

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ASSOCIATIONS ENTRE LES CONCENTRATIONS DE CONTAMINANTS ORGANOHALOGÉNÉS ET
D'HORMONES THYROÏDIENNES DANS LA PEAU DES BÉLUGAS DE L'ESTUAIRE DU SAINT-LAURENT

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAITRISE EN BIOLOGIE

PAR

VALÉRIE JOLICOEUR

JANVIER 2023

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.04-2020). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

Je souhaite avant tout remercier mon directeur de recherche Jonathan Verreault pour sa grande disponibilité et son soutien. Merci de m'avoir offert ce projet qui m'a permis d'entrer dans le monde fascinant de la recherche sur les mammifères marins. Je souhaite aussi remercier ma codirectrice de recherche Magali Houde pour son implication dans le projet et ses conseils. Je tiens à remercier Laurie Mercier pour son temps et son aide au laboratoire malgré toutes les embuches. Ce fut grandement apprécié. Je remercie aussi Maeva Giraud pour ses conseils au sujet de la qPCR. Je suis également reconnaissante du travail effectué par Ling Wang pour l'analyse des contaminants.

Je remercie spécialement mes collègues et amis du laboratoire. Anaïs, Manon, Antoine, Alexandre, Frédérique, Madeleine, Laura, Meredith, Coralie, Mélanie et Sarah, je vous remercie pour votre soutien et l'entraide, mais surtout pour les beaux moments passés ensemble!

Finalement, je remercie ma famille, mes amis et mon copain qui m'ont soutenue tout au long de ma maîtrise.

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	ii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES TABLEAUX	vii
LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES	ix
RÉSUMÉ.....	xii
INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 Mise en contexte.....	3
1.1 Revue de littérature.....	3
1.1.1 Les bélugas.....	3
1.1.2 Les bélugas de l'estuaire du St-Laurent.....	3
1.1.2.1 Tendance démographique et causes de mortalité.....	4
1.1.3 Les contaminants organohalogénés chez les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent.....	6
1.1.3.1 Les biphényles polychlorés.....	6
1.1.3.2 Les pesticides organochlorés.....	7
1.1.3.3 Les retardateurs de flamme halogénés.....	8
1.1.4 Les hormones thyroïdiennes	10
1.1.4.1 La régulation des hormones thyroïdiennes.....	10
1.1.4.2 L'étude des hormones thyroïdiennes chez les mammifères marins	12
1.1.4.1 Effets des contaminants organohalogénés sur le système thyroïdien	13
1.2 Objectifs et hypothèses	14
1.2.1 Objectifs spécifiques.....	14
CHAPITRE 2 Associations between organohalogen contaminants and thyroid hormones in skin of the endangered St. Lawrence Estuary beluga population	16
2.1 Abstract.....	17
2.2 Introduction	18
2.3 Materials and Methods.....	20
2.3.1 Sampling	20
2.3.2 Thyroid hormone analysis	21
2.3.3 Chemical analysis.....	23
2.3.4 Statistical analysis.....	24
2.4 Results.....	25
2.4.1 Thyroid hormone concentrations in Canadian Arctic belugas	25
2.4.2 Thyroid hormone concentrations in SLE belugas	25
2.4.3 Organohalogen contaminant concentrations in SLE belugas.....	26

2.4.4	Associations between thyroid hormone and organohalogen contaminant concentrations	27
2.5	Discussion	29
2.5.1	Skin as an alternative matrix for thyroid hormone determination	30
2.5.2	Thyroid hormones in SLE beluga skin	31
2.5.3	Organohalogen levels in SLE belugas	32
2.5.4	Associations between organohalogenes and thyroid hormones.....	33
2.6	Conclusions	36
2.7	Acknowledgements	37
2.8	Supporting information	38
	CONCLUSION GÉNÉRALE	60
	RÉFÉRENCES	62

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1. Aire de répartition estivale et hivernale actuelle du béluga du Saint-Laurent (tiré de MPO, 2012)	4
Figure 1.2. Structure générale des PBDE	8
Figure 1.3. Structure de la T ₃ (a) et de la T ₄ (b)	11
Figure 2.1. Spearman’s correlation between T ₃ and Σ ₃₄ PBDE concentrations in skin of male SLE belugas (n = 20).....	29
Fig. S2.1. Sampling area (hatched) in the St. Lawrence Estuary (QC, Canada), corresponding to the critical habitat of the SLE beluga (figure adapted from Simond <i>et al.</i> (2019))	38
Fig. S2.2. Concentrations (pmol/g ww) of T ₃ in skin, outer blubber, and inner blubber of Canadian Arctic belugas (n = 5). Vertical lines represent the range, the box delimits the first and third quartile, the horizontal line across the box is the median and the dots are outliers.....	41
Fig. S2.3. Concentrations (pmol/g ww) of T ₄ in skin, outer blubber, and inner blubber of Canadian Arctic belugas (n = 5). Vertical lines represent the range, the box delimits the first and third quartile, the horizontal line across the box is the median and the dots are outliers.....	42
Fig. S2.4. Level ratios of T ₄ /T ₃ in skin, outer blubber, and inner blubber of Canadian Arctic belugas (n = 5). Vertical lines represent the range, the box delimits the first and third quartile, the horizontal line across the box is the median and the dots are outliers.	43
Fig. S2.5. Scatterplot of T ₃ concentrations in skin (pmol/g ww) and plasma (pmol/mL) of Canadian Arctic belugas (n = 5).	44
Fig. S2.6. Scatter plot of T ₄ concentrations in skin (pmol/g ww) and plasma (pmol/mL) of Canadian Arctic beluga (n = 5).....	45
Fig. S2.7. Scatter plot of T ₄ /T ₃ level ratios in skin and plasma of Canadian Arctic belugas (n = 5).....	46
Fig. S2.8. Heatmap of correlations between levels of thyroid hormones and their deiodinated metabolites and concentrations of organohalogenes in SLE beluga (n=40). The color scale on the left represents the Spearman correlation coefficient. Only significant correlations (p ≤ 0.05) are represented on the diagram with circles; size and color intensity are proportional to the correlation coefficient.	57
Fig. S2.9. Heatmap of correlations between levels of thyroid hormones and their deiodinated metabolites and concentrations of organohalogenes in female SLE beluga (n=20). The color scale on the left represents the Spearman correlation coefficient. Only significant correlations (p < 0.05) are represented on the diagram with circles; size and color intensity are proportional to the correlation coefficient.....	58

Fig. S2.10. Heatmap of correlations between levels of thyroid hormones and their deiodinated metabolites and concentrations of organohalogens in male SLE beluga (n=20). The color scale on the left represents the Spearman correlation coefficient. Only significant correlations ($p < 0.05$) are represented on the diagram with circles; size and color intensity are proportional to the correlation coefficient..... 59

LISTE DES TABLEAUX

Table 2.1. Mean concentrations (\pm SEM and range; pmol/g ww) of thyroid hormones and their deiodinated metabolites in biopsied skin of male and female SLE beluga.	26
Table 2.2. Mean concentrations (\pm SEM and range; ng/g ww) of organohalogen contaminants in biopsied skin of male and female SLE beluga.	26
Table 2.3. Highest ranked linear models (Δ AICc < 2) explaining thyroid hormone levels in SLE beluga skin (n = 40).	28
Table S2.1. Method limits of detection (MLODs; pM) and method limits of quantification (MLOQs; pM) for the analyses of thyroid hormones and their deiodinated metabolites by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode (UPLC-MRM/MS).	40
Table S2.2. Thyroid hormones and their deiodinated metabolites analyzed in skin of SLE belugas (n=40) and skin, blubber and plasma of Canadian Arctic belugas (n=5) with associated percentages of samples with concentrations above method limits of quantification (% > MLOQs), mean concentrations (\pm SEM). Concentrations are reported in pmol/g ww for tissues and pmol/mL for plasma.	47
Table S2.3. Mean (\pm SEM) T ₄ /T ₃ level ratios in skin of SLE beluga (n=40) and skin, blubber and plasma of Canadian Arctic beluga (n=5).	49
Table S2.4. Polychlorinated biphenyls (PCBs) analyzed in SLE beluga skin (n=40) and their respective method limits of detection (MLODs; ng/g ww), percentages of samples with concentrations above MLODs (% > MLOD), mean concentrations (\pm SEM; ng/g ww), and relative contributions (%) of each congener to Σ_{40} PCB.	50
Table S2.5. Organochlorine pesticides (OCPs) analyzed in SLE beluga skin (n=40) and their respective method limits of detection (MLODs; ng/g ww), percentage of samples with concentrations above MLODs (% > MLODs), mean concentrations (\pm SEM; ng/g ww), and relative contributions (%) of each congener to the Σ_{29} OCP.	51
Table S2.6. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) analyzed in SLE beluga skin (n=40) and their respective method limits of detection (MLODs; ng/g ww), method limits of quantification (MLOQs ; ng/g ww), percentage of samples with concentrations above MLOQs (% > MLOQs), mean concentrations (\pm SEM; ng/g ww), and relative contributions (%) of each congener to the Σ_{34} PBDE.	52
Table S2.7. Non-PBDE halogenated flame retardants (Non-PBDE HFRs) analyzed in SLE beluga skin (n=40) and their respective method limits of detection (MLODs; ng/g ww), method limits of quantification (MLOQs; ng/g ww), percentage of samples with concentrations above MLOQs (% > MLOQs), mean concentrations (\pm SEM; ng/g ww).	53

