. 2005. Effects of thyroid hormone on the development of immune system in zebrafish. General and Comparative Endocrinology, vol. 142, p. 325-335.

LARSEN, D. A., J. T. Dickey et W. W. Dickhoff. 1997. Quantification of salmon α - and thyrotropin (TSH) β -subunit messenger RNA by an RNase protection assay: regulation by thyroid hormones. General and Comparative Endocrinology, vol. 107, p. 98-108.

LARSEN, D. A., P. Swanson, J. T. Dickey, J. Rivier et W. W. Dickhoff. 1998. *In vitro* thyrotropin-releasing activity of corticotropin-releasing hormone-family peptides in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. General and Comparative Endocrinology, vol. 109, p. 276-285.

LEARY, S. C., J. S. Ballantyne et J. F. Leatherland. 1999. Evaluation of thyroid hormone economy in elasmobranch fishes, with measurements of hepatic 5'-monodeiodinase activity in wild dogfish. Journal of Experimental Zoology, vol. 284, p. 492-499.

LEATHERLAND, J. F. et K. J. Farbridge. 1992. Chronic fasting reduces the response of the thyroid to growth hormone and TSH, and alters the growth hormone-related changes in hepatic 5'-monodeiodinase activity in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, vol. 87, p. 342-353.

LEBLANC, J., Couillard, C. M. et J.-C. F. Brethes. 1997. Modifications of the reproductive period in mummichog (*Fundulus heteroclitus*) living downstream from a bleached kraft pulp mill in the Miramichi Estuary, New Brunswick, Canada. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 54, p. 2564-2573.

LEHIGH SHIREY, E. A., A. Jelaso Langerveld, D. Mihalko et C. F. Ide. 2006. Polychlorinated biphenyl exposure delays metamorphosis and alters thyroid hormone system gene expression in developing *Xenopus laevis*. Environmental Research, sous presse.

LEINER, K. A., G. S. Han et D. S. MacKenzie. 2000. The effects of photoperiod and feeding on the diurnal rhythm of circulating thyroid hormones in the red drum, *Sciaenops ocellatus*. General and Comparative Endocrinology, vol. 120, p. 88-98.

LEINER, K. A. et D. S. Mackenzie. 2003. Central regulation of thyroidal status in a teleost fish: nutrient stimulation of T4 secretion and negative feedback of T3. Journal

of Experimental Zoology, A: Comparative Experimental Biology, vol. 298, p. 32-43.

LETTIERI, T. 2006. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. Environmental Health Perspectives, vol. 114, p. 4-9.

LEUSCH, F. D. et D. L. MacLatchy. 2003. *In vivo* implants of β -sitosterol cause reductions of reactive cholesterol pools in mitochondria isolated from gonads of male goldfish (*Carassius auratus*). General and Comparative Endocrinology, vol. 134, p. 255-263.

LEVESQUE, H. M., J. Dorval, A. Hontela, G. J. Van Der Kraak et P. G. Campbell. 2003. Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures. Journal of Toxicology and Environmental Health A, vol. 66, p. 657-676.

LIU, F. J., J. S. Wang et C. W. Theodorakis. 2006. Thyrotoxicity of sodium arsenate, sodium perchlorate, and their mixture in zebrafish *Danio rerio*. Environmental Science and Technology, vol. 40, p. 3429-3436.

LIU, M. Y., Y. S. Yang, T. Sugahara, S. Yasuda et M. C. Liu. 2005. Identification of a novel zebrafish SULT1 cytosolic sulfotransferase: cloning, expression, characterization, and developmental expression study. Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 437, p. 10-19.

LIU, Y. W. et W. K. Chan. 2002. Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in zebrafish. Differentiation, vol. 70, p. 36-45.

LIU, Y. W., L. J. Lo et W. K. Chan. 2000. Temporal expression and T3 induction of thyroid hormone receptors $\alpha 1$ and $\beta 1$ during early embryonic and larval development in zebrafish, *Danio rerio*. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 159, p. 187-195.

LLEWELLYN, L., M. A. Nowell, V. P. Ramsum, T. Wigham, G. E. Sweeney, B. Kristjansson et O. Halldorsson. 1999. Molecular cloning and developmental expression of the halibut thyroid hormone receptor- α . Journal of Fish Biology, vol. 55A, p. 148-155.

LOWELL, R. B., B. Ring, G. Pastershank, S. Walker, L. Trudel et K. Hedley. 2005. Évaluation nationale des données des études de suivi des effets sur l'environnement des fabriques de pâtes et papiers : Résultats des cycles 1 à 3. Burlington, ON : Institut national de recherche sur les eaux, 44p.

MA, P., B. Sivaloganathan, K. P. Reddy, W. K. Chan et T. J. Lam. 2004. Hormonal influence on amylase gene expression during Seabass (*Lates calcarifer*) larval development. General and Comparative Endocrinology, vol. 138, p. 14-19.

MACLATCHY, D. L. et J. G. Eales. 1992. Properties of T4 5'-deiodinating systems in various tissues of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, vol. 86, p. 313-322.