Table S2.8. Summary of mean comparison tests of thyroid hormone and deiodinated metabolite levels and organohalogen contaminant concentrations in male and female SLE beluga (n=40). Hormone levels were log-transformed. Differences in variable means between males and females were tested using the Student's T tests (T statistic) when the assumptions of normality and homogeneity of variance were met, otherwise the non-parametric Wilcoxon signed-rank test (W statistic) was used. 54

Table S2.9. Candidate linear models and a priori hypotheses predicting hormone and deiodinated metabolite levels (TH) in SLE beluga skin. 55

Table S2.10. Variance inflation factor (VIF) of predictors in most complex candidate models. 56

LISTE DES ABRÉVIATIONS, DES SIGLES ET DES ACRONYMES

AICc: Akaike information criterion corrected for small sample sizes

BB-153: 2,2',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl

BPC : Biphényle polychloré

COSEPAC : Comité sur la situation des espèces en péril au Canada

COSEWIC : Committee on the Status of Endangered Wildlife in Canada

CPlus : Chlordene Plus

DDD: Dichlorodiphenyldichloroethane

DDE : Dichlorodiphényldichloroéthylène / Dichlorodiphenyldichloroethylene

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane / Dichlorodiphényltrichloroethane

Dec-602 : déchlorane 602

Dec-604 CB : déchlorane 604 Composé B

DFO : Fisheries and Ocean Canada

DIO1 : Iodothyronines désiodase de type 1

DIO2 : Iodothyronines désiodase de type 2

DIO3 : Iodothyronines désiodase de type 3

DMSO: Dimethyl sulfoxide

DP : Déchlorane Plus / Dechlorane plus

ENCI: Electron capture negative ionization mode

GC/MS : Chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse / Gas chromatography with mass spectrometry

HBB : Hexabromobenzène / Hexabromobenzene

HCB : Hexachlorobenzène / Hexachlorobenzene

HCH : Hexachlorocyclohexane

HFR : Halogenated flame retardant

LC-MS/MS: Liquid chromatography with tandem mass spectrometry

Min: Minute

MLOD: Method limits of detection

MLOQ: Method limits of quantification

MPO: Pêches et Océans Canada

MSD : Mass selective detector

OCP : Organochlorine pesticide

OHC : Organohalogen contaminant

PBEB : Pentabromoethylbenzène / Pentabromoethylbenzene

PBT: Polybutylene terephthalate

PBDE : Polybromodiphénylether / Polybrominated diphenyl ethers

PCB : Polychlorinated biphenyl

POP : Polluant organique persistant / persistent organic pollutant

rT₃ : Triiodothyronine inverse / Reverse triiodothyronine

SLE : St. Lawrence Estuary

T₃ : Triiodothyronine

T₄ : Thyroxine

TRH : Hormone thyroïdienne

TSH : Thyroïdostimuline

UPLC-MRM/MS : Chromatographie liquide ultra-performante couplée avec la spectrométrie de masse en tandem en mode « multiple reaction monitoring » / ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode

VIF : Variance inflation factor

ww : Wet weight

3,3'-T₂ : 3,3'-diiodothyronine

3,5-T₂ : 3,5-diiodothyronine

RÉSUMÉ

La population de bélugas (*Delphinapterus leucas*) de l'estuaire du Saint-Laurent est fortement exposée à de nombreux contaminants. L'exposition aux contaminants a été identifiée comme l'une des principales causes potentielles du déclin de cette population en danger. Depuis les années 2000, une augmentation de la mortalité de femelles liée à la mise bas et de la mortalité des veaux a été signalée dans cette population. Il a été suggéré que l'exposition élevée à certains contaminants organohalogénés (p. ex : les polybromodiphényléthers [PBDE]) pourrait jouer un rôle dans ce phénomène en perturbant les niveaux d'hormones thyroïdiennes. L'objectif de cette étude était de vérifier si l'exposition des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent à des contaminants organohalogénés est associée à des perturbations des niveaux d'hormones thyroïdiennes. Des biopsies de peau de bélugas mâles et femelles (n=40) obtenues en 2019 ont été utilisées pour l'analyse des hormones comme alternative au plasma qui ne peut être obtenu chez cette population protégée. Nous avons analysé les concentrations de contaminants (PBDE, biphényles polychlorés et pesticides organochlorés) dans ces échantillons par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Les concentrations d'hormones thyroïdiennes ont été analysées avec une nouvelle méthode utilisant la chromatographie liquide ultra-performante couplée avec la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MRM/MS). Cette méthode a été testée à l'aide d'échantillons de peau, de gras et de plasma provenant de carcasses de bélugas de l'Arctique canadien. La comparaison de paires d'échantillons de plasma et de peau suggère que les niveaux d'hormones dans la peau ne reflètent pas nécessairement ceux dans le plasma. Toutefois, la taille de l'échantillon ne permet pas de tirer de conclusion à ce sujet. Cette méthode a permis d'identifier et de quantifier la triiodothyronine (T_3), la thyroxine (T_4) et deux de leurs métabolites désiodés dans les échantillons de peau de bélugas du Saint-Laurent. Selon une comparaison de modèles linéaires, la variable qui expliquait le mieux la variation du ratio T_4/T_3 dans la peau était le sexe des bélugas. Chez les mâles, les niveaux de T_3 étaient corrélés positivement avec les concentrations de PBDE. Ces résultats suggèrent que les niveaux d'hormones thyroïdiennes pourraient être perturbés par l'exposition aux PBDE. Cette étude indique que l'utilisation de biopsies de peau est prometteuse pour étudier les hormones thyroïdiennes chez les mammifères marins, particulièrement chez les populations vulnérables exposées à des perturbateurs endocriniens. Toutefois, des études supplémentaires devraient être réalisées pour examiner la relation entre les niveaux d'hormones thyroïdiennes dans la peau et ceux dans le plasma.

Mots clés : *Delphinapterus leucas*, hormone thyroïdienne, contaminant organohalogéné, perturbateur endocrinien

INTRODUCTION

Les bélugas (*Delphinapterus leucas*) du Saint-Laurent résident en permanence dans les eaux de l'estuaire et du golfe du Saint-Laurent, occupant ainsi l'extrême sud de la distribution de cette espèce (MPO, 2014). Par le passé, cette population a été fortement décimée par une chasse commerciale. Bien que celle-ci fut interdite en 1979, la population ne s'est pas encore rétablie. Depuis les années 2000, cette population fait face à une hausse des mortalités chez les veaux et les femelles. C'est dans ce contexte que la population des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent a été classifiée « en voie de disparition » en 2014 (COSEPAC, 2014).

Occupant les eaux d'un fleuve aux rives fortement industrialisées, la population de l'estuaire du Saint-Laurent est chroniquement exposée à de nombreux contaminants organohalogénés tels que les biphényles polychlorés (BPC), les pesticides organochlorés et les retardateurs de flamme halogénés (p. ex. les polybromodiphényléther [PBDE]). Ceux-ci sont suspectés d'interférer avec le rétablissement de cette population (COSEPAC, 2014). Bien que l'utilisation de plusieurs de ces contaminants ait été interdite, des concentrations inquiétantes de PBDE, de BPC et de pesticides organochlorés sont détectées dans les tissus des bélugas du Saint-Laurent. Les travaux de Lebeuf *et al.* (2014) ont montré que les concentrations de BPC et de certains pesticides organochlorés (par ex. : le mirex et le dichlorodiphényltrichloroéthane [DDT]) dans les tissus de ces bélugas ont légèrement diminué durant la période de 1987 à 2007. En ce qui concerne les PBDE, les concentrations de ces contaminants dans les tissus des bélugas ont atteint un sommet en 1997. Ces concentrations sont ensuite restées stables durant la période de 1997 à 2013, malgré l'implantation de réglementations interdisant la production et l'utilisation de ces contaminants au Canada et à l'international au courant des années 2000 (Simond *et al.*, 2017).

Les concentrations élevées de contaminants organohalogénés mesurées dans les tissus des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent sont préoccupantes, car l'exposition à ces contaminants a été associée à des perturbations endocriniennes chez les mammifères marins (revue par Sonne *et al.*, 2020). Les PBDE, les PCB et certains autres contaminants organochlorés présentent des similitudes structurales avec les hormones thyroïdiennes qui leur permettent d'interférer avec l'homéostasie de ces hormones chez les mammifères (revu par Jugan *et al.*, 2010). Les travaux de Villanger *et al.* (2011b) portant sur les bélugas du Svalbard (Arctique Norvégien) suggèrent que les PBDE et d'autres contaminants organohalogénés pourraient agir comme des perturbateurs endocriniens en induisant une diminution des niveaux

d'hormones thyroïdiennes chez les bélugas. Du côté des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent, des corrélations positives et négatives ont été rapportées entre les concentrations de certains contaminants organohalogénés et la transcription de gènes liées à la régulation de la fonction thyroïdienne (Simond *et al.*, 2019). Puisque l'hypothyroïdie a été associée à des complications lors de la mise bas et à la mortalité périnatale chez des mammifères, il a été suggéré que l'exposition à des perturbateurs endocriniens pourrait être impliquée dans la hausse des cas de dystocies et de mortalité des veaux observée chez les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent (Lair *et al.*, 2016). L'analyse des niveaux d'hormones thyroïdiennes et des concentrations de contaminants chez cette population pourrait permettre de mieux comprendre les effets des perturbateurs endocriniens chez cette population. L'analyse de ces hormones est normalement effectuée à l'aide d'échantillons de plasma. Cependant, il n'est pas possible d'obtenir de tels échantillons chez cette population vulnérable pour des raisons éthiques. L'analyse des hormones thyroïdiennes chez cette population nécessite donc l'utilisation d'une matrice alternative au plasma.

L'objectif de ce projet de recherche était de vérifier s'il existe des associations entre les niveaux d'hormones thyroïdiennes et l'exposition aux contaminants organohalogénés chez les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent. Pour ce faire, des échantillons de peau de bélugas de cette population ont été obtenus par biopsies. Les concentrations de contaminants organohalogénés (BPC, pesticides organochlorés, PBDE et autres retardateurs de flamme) ont été analysées par chromatographie gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC/MS). Une nouvelle méthode d'analyse utilisant la chromatographie liquide ultra-performante couplée avec la spectrométrie de masse en tandem (UPLC-MRM/MS) a été développée pour analyser les hormones thyroïdiennes dans les échantillons de peau de béluga. Cette méthode a été testée en comparant les concentrations d'hormones dans des échantillons de peau, de gras et de plasma provenant de carcasses de bélugas de l'Arctique canadien issues de la chasse traditionnelle inuite.

Ce projet de recherche est présenté sous forme de mémoire par article et se divise en deux chapitres. Le premier chapitre présente l'état des connaissances en lien avec le statut de la population des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent et leur exposition à des contaminants pouvant perturber l'homéostasie des hormones thyroïdiennes. Le deuxième chapitre prend la forme d'un article scientifique rédigé en anglais portant sur les associations entre les contaminants organohalogénés et les hormones thyroïdiennes dans la peau des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent.

CHAPITRE 1

Mise en contexte

1.1 Revue de littérature

1.1.1 Les bélugas

Le béluga est une espèce de cétacé odontocète (baleine à dents) au comportement grégaire vivant principalement dans les eaux marines arctiques et subarctiques de l'Alaska, du Canada, du Groenland, de la Norvège et de la Russie (O'corry-Crowe, 2009). Ce cétacé adapté aux eaux froides est reconnaissable à sa couleur blanche à l'âge adulte et grâce à l'absence de nageoire dorsale remplacée par une crête dorsale qui lui permet de briser la glace (DFO, 2012). Il se distingue aussi par ses vertèbres cervicales non soudées lui conférant une souplesse au niveau du cou, par son melon au niveau du front servant à l'écholocation, et par sa vaste gamme de vocalises pour communiquer. Le béluga peut atteindre une longueur de 3 à 5,5 mètres et un poids allant jusqu'à 1,5 tonne à maturité (O'corry-Crowe, 2009). Ce poids est composé d'environ 40% de gras situé dans le pannicule adipeux (gras sous-cutané) servant de réserve énergétique et d'isolation thermique (Sergeant et Brodie, 1969). Le béluga a une espérance de vie d'environ 30 à 60 ans (revu par DFO, 2012). La maturité sexuelle serait atteinte entre 12 et 14 ans pour les mâles, et entre 8 et 14 pour les femelles. Les femelles donnent naissance à un seul veau environ tous les trois ans à la suite d'une période de gestation de 14 mois et demi (revu par DFO, 2017a). Les veaux sont bruns ou gris foncé. Cette couleur pâlit graduellement avec l'âge jusqu'à l'obtention de leur couleur blanche caractéristique chez les adultes. Toutefois, cette transition ne coïncide pas nécessairement avec la maturité sexuelle (revu par COSEWIC, 2014).

1.1.2 Les bélugas de l'estuaire du St-Laurent

La population de bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent occupe la limite sud de l'aire de répartition de l'espèce. De ce fait, cette population est géographiquement et génétiquement isolée des autres populations de bélugas. Son aire de répartition est concentrée autour de l'embouchure du Fjord du Saguenay et s'étend de Saint-Jean-Port-Joli dans l'estuaire du Saint-Laurent, jusqu'à Sept-Îles dans les eaux côtières du golfe (**Figure 1.1**) (MPO, 2012).

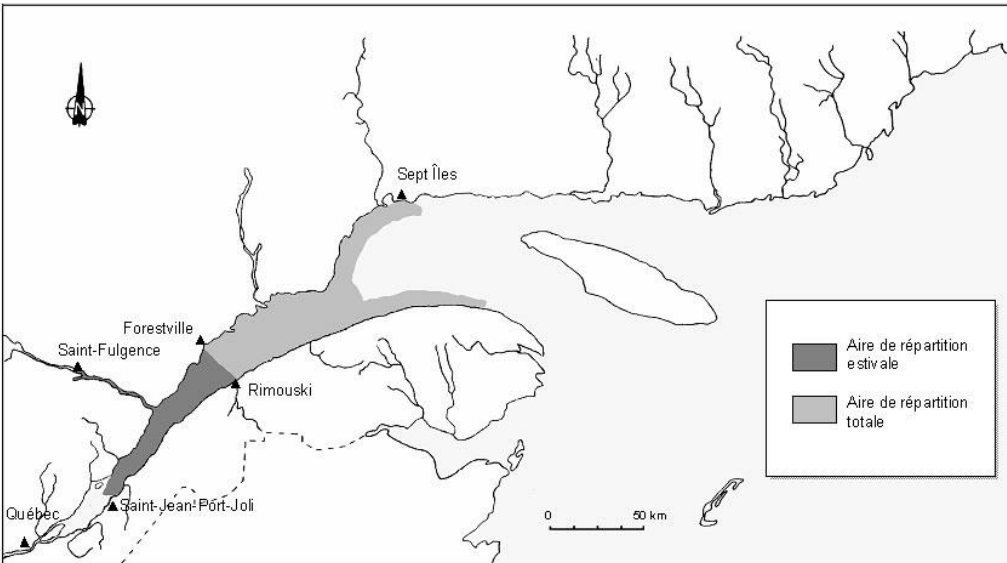


Figure 1.1. Aire de répartition estivale et hivernale actuelle du béluga du Saint-Laurent (tiré de MPO, 2012)