- MACLATCHY, D. L. et J. G. Eales. 1988. Short-term treatment with testosterone increases plasma 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and hepatic L-thyroxine 5'-monodeiodinase levels in arctic charr, *Salvelinus alpinus*. General and Comparative Endocrinology, vol. 71, p. 10-16.
- MACLATCHY, D. L. et G. J. Van Der Kraak. 1995. The phytoestrogen β -sitosterol alters the reproductive endocrine status of goldfish. Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 134, p. 305-312.
- MADSEN, S. S., S. Skovbolling, C. Nielsen et B. Korsgaard. 2004. 17-B estradiol and 4-nonylphenol delay smolt development and downstream migration in Atlantic salmon, *Salmo salar*. Aquatic Toxicology, vol. 68, p. 109-120.
- MALISON, J. A., L.S. Procarione, T.P. Barry, A.R. Kapuscinski, et T.B. Kayes. 1994. Endocrine and gonadal changes during the annual reproductive cycle of the freshwater teleost, *Stizostedion vitreum*. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 13, p. 473-484.
- MANZON, R. G., J. A. Holmes et J. H. Youson. 2001. Variable effects of goitrogens in inducing precocious metamorphosis in sea lampreys (*Petromyzon marinus*). Journal of Experimental Zoology, vol. 289, p. 290-303.
- MANZON, R. G. et J. H. Youson. 1997. The effects of exogenous thyroxine (T4) or triiodothyronine (T3), in the presence and absence of potassium perchlorate, on the incidence of metamorphosis and on serum T4 and T3 concentrations in larval sea lampreys (*Petromyzon marinus* L.). General and Comparative Endocrinology, vol. 106, p. 211-220.
- MANZON, R. G. et J. H. Youson. 2002. KClO₄ inhibits thyroidal activity in the larval lamprey endostyle in vitro. General and Comparative Endocrinology, vol. 128, p. 214-23.
- MARCHAND, O., M. Duffraisse, G. Triqueneaux, R. Safi et V. Laudet. 2004. Molecular cloning and developmental expression patterns of thyroid hormone receptors and T3 target genes in the turbot (*Scophthalmus maximus*) during post-embryonic development. General and Comparative Endocrinology, vol. 135, p. 345-357.
- MARCHAND, O., R. Safi, H. Escriva, E. Van Rompaey, P. Prunet et V. Laudet. 2001. Molecular cloning and characterization of thyroid hormone receptors in teleost fish. Journal of Molecular Endocrinology, vol. 26, p. 51-65.
- MARCHESINI, G. R., E. Meulenberg, W. Haasnoot, M. Mizuguchi et H. Irth. 2006. Biosensor recognition of thyroid-disrupting chemicals using transport proteins. Analytical Chemistry, vol. 78, p. 1107-1114.
- MARTIN, S. A. M., W. Wallner, A. F. Youngson et T. Smith. 1998. Differential expression of Atlantic salmon (*Salmo salar*) thyrotropin β subunit mRNA and its cDNA sequence. Journal of Fish Biology, vol. 54, p. 757-766.
- MATTA, S. L., D. A. Vilela, H. P. Godinho et L. R. Franca. 2002. The goitrogen 6-n-

propyl-2-thiouracil (PTU) given during testis development increases Sertoli and germ cell numbers per cyst in fish: the tilapia (*Oreochromis niloticus*) model. Endocrinology, vol. 143, p. 970-978.

MATTSSON, K., K. J. Lehtinen, J. Tana, J. Hardig, J. Kukkonen, T. Nakari et C. Engstrom. 2001. Effects of pulp mill effluents and restricted diet on growth and physiology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 49, p. 144-154.

MCCOMB, D. M., J. Gelsleichter, C. A. Manire, R. Brinn et C. L. Brown. 2005. Comparative thyroid hormone concentration in maternal serum and yolk of the bonnethead shark (*Sphyrna tiburo*) from two sites along the coast of Florida. General and Comparative Endocrinology, vol. 144, p. 167-173.

MCCORMICK, S. D., M. F. O'dea, A. M. Moeckel, D. T. Lerner et B. T. Bjornsson. 2005. Endocrine disruption of parr-smolt transformation and seawater tolerance of Atlantic salmon by 4-nonylphenol and 17 β -estradiol. General and Comparative Endocrinology, vol. 142, p. 280-288.

MCLEESE, J., A. Waytiuk et J. G. Eales. 1998. Factors influencing the steady-state distribution and exchange of thyroid hormones between red blood cells and plasma of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, vol. 109, p. 259-268.

MCLEESE, J. M., G. M. Wright, J. H. Youson et J. G. Eales. 2000. Deiodination activity in extrathyroidal tissues of the atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*. Journal of Experimental Zoology, vol. 287, p. 445-452.

MCMASTER, M. E. P. J. L. et L. M. Hewitt. 2003. A Decade of Research on the Environmental Impacts of Pulp and Paper Mill Effluent in Canada (1992-2002). Burlington, ON : National Water Research Institute, 84p.

MELAMED, P., N. Eliahu, B. Levavi-Sivan, M. Ofir, O. Farchi-Pisanty, F. Rentier-Delrue, J. Smal, Z. Yaron et Z. Naor. 1995. Hypothalamic and thyroidal regulation of growth hormone in tilapia. General and Comparative Endocrinology, vol. 97, p. 13-30.

MENDEL, C. M., R. A. Weisiger, A. L. Jones et R. R. Cavalieri. 1987. Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study. Endocrinology, vol. 120, p. 1742-1749.

MERCURE, F., A. C. Holloway, D. R. Tocher, M. A. Sheridan, G. Van der Kraak et J. F. Leatherland. 2001. Influence of plasma lipid changes in response to 17 β -oestradiol stimulation on plasma growth hormone, somatostatin, and thyroid hormone levels in immature rainbow trout. Journal of Fish Biology, vol. 59, p. 605-615.

MEYER, J. N., D. C. Volz, J. H. Freedman et R. T. Di Giulio. 2005. Differential display of hepatic mRNA from killifish (*Fundulus heteroclitus*) inhabiting a Superfund estuary. Aquatic Toxicology, vol. 73, p. 327-341.