L’aire de distribution de cette population est située en aval de régions fortement industrialisées et peuplées telles que les Grands Lacs et le tronçon fluvial du Saint-Laurent. La voie maritime du Saint-Laurent qui assure le transport maritime entre ces régions et l’océan Atlantique traverse aussi l’habitat de cette population. Conséquemment, les bélugas de l’estuaire du Saint-Laurent font face à de nombreuses menaces de nature anthropique, telles que l’exposition aux contaminants et le dérangement par le trafic maritime. De plus, la surpêche, la dégradation de l’habitat et le réchauffement des océans pourraient affecter la disponibilité et la qualité des proies de cette population (DFO, 2012; revu par Lesage, 2021) qui s’alimente majoritairement de poissons (p. ex. : la morue, le sébaste, la merluche et le capelan) ainsi que d’invertébrés (p. ex. : les vers polychètes, les crustacés et les mollusques) (Lesage *et al.*, 2020). En raison de ces menaces ainsi que d’importants changements démographiques, la population de bélugas du Saint-Laurent a obtenu le statut de population en voie de disparition par le Comité sur la situation des espèces en péril au Canada (COSEPAC) (COSEWIC, 2014). En effet, l’effectif de la population aurait entamé un lent déclin au courant des années 2000 malgré diverses mesures de protection (Mosnier *et al.*, 2015).

1.1.2.1 Tendence démographique et causes de mortalité

Par le passé, la population de bélugas de l’estuaire de Saint-Laurent a subi une pression de chasse commerciale intensive, passant d’un effectif d’environ 5 000 à 10 000 au début des années 1900, à environ

1000 dans les années 1980 (DFO, 2014; Hammill *et al.*, 2007). Son aire de répartition a été réduite d'environ 65% (MPO, 2014). Malgré l'interdiction de la chasse en 1979 et l'implantation de diverses mesures de protection, la population n'a montré aucun signe de rétablissement entre 1988 et 2005 (Hammill *et al.*, 2007). Une modélisation de la dynamique de la population incluant des données provenant de relevés photographiques a indiqué que l'effectif de la population a lentement décliné (environ 1% par année) dans les années 2000 pour atteindre 889 individus en 2012 (Mosnier *et al.*, 2015). Selon des relevés photographiques, la proportion de veaux dans la population aurait aussi diminué dans les années 2000, passant de 15-18% durant la période de 1990 à 1997, à 3-8% durant la période de 2000 à 2009 (Gosselin *et al.*, 2014). Un programme de récupération des carcasses et de nécropsies a permis de noter une augmentation de la mortalité des femelles à un plus jeune âge dans les années 2000 comparativement aux années 1990 (Lesage *et al.*, 2014). De plus, des pics de mortalité des veaux anormalement élevés ont été rapportés en 2008, 2010 et 2012 (Lesage *et al.*, 2014). Le nombre de carcasses signalées lors de ces années records était 3 à 5 fois plus élevé que le maximum rapporté depuis le début du suivi en 1983.

Le programme de nécropsie des carcasses a permis d'identifier les causes principales de mortalité chez les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent entre 1983 et 2012 (Lair *et al.*, 2016). La cause de mortalité la plus commune était les maladies infectieuses (32% des carcasses). Les bélugas du Saint-Laurent sont exposés à des contaminants tels que les BPC qui ont été associés à un risque d'infection exacerbé et une immunosuppression chez les mammifères marins (Lair *et al.*, 2016). Chez les femelles, les dystocies et les complications post-partum étaient la cause de mortalité de 19% des femelles. Dans les cas de dystocie, certaines femelles présentaient une dilatation incomplète de l'utérus, une rupture partielle ou complète de l'utérus ou un prolapsus utérin. Certains fœtus avaient une posture anormale et se présentaient par la queue empêchant ainsi leur passage dans le canal vaginal. Une augmentation de la fréquence des mises bas dystociques menant à la mort des femelles et des nouveau-nés a été observée durant les années 2000 et a atteint un sommet entre 2010 et 2012 (Lair *et al.*, 2016). Durant cette période, ce fut la cause de mortalité de 47% des femelles adultes. Des cas de dystocies sont rapportés à l'occasion chez d'autres populations de cétacés, mais ils sont plutôt rares (Lair *et al.*, 2016). La population du Saint-Laurent est exposée à plusieurs facteurs de risques pouvant mener à dystocies, tels que l'exposition à des contaminants, le stress nutritionnel et le dérangement des femelles lors de la mise bas par le trafic maritime (Lair *et al.*, 2014). En ce qui concerne les veaux, la majorité des carcasses observées présentaient des signes associés à la détresse fœtale, ce qui suggère que la mise bas a été longue et laborieuse. La mortalité des veaux a été associée à des températures d'eau de surface élevées, une diminution du

couvert de glace, une diminution de la disponibilité de poissons démersaux et de hareng (Plourde *et al.*, 2014).

1.1.3 Les contaminants organohalogénés chez les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent

Puisque la population de l'estuaire du Saint-Laurent occupe des eaux avoisinant des zones fortement industrialisées, ces bélugas sont exposés à de nombreux contaminants organohalogénés se retrouvant dans l'eau et les sédiments. En tant qu'espèce longévive, s'alimentant à divers niveaux trophiques et possédant d'importantes réserves de graisse, le béluga présente des caractéristiques favorisant la bioaccumulation de ces contaminants lipophiles dans ses tissus, notamment par l'ingestion de proies et de sédiments contaminés (Lebeuf, 2009). Depuis 1980, plusieurs études ont rapporté la présence d'un large éventail de contaminants organohalogénés dans les tissus de cette population. On y retrouve notamment des polluants organiques persistants (POP) tels que les BPC, les pesticides organochlorés et les PBDE, ainsi que des contaminants d'intérêt environnemental émergeant qui ont remplacé les POP dont l'usage a été interdit (revue par Lebeuf, 2009; Simond *et al.*, 2017, 2020).

1.1.3.1 Les biphényles polychlorés

Les BPC forment une classe de composés chimiques synthétiques comprenant 209 congénères se différenciant par leur degré de chloration et la position des atomes de chlore sur les deux groupements phényle de la molécule. Les BPC peuvent résister à des pressions et des températures extrêmes, c'est pourquoi ils ont été utilisés entre autres comme isolant électrique dans les transformateurs et les condensateurs. Ils peuvent aussi entrer dans la fabrication de plastiques, de papiers autocopiants et d'additifs dans la peinture à l'huile. La production de BPC a débuté en 1929 aux États-Unis, pour atteindre un sommet au début des années 1970. Des inquiétudes au niveau des impacts environnementaux des BPC ont motivé l'interdiction de la production, l'importation et la vente de ceux-ci au Canada en 1977 (Santé Canada, 2005). Au niveau international, les BPC sont réglementés par la convention de Stockholm depuis 2004 (UNEP, 2019). Depuis, les sources principales de BPC dans l'environnement sont les sites d'enfouissement de déchets dangereux et d'équipement électrique (Olivier, 2012).

La réglementation des BPC semble avoir entraîné un déclin des concentrations de ces contaminants dans les tissus des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent. Les concentrations dans le gras des bélugas adultes ont décliné à un rythme de 5,5% par année entre 1987 et 2007 (Lebeuf *et al.*, 2014). Malgré cette diminution, les concentrations de BPC demeurent élevées chez cette population. Simond *et al.* (2019) ont

rapporté une concentration moyenne de BPC de 1356 ng/g (poids humide) dans le gras de béluga mâle obtenu par biopsie. Dans l'étude de Simond (2019), certains bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent présentaient des concentrations de BPC dans le gras allant jusqu'à 28,6 µg/g (poids corrigé selon la teneur en lipides). Cela dépasse le seuil de référence pour les concentrations de BPC associées à des effets néfastes sur la santé des mammifères marins établi à 17 µg/g (poids corrigé selon la teneur en lipides) dans le gras (Kannan *et al.*, 2000). Notamment, des concentrations supérieures à ce seuil ont été associées à des risques exacerbés d'infection infectieuse chez les marsouins communs (*Phocoena phocoena*) au Royaume-Uni (Jepson *et al.*, 2005).

1.1.3.2 Les pesticides organochlorés

Plusieurs composés organochlorés ont été utilisés comme pesticides depuis le début des années 1940. Cette catégorie comprend notamment le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), le chlordane (un mélange commercial de *trans* et *cis*-chlordane, d'heptachlore et de *trans*-nonachlore, entre autres), le lindane (gamma-hexachlorocyclohexane), l'hexachlorobenzène (HCB) et le mirex. L'utilisation de la plupart de ces pesticides a été bannie au Canada depuis les années 1970. Au niveau international, la convention de Stockholm interdit ou restreint l'usage et la production de plusieurs pesticides organochlorés depuis 2004 (l'aldrine, le chlordane, le DDT, la dieldrine, l'endrine, l'heptachlore, hexachlorobenzène, le mirex et le toxaphène) (UNEP, 2019).

Les tendances temporelles des concentrations de pesticides organochlorés dans les tissus des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent semblent concorder avec la réglementation de ces contaminants. Lebeuf *et al.* (2014) ont rapporté des diminutions des concentrations de DDT, de *cis* et *trans*-nonachlore, d'hexachlorocyclohexane (HCH), de HCB et de mirex dans le gras des bélugas pour la période de 1987 à 2007. Ces diminutions étaient de l'ordre de 3 à 11% par année selon le pesticide analysé et le sexe des bélugas. Plus récemment, Simond *et al.* (2019) ont mesuré les concentrations de p,p'-dichlorodiphényldichloroéthylène (p,p'-DDE; un produit de dégradation du DDT), de *trans*-nonachlore, de mirex et de HCB dans le gras de biopsies de bélugas obtenues de 2015 à 2017. De ces contaminants, le p,p'-DDE était celui dont la concentration moyenne était la plus élevée, suivi du *trans*-nonachlore (561 et 116 ng/g; poids humide).

1.1.3.3 Les retardateurs de flamme halogénés

Les retardateurs de flamme halogénés sont des composés additifs ou réactifs retrouvés dans une large gamme de matériaux usinés tels que les textiles, les matériaux de construction, le matériel électronique et les plastiques pour ralentir la propagation des flammes en cas d'incendie. Ils se retrouvent donc dans une vaste gamme de produits domestiques, tels que les meubles rembourrés, les vêtements et les appareils électroniques. Puisque ce sont des additifs, les retardateurs de flamme halogénés peuvent se libérer des polymères et se retrouver dans l'environnement. Ces produits peuvent ensuite rejoindre les eaux du fleuve Saint-Laurent notamment par les rejets d'eaux municipales (Houde et al., 2014; Pelletier and Rondeau, 2013; Reinling et al., 2017).

Les PBDE sont des retardateurs de flamme bromés formés de deux cycles phényle liés par un atome d'oxygène. Il en existe 209 congénères se distinguant par leur nombre d'atomes de bromes (1 à 10) et leurs positions sur la molécule. Leur structure ainsi que leurs propriétés physiques sont similaires à celles des BPC. Ils ont été commercialisés sous trois mélanges techniques, soit le Penta-, l'Octa- et Déca-BDE.

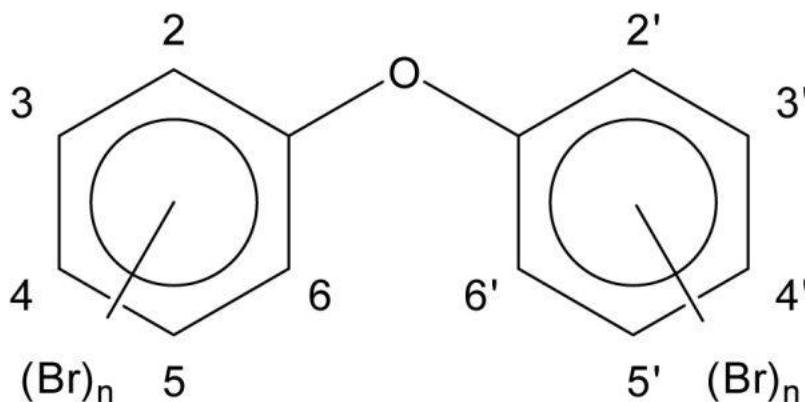


Figure 1.2. Structure générale des PBDE

Au Canada, le Règlement sur les polybromodiphényléthers émis en 2008 a interdit la production de PBDE ainsi que l'utilisation de certains groupes de PBDE (tétraBDE, pentaBDE, hexaBDE). La production internationale de PBDE a cessé progressivement depuis le début des années 2000. Les mélanges commerciaux PentaBDE et OctaBDE ont été ajoutés à l'Annexe A de la convention de Stockholm en 2009, suivi du Deca-BDE en 2017 (UNEP, 2017).

Entre 1988 et 1999, les concentrations de PBDE chez les bélugas du Saint-Laurent ont augmenté d'au moins 20% par année, puis elles ont plafonné (Lebeuf *et al.*, 2014). Malgré les restrictions visant les PBDE dans la dernière décennie, les concentrations de PBDE dans le gras des bélugas sont restées stables pour la période de 1997 à 2014. Selon les auteurs, cela pourrait s'expliquer d'une part par le fait que le béluga est une espèce longévive avec une capacité de métabolisation et d'excrétion des xénobiotiques relativement faible. D'autre part, les produits contenant des PBDE qui ont été mis en circulation avant les réglementations peuvent représenter une source continue ou à retardement de ces contaminants, car ceux-ci peuvent encore libérer ces contaminants.

Simond *et al.* (2017) ont rapporté des concentrations de PBDE plus élevées dans le gras de carcasses de bélugas du Saint-Laurent (666 à 1287 ng/g; poids corrigé selon la teneur en lipides) que dans celles de petits rorquals du Saint-Laurent (244 à 280 ng/g de lipides) et de bélugas de l'Arctique Canadien (247 à 293 ng/g; poids corrigé selon la teneur en lipides). Les bélugas du Saint-Laurent seraient la seconde population de mammifères marins la plus contaminée par les PBDE au Canada après celle des orques (*Orcinus orca*) résidentes du Sud (côte ouest américaine et canadienne) (Simond *et al.*, 2017). Dans les études de Simond *et al.* (2017, 2019), les PBDE représentaient environ 96-97% des concentrations de retardateurs de flamme analysés.

Les réglementations visant les PBDE ont mené à l'utilisation de nombreux retardateurs de flamme halogénés de remplacement. Simond *et al.* (2017) ont détecté de l'hexabromobenzène (HBB), du pentabromoethylbenzene (PBEB), du Chlordene Plus (CPlus), du Déchlorane Plus (DP) et du déchlorane 602 et 604 Composé B (Dec-602 et Dec-604 CB) dans le gras de carcasses de bélugas du Saint-Laurent collectées entre 1997 et 2013. Les composés en lien avec le déchlorane (Dec-602, Dec-604 CB, CPlus, et DP) formaient la catégorie de retardateurs de flamme halogénés autres que les PBDE la plus importante. À l'exception du DP et du Dec-604 CB, les concentrations de retardateurs de flamme halogénés autres que les PBDE étaient plus élevées pour la population du Saint-Laurent que celle du Nunavik (Arctique canadien). Pour la période de 1997 à 2013, les concentrations de HBB et CPlus chez le béluga de l'estuaire du Saint-Laurent ont diminué. Celles du DP ont augmenté jusqu'en 2000 puis ont diminué. L'analyse de biopsies de gras de bélugas du Saint-Laurent récoltées de 2015 à 2017 a montré que les concentrations de DP et de Dec-604 CB étaient plus élevées dans les récentes biopsies que celles mesurées de 1997 à 2013 dans les carcasses, alors que celles de HBB et de PBEB étaient plus faibles (Simond *et al.*, 2019). Le CPlus et le Dec-602 n'ont pas été détectés dans ces biopsies. Des paraffines chlorées à chaîne courte ont aussi été

détectées dans ces biopsies (Simond *et al.*, 2020). Cette classe de contaminants utilisés entre autres comme retardateurs de flamme, mais aussi comme remplaçants pour les BPC, représentait 74% de la somme totale des contaminants organohalogénés.