- MIWA, S. et Y. Inui. 1987. Histological changes in the pituitary-thyroid axis during spontaneous and artificially-induced metamorphosis of larvae of the flounder *Paralichthys olivaceus*. Cell Tissue Research, vol. 249, p. 117-123.
- MOAV, B. et B. A. McKeown. 1992. Thyroid hormone increases transcription of growth hormone mRNA in rainbow trout pituitary. Hormone and Metabolic Research, vol. 24, p. 10-14.
- MOL, K., E. Kaptein, V. M. Darras, W. J. de Greef, E. R. Kuhn et T. J. Visser. 1993. Different thyroid hormone-deiodinating enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver and kidney. FEBS Letters, vol. 321, p. 140-144.
- MOL, K. A., S. Van der Geyten, C. Burel, E. R. Kühn, T. Boujard et V. M. Darras. 1998. Comparative study of iodothyronine outer ring and inner ring deiodinase activities in five teleostean fishes. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 18, p. 253-266.
- MOL, K. A., S. Van Der Geyten, V. M. Darras, T. J. Visser et E. R. Kuhn. 1997. Characterization of iodothyronine outer ring and inner ring deiodinase activities in the blue tilapia, *Oreochromis aureus*. Endocrinology, vol. 138, p. 1787-1793.
- MOL, K. A., S. van der Geyten, E.R. Kuhn, et V.M. Darras. 1999. Effects of experimental hypo- and hyper-thyroidism on iodothyronine deiodinases in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 20, p. 201-207.
- MONTEVERDI, G. H. et R. T. Di Giulio. 2000. Vitellogenin association and oocytic accumulation of thyroxine and 3, 5,3'-triiodothyronine in gravid *Fundulus heteroclitus*. General and Comparative Endocrinology, vol. 120, p. 198-211.
- MORIN, P. P., T. J. Hara et J. G. Eales. 1995. T4 depresses olfactory responses to L-alanine and plasma T3 and T3 production in smoltifying Atlantic salmon. American Journal of Physiology, vol. 269, p. R1434-R1440.
- MORIN, P. P., T. J. Hara et J. G. Eales. 1993. Thyroid hormone deiodination in brain, liver, gill, heart and muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during photoperiodically-induced parr-smolt transformation. I. Outer- and inner-ring thyroxine deiodination. General and Comparative Endocrinology, vol. 90, p. 142-156.
- MORIYAMA, K., T. Tagami, T. Akamizu, T. Usui, M. Saijo, N. Kanamoto, Y. Hataya, A. Shimatsu, H. Kuzuya et K. Nakao. 2002. Thyroid hormone action is disrupted by bisphenol A as an antagonist. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, vol. 87, p. 5185-5190.
- MORIYAMA, S., P. Swanson, D. A. Larsen, S. Miwa, H. Kawauchi et W. W. Dickhoff. 1997. Salmon thyroid-stimulating hormone: isolation, characterization, and development of a radioimmunoassay. General and Comparative Endocrinology, vol. 108, p. 457-471.
- MUNKITTRICK, K. R., M.E. McMaster, L.H. McCarthy, M.R. Servos et G.J. Van Der Kraak. 1998. An overview of recent studies on the potential of pulp-mill effluents

to alter reproductive parameters in fish. Journal of Toxicology and Environmental Health. B: Critical Reviews, vol. 1, p. 347-371.

MUNKITTRICK, K. R., C.B. Portt, G.J. Van Der Kraak, I.R. Smith, et D.A. Rokosh. 1991. Impact of bleached kraft mill effluent on population characteristics, liver MFO activity, and serum steroid levels of a Lake Superior white sucker (*Catostomus commersoni*) population. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 48, p. 1371-1380.

MYLONAS, C. C., A. P. Scott et Y. Zohar. 1997. Plasma gonadotropin II, sex steroids, and thyroid hormones in wild striped bass (*Morone saxatilis*) during spermiation and final oocyte maturation. General and Comparative Endocrinology, vol. 108, p. 223-236.

MYLONAS, C. C., L. C. Woods 3rd, P. Thomas et Y. Zohar. 1998. Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during postvitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRHa-delivery systems. General and Comparative Endocrinology, vol. 110, p. 276-289.

NELSON, E. R. et H. R. Habibi. 2006. Molecular characterization and sex-related seasonal expression of thyroid receptor subtypes in goldfish. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 253, p. 83-95.

NG, N. K., D. Tsi et A. D. Munro. 1997. Induced final maturation and ovulation in a small anabantoid teleost, the dwarf gourami, *Colisa lalia*. I. The effects of gonadotrophic preparations, LHRHa, steroids and thyroid hormones. Aquarium Sciences and Conservation, vol. 1, p. 169-187.

NISHIMURA, N., J. Yonemoto, Y. Miyabara, Y. Fujii-Kuriyama et C. Tohyama. 2005. Altered thyroxine and retinoid metabolic response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in aryl hydrocarbon receptor-null mice. Archives of Toxicology, vol. 79, p. 260-267.

NISHIOKA, R. S., Grau. E.G., K. V. Lai et Bern. H.A. 1987. Effect of thyroid-stimulating hormone on the physiology and morphology of the thyroid gland in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 3, p. 63-71.

NOWELL, M. A., D. M. Power, A. V. Canario, L. Llewellyn et G. E. Sweeney. 2001. Characterization of a sea bream (*Sparus aurata*) thyroid hormone receptor- β clone expressed during embryonic and larval development. General and Comparative Endocrinology, vol. 123, p. 80-89.

OAKES, K. D., M. E. McMaster, A. C. Pryce, K. R. Munkittrick, C. B. Portt, L. M. Hewitt, D. D. MacLean et G. J. Van Der Kraak. 2003. Oxidative stress and bioindicators of reproductive function in pulp and paper mill effluent exposed white sucker. Toxicological Sciences, vol. 74, p. 51-65.

OBA, Y., T. Hirai, Y. Yoshiura, T. Kobayashi et Y. Nagahama. 2000. Cloning, functional characterization, and expression of thyrotropin receptors in the thyroid of

- amago salmon (*Oncorhynchus rhodurus*). Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 276, p. 258-263.
- OGASAWARA, M., R. Di Lauro et N. Satoh. 1999. Ascidian homologs of mammalian thyroid peroxidase genes are expressed in the thyroid-equivalent region of the endostyle. Journal of Experimental Zoology, vol. 285, p. 158-169.
- OHIDE, A., H. Ando, T. Yanagisawa et A. Urano. 1996. Hydropathy profiles of predicted thyrotropin-releasing hormone precursors are highly conserved despite low similarity of primary structures. Journal of Neuroendocrinology, vol. 8, p. 695-701.
- OHKIMOTO, K., M. Y. Liu, M. Suiko, Y. Sakakibara et M. C. Liu. 2004. Characterization of a zebrafish estrogen-sulfating cytosolic sulfotransferase: inhibitory effects and mechanism of action of phytoestrogens. Chemico-Biological Interactions, vol. 147, p. 1-7.
- OKU, H., H. Y. Ogata et X. F. Liang. 2002. Organization of the lipoprotein lipase gene of red sea bream *Pagrus major*. Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology, vol. 131, p. 775-785.
- OLSON, M. H., D. M. Green et L. G. Rudstam. 2001. Changes in yellow perch (*Perca flavescens*) growth associated with the establishment of a walleye (*Stizostedion vitreum*) population in Canadarago Lake, New York (USA). Ecology of Freshwater Fish, vol. 10, p. 11-20.
- OPITZ, R., T. Braunbeck, C. Bogi, D. B. Pickford, G. Nentwig, J. Oehlmann, O. Tooi, I. Lutz et W. Kloas. 2005. Description and initial evaluation of a *Xenopus* metamorphosis assay for detection of thyroid system-disrupting activities of environmental compounds. Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 24, p. 653-664.
- OROZCO, A., M. C. Jeziorski, P. J. Linser, R. M. Greenberg et C. Valverde-R. 2002. Cloning of the gene and complete cDNA encoding a type 2 deiodinase from *Fundulus heteroclitus*. General and Comparative Endocrinology, vol. 128, p. 162-167.
- OROZCO, A., P. Linser et C. Valverde. 2000. Kinetic characterization of outer-ring deiodinase activity (ORD) in the liver, gill and retina of the killifish *Fundulus heteroclitus*. Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology, vol. 126, p. 283-290.
- OROZCO, A., J. E. Silva et C. Valverde-R. 1997. Rainbow trout liver expresses two iodothyronine phenolic ring deiodinase pathways with the characteristics of mammalian types I and II 5'-deiodinases. Endocrinology, vol. 138, p. 254-258.
- OROZCO, A., P. Villalobos, M. C. Jeziorski et C. Valverde-R. 2003. The liver of *Fundulus heteroclitus* expresses deiodinase type 1 mRNA. General and Comparative Endocrinology, vol. 130, p. 84-91.
- PARHAR, I. S., T. Soga, S. Ogawa, S. Ogawa, D. W. Pfaff et Y. Sakuma. 2005. Nonmammalian gonadotropin-releasing hormone molecules in the brain of promoter