1.1.4 Les hormones thyroïdiennes

Les hormones thyroïdiennes, soit la triiodothyronine (T_3) et la thyroxine (T_4), sont impliquées dans plusieurs voies de signalisation régulant, entre autres, le métabolisme, la température corporelle, le développement et la croissance. Les hormones thyroïdiennes jouent aussi un rôle crucial dans le développement périnatal du système nerveux central. Ces hormones lipophiles se retrouvent dans de nombreux tissus, dont les tissus adipeux où ils interviennent dans la lipogénèse, la lipolyse et l'adipogénèse (Obregon, 2014; Pucci *et al.*, 2000). De plus, les hormones thyroïdiennes sont impliquées dans l'homéostasie de la peau et la prolifération des cellules de l'épiderme chez certains mammifères (Mancino *et al.*, 2021 ; Safer *et al.*, 2004).

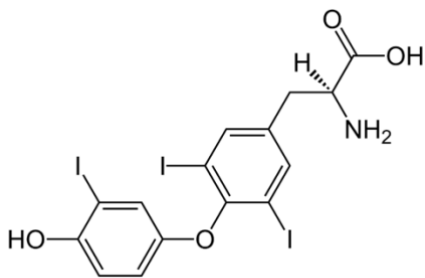
1.1.4.1 La régulation des hormones thyroïdiennes

Chez les vertébrés, l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien régule la production des hormones thyroïdiennes. Lorsque les niveaux de T_3 et T_4 sont bas, l'hypothalamus produit l'hormone thyrotrope (TRH). Cette hormone stimule la libération de la thyrostimuline (TSH) dans le sang par l'hypophyse. La TSH rejoint alors la glande thyroïde où elle se lie à son récepteur et active la production de T_3 et T_4 . Ces hormones exercent ensuite une rétroaction négative au niveau de la production de TSH et TRH. L'homéostasie des hormones thyroïdiennes dépend de cette boucle de rétroaction.

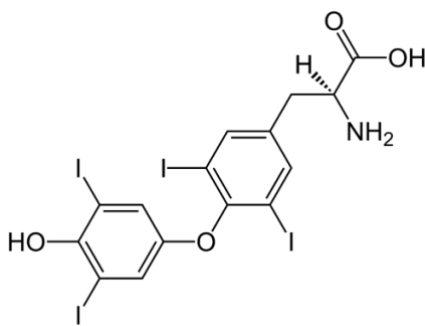
Les hormones thyroïdiennes sont produites par l'iodation de résidus de tyrosine dans la glande thyroïdienne principalement sous la forme de la prohormone T_4 et sous la forme bioactive T_3 en moindre mesure. Elles sont ensuite relarguées dans la circulation sanguine. Les hormones thyroïdiennes en circulation sont majoritairement liées à des protéines de transport, telles que l'albumine et la globuline liant la thyroxine. Malgré leur caractère lipophile, les hormones thyroïdiennes traversent la membrane plasmique des cellules cibles à l'aide de transporteurs membranaires tels que les transporteurs d'anions organiques et les transporteurs d'acide monocarboxylique. Les hormones diffusent ensuite à travers la membrane nucléaire. Dans le noyau, elles se lient aux récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes alpha et beta ($thr\alpha$ et $thr\beta$). La liaison des hormones à ces récepteurs déclenche la transcription de gènes

et une série de réactions permettant la régulation de processus physiologiques par les hormones thyroïdiennes.

Les niveaux d'hormones intracellulaires sont régulés par des enzymes catalysant la désiodation des hormones thyroïdiennes, soit les iodothyronines désiodases. Ainsi, la majorité de la production de T_3 provient de la conversion de la T_4 en T_3 par ces enzymes dans les cellules cibles. Les iodothyronines désiodases de type 1 et 2 (DIO1 et DIO2) catalysent la conversion de la T_4 en T_3 en libérant un iode situé sur l'anneau extérieur de la molécule. Par cette même action, la DIO1 et la DIO2 peuvent aussi convertir la T_3 en 3,5-diiodothyronine (3,5- T_2), un métabolite moins actif. De leur côté, les iodothyronines désiodases de type 2 et 3 (DIO3) peuvent inactiver les hormones thyroïdiennes en libérant l'iode situé sur l'anneau interne de ces molécules. Cela convertit la T_4 en T_3 inverse (rT_3), ainsi que la T_3 en 3,3'-diiodothyronine (3,3'- T_2), deux métabolites inactifs.



a)



b)

Figure 1.3. Structure de la T_3 (a) et de la T_4 (b)

1.1.4.2 L'étude des hormones thyroïdiennes chez les mammifères marins

L'étude des hormones thyroïdiennes est d'un grand intérêt pour la conservation de la faune, car elles peuvent fournir des informations sur l'état nutritionnel de l'individu et sur les perturbations endocriniennes engendrées par des contaminants. De plus, le système thyroïdien est hautement conservé au sein des vertébrés ce qui facilite les comparaisons d'une espèce à l'autre, malgré certaines différences interspécifiques (Zoeller et al., 2007). Toutefois, l'étude des hormones thyroïdiennes chez les cétacés en milieu sauvage comporte plusieurs défis. D'une part, l'obtention d'échantillons peut soulever des enjeux éthiques et techniques. D'autre part, les niveaux d'hormones peuvent varier sous l'influence de plusieurs facteurs biologiques et environnementaux, ce qui complexifie l'interprétation biologique des résultats.

Les hormones thyroïdiennes sont généralement quantifiées dans le plasma et le sérum en termes de concentrations d'hormone libre (la forme disponible pour les cellules), ou totale incluant les hormones liées à des protéines. Les hormones thyroïdiennes ont été quantifiées dans le plasma ou le sérum chez les bélugas de quelques populations, telles que les bélugas de l'Arctique norvégien, de l'Arctique canadien et de l'Alaska ainsi que chez des bélugas captifs (Flower *et al.*, 2015; Hansen *et al.*, 2017; St. Aubin *et al.*, 2001; Villanger *et al.*, 2011b). En ce qui concerne les bélugas du Saint-Laurent, l'obtention d'échantillons de plasma n'est pas possible pour des raisons éthiques et techniques. En effet, l'obtention de plasma est hautement invasive, car elle implique la capture et l'immobilisation de ces animaux de grande taille. Toutefois, des matrices alternatives peuvent être utilisées pour l'analyse des hormones thyroïdiennes, car ces hormones s'accumulent dans de nombreux tissus. Par exemple, les hormones thyroïdiennes ont été quantifiées dans des échantillons d'excréments et de vapeurs respiratoires (souffles) de quelques espèces de baleines (Hunt *et al.*, 2014, 2019; Lemos *et al.*, 2020; Wasser *et al.*, 2017).

Certains facteurs biologiques peuvent influencer les niveaux d'hormones thyroïdiennes chez les mammifères marins, tels que le sexe, l'âge, la grossesse et l'alimentation. Par exemple, chez les bélugas en captivité, Flower *et al.* (2015) ont observé que les mâles présentaient des niveaux d'hormones thyroïdiennes dans le sérum plus élevés que les femelles. De plus, les niveaux d'hormones thyroïdiennes étaient plus élevés chez les jeunes que chez les adultes. Chez les grands dauphins (*Tursiops truncatus*) en captivité, les niveaux d'hormones thyroïdiennes dans le sérum sont plus élevés chez les femelles en début de grossesse que chez celles non gestantes (West *et al.*, 2014). En ce qui a trait à l'alimentation, la qualité et la disponibilité en iode peuvent influencer les niveaux d'hormones thyroïdiennes (revu par Eales, 1988). Les périodes de jeûne à court et long terme sont associées à des baisses des niveaux de ces hormones chez

les mammifères. Par exemple, il a été observé que les niveaux de T₃ diminuent en période de stress nutritionnel chez les orques résidentes du Sud (Ayres *et al.*, 2012; Wasser *et al.*, 2017).

1.1.4.1 Effets des contaminants organohalogénés sur le système thyroïdien

L'homéostasie des hormones thyroïdiennes peut être perturbée par de nombreux contaminants organohalogénés, tels que les BPC et les PBDE ainsi que leurs métabolites hydroxylés. Ces contaminants partagent une structure similaire avec les hormones thyroïdiennes ce qui leur permet d'interférer avec la synthèse, la sécrétion, le transport, l'action biologique et le métabolisme de ces hormones. Par exemple, les PBDE possèdent deux cycles aromatiques halogénés avec une liaison de type éther, tout comme les hormones thyroïdiennes. Ainsi, les PBDE et leurs métabolites hydroxylés ont la capacité de se lier aux protéines de transport et aux récepteurs nucléaires des hormones thyroïdiennes (Cao *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2013; Sheikh et Beg, 2020).

L'exposition aux contaminants organohalogénés a été associée à une diminution des niveaux d'hormones thyroïdiennes circulantes chez plusieurs mammifères marins tels les ours polaires (*Ursus maritimus*) (Bourgeon *et al.*, 2017), les morses de l'Atlantique (*Odobenus rosmarus rosmarus*) (Routti *et al.*, 2019), les phoques à capuchon (*Cystophora cristata*) (Gabrielsen *et al.*, 2011), les phoques communs (*Phoca vitulina*) (Tabuchi *et al.*, 2006) et les bélugas (Villanger *et al.*, 2011b). Chez les bélugas du Svalbard, Villanger *et al.* (2011b) ont rapporté une corrélation négative entre plusieurs contaminants organohalogénés (BDE-28, -47, -99, -100, et -154, HCB, et BPC-105) et les niveaux de T₄ libre et totale ainsi que de T₃ totale. Chez les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent, Simond *et al.* (2019) ont observé que les concentrations de BPC, de p,p'-DDE, de HCB et de *trans*-nonachlore dans le gras étaient positivement corrélées avec la transcription du gène codant pour la DIO2 dans l'épiderme. De plus, les concentrations de Dec-604 CB était négativement corrélées avec la transcription du gène codant pour le récepteur thrβ.

Les hormones thyroïdiennes étant impliquées dans de nombreux processus physiologiques, la perturbation de celles-ci peut avoir divers effets néfastes sur la santé. En ce qui concerne les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent, Lair *et al.* (2016) ont émis l'hypothèse qu'une perturbation de la fonction thyroïdienne par des contaminants pourrait être impliquée dans la hausse des cas de dystocie et de mortalité des veaux. En effet, l'hypothyroïdie a été associée à des complications lors de la mise bas telles que des contractions utérines faibles, la dystocie et la mortalité périnatale chez certains mammifères (revu par Jacobson *et al.*, 2020; revu par Mee, 2008; Panciera *et al.*, 2007). De plus, des études suggèrent que

l'hypothyroïdie pourrait être associée à la mortalité périnatale chez les mammifères marins. Par exemple, chez les grands dauphins en captivité et les orques résidentes du Sud, les niveaux d'hormones thyroïdiennes durant la gestation étaient plus faibles chez les femelles dont la gestation s'était soldée par une mort périnatale que chez les femelles ayant donné naissance à un veau viable (Wasser *et al.*, 2017; West *et al.*, 2014). Il n'existe toutefois pas de données sur les niveaux d'hormones thyroïdiennes chez les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent pour étudier les relations entre les niveaux de ces hormones et l'exposition aux contaminants chez cette population.

1.2 Objectifs et hypothèses

Les bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent sont exposés à de nombreux contaminants organohalogénés dont certains ont le potentiel de perturber l'homéostasie des hormones thyroïdiennes. L'objectif de ce projet était de vérifier s'il existe des associations entre l'exposition aux contaminants organohalogénés et les niveaux d'hormones thyroïdiennes chez cette population. La matrice traditionnelle pour l'analyse des hormones est le plasma. Toutefois, il est impossible d'obtenir des échantillons de plasma chez cette population protégée pour des raisons techniques et éthiques. Pour cette raison, la biopsie de peau a été choisie comme méthode d'échantillonnage moins invasive. La biopsie de peau permet d'obtenir suffisamment de tissu pour évaluer les concentrations de contaminants chez les bélugas.

1.2.1 Objectifs spécifiques

Objectif 1. Vérifier si les hormones thyroïdiennes sont quantifiables dans la peau de béluga à l'aide d'une nouvelle méthode d'analyse par UCPL-MRM/MS.

Hypothèse : Les hormones thyroïdiennes sont détectables et quantifiables dans la peau, puisque ces hormones lipophiles sont impliquées dans le métabolisme des lipides et que la peau des bélugas contient une teneur élevée en lipides.

Objectif 2. Évaluer la relation entre les niveaux d'hormones thyroïdiennes dans les tissus (épiderme, derme externe et derme interne) et le plasma à l'aide de paires d'échantillons provenant de carcasses de bélugas de l'Arctique canadien issues de la chasse traditionnelle inuite.

Hypothèse : Les niveaux d'hormones thyroïdiennes dans la peau ne sont pas représentatifs de ceux dans le plasma à cause du métabolisme de ces hormones par les désiodases dans les cellules des tissus cibles.

Objectif 3. Évaluer la relation entre les niveaux d'hormones thyroïdiennes et les concentrations de contaminants organohalogénés dans la peau des bélugas de l'estuaire du Saint-Laurent.

Hypothèse : Les niveaux d'hormones thyroïdiennes sont négativement associés avec les concentrations de contaminants organohalogénés, en particulier avec les PBDE, dans la peau des bélugas du Saint-Laurent.

CHAPITRE 2

Associations between organohalogen contaminants and thyroid hormones in skin of the endangered St. Lawrence Estuary beluga population

Valérie Jolicoeur^a, Magali Houde^b, Robert Michaud^c, Jonathan Verreault^{a*}

^aCentre de recherche en toxicologie de l'environnement (TOXEN), Département des sciences biologiques, Université du Québec à Montréal, P.O. Box 8888, Succursale Centre-ville, Montreal, QC, H3C 3P8, Canada

^b Environment and Climate Change Canada, 105 McGill Street, Montreal, QC, H2Y 2E5, Canada

^c Group for Research and Education on Marine Mammals, Tadoussac, QC, G0T 2A0, Canada

*Corresponding author. E-mail address: verreault.jonathan@uqam.ca

2.1 Abstract

The St. Lawrence Estuary (SLE) beluga (*Delphinapterus leucas*) population is highly exposed to an array of contaminants that were identified to be a major cause to the non-recovery of this endangered and declining population. In the last decade, an increasing number of parturition-associated complications and calf mortality has been reported in this population. It was suggested that elevated exposure to certain organohalogen (e.g., polybrominated diphenyl ethers [PBDEs]) could play a role in this phenomenon by perturbing thyroid hormone levels. The objective of the present study was to investigate the associations between concentrations of organohalogen of high environmental concern and thyroid hormones in skin of adult male and female SLE belugas. Because plasma could not be collected in SLE belugas for ethical and technical reasons, skin biopsy was used as a non-invasive alternative matrix to determine organohalogen and thyroid hormone levels. Skin biopsies (n=40) collected in the fall of 2019 were analyzed for halogenated flame retardants (including PBDEs), polychlorinated biphenyls and organochlorine pesticides, as well as thyroid hormones (triiodothyronine [T_3] and thyroxine [T_4]) and their deiodinated metabolites (reverse T_3 and 3,5-diiodothyronine). Thyroid hormones were analyzed by an ultra-performance liquid chromatograph-tandem mass spectrometer (UPLC-MRM/MS). This novel method was tested with skin, blubber, and plasma samples from Canadian Arctic beluga carcasses. The comparison of paired samples of skin and plasma suggested that thyroid hormone levels in skin may not reflect those in plasma, though further studies with a larger sample size are needed to determinate the relationship between thyroid hormone levels in these two matrices. This method allowed for the identification and quantification of thyroid hormones and their deiodinated metabolites in skin of SLE belugas. Comparisons of linear models showed that the best predictor for the T_4/T_3 level ratio in SLE beluga skin was the sex of the individual. Moreover, in male belugas, T_3 concentrations in skin were positively correlated with Σ_{34} PBDE concentrations. These results suggest that thyroid hormone levels could be disrupted by PBDE exposure, but do not support the hypothesis of decreased thyroid hormone levels associated with contaminant exposure in SLE belugas. This study indicates that the use of skin biopsies is promising for studying thyroid hormones in marine mammals, particularly in vulnerable populations exposed to endocrine disruptors such as flame retardants.