transgenic rats. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 102, p. 5880-5885.

PARRY, J. E., C. Zhang et J. G. Eales. 1994. Urinary excretion of thyroid hormones in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. General and Comparative Endocrinology, vol. 95, p. 310-319.

PATINO, R. et C. V. Sullivan. 2002. Ovarian follicle growth, maturation, and ovulation in teleost fish. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 26, p. 57-70.

PATINO, R., M. R. Waincott, E. I. Cruz-Li, S. Balakrishnan, C. McMurry, V. S. Blazer et T. A. Anderson. 2003. Effects of ammonium perchlorate on the reproductive performance and thyroid follicle histology of zebrafish. Environmental Toxicology and Chemistry, vol. 22, p. 1115-1121.

PAVLIDIS, M., L. Greenwood, B. Mourot, C. Kokkari, F. Le Menn, P. Divanach et A. P. Scott. 2000. Seasonal variations and maturity stages in relation to differences in serum levels of gonadal steroids, vitellogenin, and thyroid hormones in the common dentex (*Dentex dentex*). General and Comparative Endocrinology, vol. 118, p. 14-25.

PERSKY, V., M. Turyk, H. A. Anderson, L. P. Hanrahan, C. Falk, D. N. Steenport, R. Chatterton Jr et S. Freels. 2001. The effects of PCB exposure and fish consumption on endogenous hormones. Environmental Health Perspectives, vol. 109, p. 1275-1283.

PLATE, E. M., B. A. Adams, W. T. Allison, G. Martens, C. W. Hawryshyn et J. G. Eales. 2002. The effects of thyroxine or a GnRH analogue on thyroid hormone deiodination in the olfactory epithelium and retina of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and sockeye salmon, *Oncorhynchus nerka*. General and Comparative Endocrinology, vol. 127, p. 59-65.

PLOHMAN, J. C., T. A. Dick et J. G. Eales. 2002. Thyroid of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*. I. Hormone levels in blood and tissues. General and Comparative Endocrinology, vol. 125, p. 47-55.

PLOHMAN, J. C., T. A. Dick et J. G. Eales. 2002. Thyroid of lake sturgeon, *Acipenser fulvescens*. II. Deiodination properties, distribution, and effects of diet, growth, and a T3 challenge. General and Comparative Endocrinology, vol. 125, p. 56-66.

POWER, D. M., L. Llewellyn, M. Faustino, M. A. Nowell, B. T. Bjornsson, I. E. Einarsdottir, A. V. Canario et G. E. Sweeney. 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish. Comparative Biochemistry and Physiology. C: Comparative Pharmacology and Toxicology, vol. 130, p. 447-459.

POWER, D. M., J. Melo et C. R. A. Santos. 2000. The effect of food deprivation and refeeding on the liver, thyroid hormones and transthyretin in sea bream. Journal of Fish Biology, vol. 56, p. 374-387.

PRADET-BALADE, B., C. Burel, S. Dufour, T. Boujard, S. J. Kaushik, B. Quérat et G. Boeuf. 1999. Thyroid hormones down-regulate thyrotropin β mRNA level *in vivo*

- in the turbot (*Psetta maxima*). Fish Physiology and Biochemistry, vol. 20, p. 193-199.
- PRADET-BALADE, B., M. Schmitz, C. Salmon, S. Dufour et B. Querat. 1997. Down-regulation of TSH subunit mRNA levels by thyroid hormones in the European eel. General and Comparative Endocrinology, vol. 108, p. 191-198.
- RAHMAN, M. A., K. Ohta, Yamaguchi A. , H. Chuda, T. Hirai et M. Matsuyama. 2003. Gonadotropins, gonadotropin receptors and their expressions during sexual maturation in yellowtail, a carangid fish. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 28, p. 81-83.
- RAINE, J. C., C. Cameron, M. M. Vijayan, J. Lamarre et J. F. Leatherland. 2004. The effect of elevated oocyte triiodothyronine content on development of rainbow trout embryos and expression of mRNA encoding for thyroid hormone receptors. Journal of Fish Biology, vol. 65, p. 206-226.
- RAINE, J. C. et J. F. Leatherland. 2000. Morphological and functional development of the thyroid tissue in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) embryos. Cell and Tissue Research, vol. 301, p. 235-244.
- RAINE, J. C. et J. F. Leatherland. 1999. Ontogeny of thyroid tissue and tissue thyroid hormone clearance in rainbow trout embryos reared at two temperatures. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 20, p. 209-217.
- RAINE, J. C. et J. F. Leatherland. 2003. Trafficking of L-triiodothyronine between ovarian fluid and oocytes of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology, vol. 136, p. 267-274.
- RANJAN, M., J. Wong et Y. B. Shi. 1994. Transcriptional repression of *Xenopus* TR β gene is mediated by a thyroid hormone response element located near the start site. Journal of Biological Chemistry, vol. 269, p. 24699-24705.
- REDDY, P. K., C. L. Brown, J. F. Leatherland et T. J. Lam. 1992. Role of thyroid hormones in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*): II. Changes in the hormones and 5'-monodeiodinase activity during development. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 9, p. 487-496.
- REDDY, P. K. et T. J. Lam. 1992. Role of thyroid hormones in tilapia larvae (*Oreochromis mossambicus*): I. Effects of the hormones and an antithyroid drug on yolk absorption, growth and development. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 9, p. 473-485.
- RICHARDSON, S. J., A. J. Bradley, W. Duan, R. E. Wettenhall, P. J. Harms, J. J. Babon, B. R. Southwell, S. Nicol, S. C. Donnellan et G. Schreiber. 1994. Evolution of marsupial and other vertebrate thyroxine-binding plasma proteins. American Journal of Physiology, vol. 266, p. R1359-R1370.
- RILEY, W. W. Jr et J. G. Eales. 1994. Characterization of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine transport into hepatocytes isolated from juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus*

mykiss), and comparison with L-thyroxine transport. General and Comparative Endocrinology, vol. 95, p. 301-309.

RILEY, W. W. Jr et J. G. Eales. 1993. Characterization of L-thyroxine transport into hepatocytes isolated from juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). General and Comparative Endocrinology, vol. 90, p. 31-42.

ROLLAND, R. M. 2000. A review of chemically-induced alterations in thyroid and vitamin A status from field studies of wildlife and fish. Journal of Wildlife Diseases, vol. 36, p. 615-635.

ROY, P., M. Datta, S. Dasgupta et S. Bhattacharya. 2000. Gonadotropin-releasing hormone stimulates thyroid activity in a freshwater murrel, *Channa gachua* (ham.), and Carps, *Catla catla* (ham.) and *Cirrhinus mrigala* (ham.). General and Comparative Endocrinology, vol. 117, p. 456-463.

RUBY, S. M. et J. G. Eales. 1999. Relationship between hepatic deiodination of thyroxine and early oocyte development in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Canadian Journal of Zoology, vol. 77, p. 509-513.

SAKURAI, A., T. Miyamoto et L. J. DeGroot. 1992. Cloning and characterization of the human thyroid hormone receptor β 1 gene promoter. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 185, p. 78-84.

SALMON, C., J. Marchelidon, Y. A. Fontaine, J. C. Huet et B. Querat. 1993. Cloning and sequence of thyrotropin β subunit of a teleost fish: the eel (*Anguilla anguilla* L.). Comptes Rendus de l'Academie des Sciences. Serie III, Sciences de la Vie, vol. 316, p. 749-753.

SAMBRONI, E., S. Gutieres, C. Cauty, Y. Guiguen, B. Breton et J. J. Lareyre. 2001. Type II iodothyronine deiodinase is preferentially expressed in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) liver and gonads. Molecular Reproduction and Development, vol. 60, p. 338-350.

SANDERS, J. P., S. Van der Geyten, E. Kaptein, V. M. Darras, E. R. Kuhn, J. L. Leonard et T. J. Visser. 1997. Characterization of a propylthiouracil-insensitive type I iodothyronine deiodinase. Endocrinology, vol. 138, p. 5153-5160.

SANDERS, J. P., S. Van der Geyten, E. Kaptein, V. M. Darras, E. R. Kuhn, J. L. Leonard et T. J. Visser. 1999. Cloning and characterization of type III iodothyronine deiodinase from the fish *Oreochromis niloticus*. Endocrinology, vol. 140, p. 3666-3673.

SANDSTRÖM, O. et E. Neuman. 2003. Long-term development in Baltic fish community exposed to bleached pulp effluent. Aquatic Ecology, vol. 37, p. 267-276.

SANTOS, C. R. et D. M. Power. 1999. Identification of transthyretin in fish (*Sparus aurata*): cDNA cloning and characterisation. Endocrinology, vol. 140, p. 2430-2433.

SCHECTER, A., O. Papke, K. C. Tung, J. Joseph, T. R. Harris et J. Dahlgren. 2005.

- Polybrominated diphenyl ether flame retardants in the U.S. population: current levels, temporal trends, and comparison with dioxins, dibenzofurans, and polychlorinated biphenyls. Journal of Occupational and Environmental Medicine, vol. 47, p. 199-211.
- SCHELL, L. M., M. V. Gallo, A. P. DeCaprio, L. Hubicki, M. Denham et J. Ravenscroft. 2004. Thyroid function in relation to burden of PCBs, p,p-DDE, HCB, mirex and lead among Akwesasne Mohawk youth: A preliminary study. Environmental Toxicology and Pharmacology, vol. 18, p. 91-99.
- SCHMID, A. C., I. Lutz, W. Kloas et M. Reinecke. 2003. Thyroid hormone stimulates hepatic IGF-I mRNA expression in a bony fish, the tilapia *Oreochromis mossambicus*, *in vitro* and *in vivo*. General and Comparative Endocrinology, vol. 130, p. 129-134.
- SCHMUTZLER, C., I. Hamann, P. J. Hofmann, G. Kovacs, L. Stemmler, B. Mentrup, L. Schomburg, P. Ambrugger, A. Gruters, D. Seidlova-Wuttke, H. Jarry, W. Wuttke et J. Kohrle. 2004. Endocrine active compounds affect thyrotropin and thyroid hormone levels in serum as well as endpoints of thyroid hormone action in liver, heart and kidney. Toxicology, vol. 205, p. 95-102.
- SCHREIBER, A. M. et J. L. Specker. 1998. Metamorphosis in the summer flounder (*Paralichthys dentatus*): stage-specific developmental response to altered thyroid status. General and Comparative Endocrinology, vol. 111, p. 156-166.
- SCHULZ, R. W. et Miura T. 2002. Spermatogenesis and its endocrine regulation. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 26, p. 43-56.
- SCHUUR, A. G., F. M. Boekhorst, A. Brouwer et T. J. Visser. 1997. Extrathyroidal effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on thyroid hormone turnover in male Sprague-Dawley rats. Endocrinology, vol. 138, p. 3727-3734.
- SENTINELLE OUTAOUAIS. 2006. Bilan de la Sentinelle sur la riviere des Outaouais. Ottawa : Sentinelle Outaouais, 81p.
- SÉPULVEDA, M. S., E. P. Gallagher, C. M. Wieser et T. S. Gross. 2004. Reproductive and biochemical biomarkers in largemouth bass sampled downstream of a pulp and paper mill in Florida. Ecotoxicology and Environmental Safety, vol. 57, p. 431-440.
- SÉPULVEDA, M. S., D. S. Ruessler, N. D. Denslow, S. E. Holm, T. R. Schoeb et T. S. Gross. 2001. Assessment of reproductive effects in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) exposed to bleached/unbleached kraft mill effluents. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, vol. 41, p. 475-482.
- SERVOS, M. R., D. T. Bennie, B. K. Burnison, A. Jurkovic, R. McInnis, T. Neheli, A. Schnell, P. Seto, S. A. Smyth et T. A. Ternes. 2005. Distribution of estrogens, 17 β -estradiol and estrone, in Canadian municipal wastewater treatment plants. Science of the Total Environment, vol. 336, p. 155-170.
- SHUTER, B. J., N. P. Lester, J. LaRose, C. F. Purchase, K. Vascotto, G. Morgan, N. C. Collins et P. A. Abrams. 2005. Optimal life histories and food web position:

linkages among somatic growth, reproductive investment, and morality. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 62, p. 738-746.

SILVA, E., N. Rajapakse et A. Kortenkamp. 2002. Something from nothing--eight weak estrogenic chemicals combined at concentrations below NOECs produce significant mixture effects. Environmental Science and Technology, vol. 36, p. 1751-1756.

SMITH, C. J. et E. G. Grau. 1986. Ultrastructural changes in the parrotfish thyroid after *in vitro* stimulation with bovine thyrotropin. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 1, p. 153-162.

SOHN, Y. C., Y. Yoshiura, M. Kobayashi et K. Aida. 1999. Seasonal changes in mRNA levels of gonadotropin and thyrotropin subunits in the goldfish, *Carassius auratus*. General and Comparative Endocrinology, vol. 113, p. 436-444.

SOHN, Y. C., Y. Yoshiura, H. Suetake, M. Kobayashi et K. Aida. 1999. Isolation and characterization of the goldfish thyrotropin β subunit gene including the 5'-flanking region. General and Comparative Endocrinology, vol. 115, p. 463-473.

SPECKER, J. L., J. G. Eales, M. Tagawa et W. A. Tyler III. 2000. Parr-smolt transformation in Atlantic salmon: Thyroid hormone deiodination in liver and brain and endocrine correlates of change in rheotactic behavior. Canadian Journal of Zoology, vol. 78, p. 696-705.

ST-PIERRE, N., J. Dufresne, A. A. Rooney et D. G. Cyr. 2003. Neonatal hypothyroidism alters the localization of gap junctional protein connexin 43 in the testis and messenger RNA levels in the epididymis of the rat. Biology of Reproduction, vol. 68, p. 1232-1240.

STERNBERG, H. et B. Moav. 1999. Regulation of the growth hormone gene by fish thyroid/retinoid receptors. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 4, p. 331-339.

SUGAHARA, T., C. C. Liu, G. Carter, T. Govind Pai et M. C. Liu. 2003. cDNA cloning, expression, and functional characterization of a zebrafish SULT1 cytosolic sulfotransferase. Archives of Biochemistry and Biophysics, vol. 414, p. 67-73.

SUGAHARA, T., C. C. Liu, T. Govind Pai et M. C. Liu. 2003. Molecular cloning, expression, and functional characterization of a novel zebrafish cytosolic sulfotransferase. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 300, p. 725-730.

SUGAHARA, T., C. C. Liu, T. G. Pai, P. Collodi, M. Suiko, Y. Sakakibara, K. Nishiyama et M. C. Liu. 2003. Sulfation of hydroxychlorobiphenyls. Molecular cloning, expression, and functional characterization of zebrafish SULT1 sulfotransferases. European Journal of Biochemistry, vol. 270, p. 2404-2411.

SUGIYAMA, S., H. Miyoshi et K. Yamauchi. 2005. Characteristics of a thyroid hormone responsive reporter gene transduced into a *Xenopus laevis* cell line using lentivirus vector. General and Comparative Endocrinology, vol. 144, p. 270-279.

- SUKUMAR, P., A. D. Munro, E. Y. Mok, S. Subburaju et T. J. Lam. 1997. Hypothalamic regulation of the pituitary-thyroid axis in the tilapia *Oreochromis mossambicus*. General and Comparative Endocrinology, vol. 106, p. 73-84.
- SULLIVAN, C. V., D.S. Darling, et W.W. Dickhoff. 1987. Effects of triiodothyronine and propylthiouracil on thyroid function and smoltification of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Fish Physiology and Biochemistry, vol. 4, p. 121-135.
- SUTIJA, M. et J. M. Joss. 2006. Thyroid hormone deiodinases revisited: insights from lungfish: a review. Journal of Comparative Physiology, B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology, vol. 176, p. 87-92.
- SUTIJA, M., T. J. Longhurst et J. M. Joss. 2003. Deiodinase type II and tissue specific mRNA alternative splicing in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. General and Comparative Endocrinology, vol. 132, p. 409-417.
- SUTIJA, M., T. J. Longhurst et J. M. Joss. 2004. Deiodinase type III in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri*. General and Comparative Endocrinology, vol. 136, p. 152-161.
- SWAPNA, I., M. Rajasekhar, A. Supriya, K. Raghuveer, G. Sreenivasulu, M. K. Rasheeda, K. C. Majumdar, H. Kagawa, H. Tanaka, A. Dutta-Gupta et B. Senthilkumaran. 2006. Thiourea-induced thyroid hormone depletion impairs testicular recrudescence in the air-breathing catfish, *Clarias gariepinus*. Comparative Biochemistry and Physiology, A: Molecular and Integrative Physiology, vol. 144, p. 1-10.
- SWEETING, R. M., G. P. Alexander, J. G. Eales et B. A. McKeown. 1994. Hepatic and branchial thyroid hormone deiodinase activities associated with the parr-smolt transformation of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). General and Comparative Endocrinology, vol. 94, p. 171-181.
- SZISCH, V., N. Papandroulakis, E. Fanouraki et M. Pavlidis. 2005. Ontogeny of the thyroid hormones and cortisol in the gilthead sea bream, *Sparus aurata*. General and Comparative Endocrinology, vol. 142, p. 186-192.
- TAGAWA, M. et M. Aritaki. 2005. Production of symmetrical flatfish by controlling the timing of thyroid hormone treatment in spotted halibut *Verasper variegatus*. General and Comparative Endocrinology, vol. 141, p. 184-189.
- TAGAWA, M. et C. L. Brown. 2001. Entry of thyroid hormones into tilapia oocytes. Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology, vol. 129, p. 605-611.
- TAGAWA, M., S. Miwa, Y. Inui, E. Grace de Jesus et T. Hirano. 1990. Changes in thyroid hormone concentration during early development and metamorphosis of the flounder, *Paralichthys olivaceus*. Zoological Sciences, vol. 7, p. 93-96.
- TAGAWA, M., M. Tanaka, S. Matsumoto et T. Hirano. 1990. Thyroid hormone in eggs of various freshwater, marine and diadromous teleosts and their changes during

egg development. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 8, p. 515-520.

TELES, M., M. Oliveira, M. Pacheco et M. A. Santos. 2005. Endocrine and metabolic changes in *Anguilla anguilla* L. following exposure to β -naphthoflavone--a microsomal enzyme inducer. Environment International, vol. 31, p. 99-104.

TELES, M., M. Pacheco et M. A. Santos. 2005. Physiological and genetic responses of European eel (*Anguilla anguilla* L.) to short-term chromium or copper exposure--Influence of preexposure to a PAH-like compound. Environmental Toxicology, vol. 20, p. 92-99.

THANGAVEL, P., K. Sumathirai, S. Karthikeyan et M. Ramaswamy. 2005. Endocrine response of the freshwater teleost, *Sarotherodon mossambicus* (Peters) to dimecron exposure. Chemosphere, vol. 61, p. 1083-1092.

THISSE, C., A. Degreve, G. V. Kryukov, V. N. Gladyshev, S. Obrecht-Pflumio, A. Krol, B. Thisse et A. Lescure. 2003. Spatial and temporal expression patterns of selenoprotein genes during embryogenesis in zebrafish. Gene Expression Patterns, vol. 3, p. 525-532.

TIMME-LARAGY, A. R., E. D. Levin et R. T. Di Giulio. 2006. Developmental and behavioral effects of embryonic exposure to the polybrominated diphenylether mixture DE-71 in the killifish (*Fundulus heteroclitus*). Chemosphere, vol. 62, p. 1097-1104.

TIMMERMANS, L. P., D. A. Chmlevsky, H. Komen et H. Schipper. 1997. Precocious onset of spermatogenesis in juvenile carp (*Cyprinus carpio* L., Teleostei) following treatment with low doses of L-thyroxine. European Journal of Morphology, vol. 35, p. 344-353.

TODD, K. J. et J. G. Eales. 2002. The effect of handling and blood removal on plasma levels and hepatic deiodination of thyroid hormones in adult male and female rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. Canadian Journal of Zoology, vol. 80, p. 372-375.

TOGUYENI, A., J. F. Baroiller, A. Fostier, P. Y. Le Bail, E. R. Kuhn, K. A. Mol et B. Fauconneau. 1996. Consequences of food restriction on short-term growth variation and on plasma circulating hormones in *Oreochromis niloticus* in relation to sex. General and Comparative Endocrinology, vol. 103, p. 167-175.

TOMY, G. T., V. P. Palace, T. Halldorson, E. Braekevelt, R. Danell, K. Wautier, B. Evans, L. Brinkworth et A. T. Fisk. 2004. Bioaccumulation, biotransformation, and biochemical effects of brominated diphenyl ethers in juvenile lake trout (*Salvelinus namaycush*). Environmental Science and Technology, vol. 38, p. 1496-1504.

TURYK, M. E., H. A. Anderson, S. Freels, R. Chatterton Jr, L. L. Needham, D. G. Patterson Jr, D. N. Steenport, L. Knobeloch, P. Imm et V. W. Persky. 2006. Associations of organochlorines with endogenous hormones in male great lakes fish consumers and nonconsumers. Environmental Research, sous presse.

VALENTE, L. M. P., P.-Y. Le Bail, E. F. S. Gomes et B. Fauconneau. 2003.

Hormone profile in fast- and slow-growing strains of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in response to nutritional state. Aquaculture, vol. 219, p. 829-839.

VALVERDE, C., W. Croteau, G. J. Lafleur Jr, A. Orozco et D. L. Germain. 1997. Cloning and expression of a 5'-iodothyronine deiodinase from the liver of *Fundulus heteroclitus*. Endocrinology, vol. 138, p. 642-648.

VAN ANHOLT, R. D., T. Spanings, W. Koven et S. E. Wendelaar Bonga. 2003. Effects of acetylsalicylic acid treatment on thyroid hormones, prolactins, and the stress response of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). American Journal of Physiology, Regulatory, Integrative and Comparative Physiology, vol. 285, p. R1098-1106.

VAN DER GEYTEN, S., N. Byamungu, G. E. Reyns, E. R. Kuhn et V. M. Darras. 2005. Iodothyronine deiodinases and the control of plasma and tissue thyroid hormone levels in hyperthyroid tilapia (*Oreochromis niloticus*). Journal of Endocrinology, vol. 184, p. 467-479.

VAN DER GEYTEN, S., K. A. Mol, W. Pluymers, E. R. Kuhn et V. M. Darras. 1998. Changes in plasma T3 during fasting/refeeding in tilapia (*Oreochromis niloticus*) are mainly regulated through changes in hepatic type II iodothyronine deiodinase. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 19, p. 135-143.

VAN DER GEYTEN, S., A. Toguyeni, J. F. Baroiller, B. Fauconneau, A. Fostier, J. P. Sanders, T. J. Visser, E. R. Kuhn et V. M. Darras. 2001. Hypothyroidism induces type I iodothyronine deiodinase expression in tilapia liver. General and Comparative Endocrinology, vol. 124, p. 333-342.

VAN DER VEN, L. T., E. J. van den Brandhof, J. H. Vos, D. M. Power et P. W. Wester. 2006. Effects of the antithyroid agent propylthiouracil in a partial life cycle assay with zebrafish. Environmental Science and Technology, vol. 40, p. 74-81.

VANDER ZANDEN, M. J., G. Cabana et J. B. Rasmussen. 1997. Comparing trophic position of freshwater fish calculated using stable nitrogen isotope ratios ($\delta^{15}\text{N}$) and literature dietary data. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, vol. 54, p. 1142-1158.

VANPUTTE, C. L., D. S. MacKenzie et J. G. Eales. 2001. Characterization of hepatic low-K(m) outer-ring deiodination in red drum (*Sciaenops ocellatus*). Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology, vol. 128, p. 413-423.

VARGHESE, S. et O. V. Oommen. 1999. Thyroid hormones regulate lipid metabolism in a teleost *Anabas testudineus* (Bloch). Comparative Biochemistry and Physiology, B: Biochemistry and Molecular Biology, vol. 124, p. 445-450.

VISCHER, H. F. et J. Bogerd. 2003. Cloning and functional characterization of a testicular TSH receptor cDNA from the African catfish (*Clarias gariepinus*). Journal of Molecular Endocrinology, vol. 30, p. 227-238.

VISSER, T. J. 1994. Role of sulfation in thyroid hormone metabolism. Chemico-Biological Interactions, vol. 92, p. 293-303.

VON SCHALBURG, K. R., M. L. Rise, G. D. Brown, W. S. Davidson et B. F. Koop. 2005. A comprehensive survey of the genes involved in maturation and development of the rainbow trout ovary. Biology of Reproduction, vol. 72, p. 687-699.

WANG, Y., L. Zhou, B. Yao, C. J. Li et J. F. Gui. 2004. Differential expression of thyroid-stimulating hormone β subunit in gonads during sex reversal of orange-spotted and red-spotted groupers. Molecular and Cellular Endocrinology, vol. 220, p. 77-88.

WARING, C. P. et J. A. Brown. 1997. Plasma and tissue thyroxine and triiodothyronine contents in sublethally stressed, aluminum-exposed brown trout (*Salmo trutta*). General and Comparative Endocrinology, vol. 106, p. 120-126.

WARING, C. P. et A. Moore. 2004. The effect of atrazine on Atlantic salmon (*Salmo salar*) smolts in fresh water and after sea water transfer. Aquatic Toxicology, vol. 66, p. 93-104.

WIENS, S. C. et J. G. Eales. 2005. The effects of 17 β -estradiol injections on thyroid hormone deiodination pathways in liver and other tissues of female and male rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) at different stages of sexual maturity. Canadian Journal of Zoology, vol. 83, p. 596-603.

WOO, N. Y. S., A. S. B. Chung et T. B. Ng. 1991. Influence of oral administration of 3,5,3'-triiodo-thyronine on growth, digestion, food conversion and metabolism in the underyearling red sea bream, *Chryophrys major* (Temmick & Schlegel). Journal of Fish Biology, vol. 39, p. 459-468.

WRIGHT, G. M. et J. H. Youson. 1977. Serum thyroxine concentrations in larval and metamorphosing anadromous sea lamprey, *Petromyzon marinus* L. Journal of Experimental Zoology, vol. 202, p. 27-32.

WU, S. Y., W. L. Green, W. S. Huang, M. T. Hays et I. J. Chopra. 2005. Alternate pathways of thyroid hormone metabolism. Thyroid, vol. 15, p. 943-958.

YAMADA, H., R. Horiuchi, K. Gen et K. Yamauchi. 1993. Involvement of four hormones in thyroxine deiodination in several tissues of immature yearling masu salmon, *Oncorhynchus masou*. Zoological Sciences, vol. 10, p. 587-596.

YAMADA-OKABE, T., T. Aono, H. Sakai, Y. Kashima et H. Yamada-Okabe. 2004. 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin augments the modulation of gene expression mediated by the thyroid hormone receptor. Toxicology and Applied Pharmacology, vol. 194, p. 201-210.

YAMANO, K. 2005. The role of thyroid hormones in fish development with reference to aquaculture. JARQ, vol. 39, p. 161-168.

YAMANO, K. et S. Miwa. 1998. Differential gene expression of thyroid hormone

- receptor α and β in fish development. General and Comparative Endocrinology, vol. 109, p. 75-85.
- YAMANO, K., H. Takano-Ohmuro, T. Obinata et Y. Inui. 1994. Effect of thyroid hormone on developmental transition of myosin light chains during flounder metamorphosis. General and Comparative Endocrinology, vol. 93, p. 321-326.
- YAMAUCHI, K., J. Nakajima, H. Hayashi et A. Hara. 1999. Purification and characterization of thyroid-hormone-binding protein from masu salmon serum. A homolog of higher-vertebrate transthyretin. European Journal of Biochemistry, vol. 265, p. 944-949.
- YASUDA, S., C. C. Liu, S. Takahashi, M. Suiko, L. Chen, R. Snow et M. C. Liu. 2005. Identification of a novel estrogen-sulfating cytosolic SULT from zebrafish: molecular cloning, expression, characterization, and ontogeny study. Biochemical and Biophysical Research Communications, vol. 330, p. 219-225.
- YOSHIURA, Y., Y. C. Sohn, A. Munakata, M. Kobayashi et K. Aida. 1999. Molecular cloning of the cDNA encoding of the β subunit of the thyrotropin and regulation of its gene expression by thyroid hormones in the goldfish, *Carassius auratus*. Fish Physiology and Biochemistry, vol. 21, p. 201-210.
- YOUSON, J. H., E. M. Plisetskaya et J. F. Leatherland. 1994. Concentrations of insulin and thyroid hormones in the serum of landlocked sea lampreys (*Petromyzon marinus*) of three larval year classes, in larvae exposed to two temperature regimes, and in individuals during and after metamorphosis. General and Comparative Endocrinology, vol. 94, p. 294-304.
- ZAVACKI, A. M., H. Ying, M. A. Christoffolete, G. Aerts, E. So, J. W. Harney, S. Y. Cheng, P. R. Larsen et A. C. Bianco. 2005. Type 1 iodothyronine deiodinase is a sensitive marker of peripheral thyroid status in the mouse. Endocrinology, vol. 146, p. 1568-1575.
- ZHOU, T., H. B. John-Alder, J. S. Weis et P. Weis. 2000. Endocrine disruption: thyroid dysfunction in mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) from a polluted habitat. Marine Environmental Research, vol. 50, p. 393-397.
- ZOELLER, T. R., A. L. Dowling, C. T. Herzig, E. A. Iannaccone, K. J. Gauger et R. Bansal. 2002. Thyroid hormone, brain development, and the environment. Environmental Health Perspectives, vol. 110, suppl. 3, p. 355-361.