Keywords: *Delphinapterus leucas*; thyroid hormone; organohalogen contaminant; endocrine disruption.

2.2 Introduction

The St. Lawrence Estuary (SLE) beluga (*Delphinapterus Leucas*) population (Quebec, Canada) lives in a habitat that is highly impacted by human activities. This population was drastically depleted by an intensive commercial hunt up until 1979 (hunting ban) and has not recovered despite the implementation of several protective measures since 1986 (DFO, 2017b; Sergeant and Hoek, 1988). Hence the population has been classified as endangered in 2014 (COSEWIC, 2014). Indeed, this cetacean population is facing important anthropogenic threats such as noise pollution, maritime traffic, reduction of prey availability, habitat loss, and contaminant exposure (COSEWIC, 2014; DFO, 2017b). Moreover, increased rates of parturition-associated complications (e.g., dystocia) and mortality of calves in the last 20 years have been suggested to contribute to the slow decline (about 1% per year) observed in this population (Lair *et al.*, 2016; Mosnier *et al.*, 2015). Exposure to endocrine disrupting chemicals was suggested by Lair *et al.* (2016) as a potential contributor to these complications and perinatal mortalities.

SLE belugas were documented to be chronically exposed to a wide variety of contaminants originating from the heavily industrialized regions of the St. Lawrence River and Great Lakes (Canada and the United States) basin where multiple sources are found (e.g., industrial and municipal wastewaters, and agricultural runoffs). SLE belugas were reported to accumulate in their blubber elevated concentrations of persistent organic pollutants (POPs) including organochlorine pesticides (OCPs), polychlorinated biphenyls (PCBs), and polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) (Lebeuf *et al.*, 2014; Simond *et al.*, 2017, 2019, 2020). PCB concentrations in SLE beluga blubber remain at concerning levels despite their ban in North America in the late 1970s (Lebeuf *et al.*, 2014; Simond *et al.*, 2017). As for PBDEs, all commercial mixtures are now listed on the Stockholm Convention on POPs since 2009 (PentaBDE and OctaBDE) and 2017 (Deca-BDE) (UNEP, 2017), and they represent the most abundant halogenated flame retardants (HFRs) quantified in SLE beluga tissues (Simond *et al.*, 2017, 2019, 2020). Replacement products for the banned PBDEs (e.g., dechlorane plus, hexabromobenzene (HBB), and pentabromoethylbenzene (PBEB)), PCBs (e.g., short-chain chlorinated paraffins), per- and polyfluoroalkyl substances as well as several emerging compounds including industrial antioxidants, and ultraviolet absorbents have also been reported in SLE beluga blubber (Barrett *et al.*, 2021; Blouin *et al.*, 2022; Simond *et al.*, 2020). Elevated blubber concentrations of POPs and other organic contaminants in SLE belugas are of concern because several of these have been linked to reproductive failure and endocrine disruption in marine mammals (reviewed by Sonne *et al.*, 2020). Indeed, some organohalogen contaminants (especially PBDEs) share structural similarities with thyroid hormones,

and thus were reported to disrupt the homeostasis of these hormones through several mechanisms in mammals (reviewed by Jugan *et al.*, 2010).

In mammals, the prohormone thyroxine (T_4) and a lesser amount of the biologically active triiodothyronine (T_3) are produced by the thyroid gland. Most of T_3 production takes place in peripheral tissues through the deiodination of T_4 by iodothyronine deiodinases. Deiodination of thyroid hormones also produces inactive metabolites such as reverse T_3 (rT_3), 3,5-diiodothyronine (3,5- T_2), and 3,3'-diiodothyronine (3,3'- T_2). In mammals, thyroid hormones play key roles in a range of physiological and developmental processes such as regulation of energetic metabolism, thermoregulation, growth, sexual development, and neurodevelopment (McNabb, 1992; Zoeller *et al.*, 2007). Therefore, altered status of thyroid hormone homeostasis can elicit adverse effects on health including reproductive failure. For example, captive bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) with failed pregnancy were reported to have significantly lower T_4 (free and total) levels in serum at all stages of pregnancy compared to those that successfully gave birth (West *et al.*, 2014). Decreased circulating thyroid hormone levels have been associated with POP exposure in several marine mammals including belugas. Specifically, in Norwegian Arctic (Svalbard) belugas, blubber concentrations of several organohalogenes including PBDEs were negatively correlated with circulating levels of total T_4 , free T_4 , and free T_3 (Villanger *et al.*, 2011b). For SLE belugas, Simond *et al.* (2019) found correlations between transcription levels of thyroid-related genes (genes coding for the thyroid hormone receptor β and deiodinase 2) and some organohalogen contaminants.

There is currently a lack of information on thyroid hormone levels in any tissues of this endangered population and how they may relate to contaminant exposure. However, assessment of hormone levels in large free-ranging marine mammals is challenging. Indeed, most common methods involve blood sampling through a capture and restraint protocol, which can be impractical, highly invasive and raise ethical concerns, especially when working with species at risk like the SLE belugas (Hunt *et al.*, 2013). Recently, the analysis of several lipophilic hormones in skin and/or blubber biopsies based on liquid chromatography with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) has been successfully validated for some cetaceans including bottlenose dolphin and humpback whales, but has been limited to steroid hormones (e.g., progesterone, testosterone, cortisol, etc.) (Boggs *et al.*, 2017; Cates *et al.*, 2019; Galligan *et al.*, 2019, 2020). Skin biopsy may represent a promising alternative matrix for the study of thyroid hormones and potential endocrine-disrupting chemical disruptors in SLE belugas since this matrix allows and has been shown to be adequate for the analysis of contaminants and other lipophilic hormones (steroid hormones).

Evaluating thyroid hormones as well as their deiodinated metabolites could provide a better understanding on their metabolism and potential mechanisms of endocrine disruption in marine mammals.

The objective of this study was to investigate the associations between concentrations of a range of organohalogens (PBDEs, OCPs, PCBs, and selected non-PBDE HFRs) and those of thyroid hormones (T_3 , T_4 and their deiodinated metabolites rT_3 , 3,5- T_2 , and 3,3- T_2) using skin biopsies of SLE belugas. A novel method for analyzing thyroid hormones in skin of belugas by ultra-performance LC-MRM/MS was tested by comparing concentrations in skin, blubber, and plasma of Canadian Arctic belugas. We hypothesized that thyroid hormone (T_3 and T_4) levels are negatively associated with concentrations of some organohalogens in SLE beluga skin in accordance with reports of decreased circulating thyroid levels associated with POP exposure in other marine mammals. This study will contribute to the validation of alternative matrices required for hormone analysis in free-ranging marine mammals from which plasma cannot be sampled as in the case of species at risk. Results from this study will further contribute to a better understanding of potential mechanisms of toxicity of organohalogens of high environmental concern on thyroid hormones, which could be involved in the unsuccessful SLE beluga population recovery.

2.3 Materials and Methods

2.3.1 Sampling

In September and October 2019, 40 skin samples were collected from the flank of adult male and female belugas in the SLE (Fig. S2.1). Skin samples were obtained using a biopsy dart projector (model MK24c, Paxarms, Domett, Canterbury, New Zealand) loaded with 0.22 caliber blank charges and sharpened stainless-steel tips (8 × 25 or 8 × 35 mm) pre-cleaned with acetone, 95% ethanol, and Virkon (Lanxess, Cologne, North Rhine-Westphalia [NRW], Germany). Skin samples were sliced into two aliquots and placed in 2 mL cryogenic tubes immediately after collection using disposable DNase and RNase-free scalpels and cleaned forceps. One of the skin sample aliquot was immersed in dimethyl sulfoxide (DMSO), and both aliquots were kept on ice in a cooler in the field. The DMSO sample was kept at 4°C until sexing analysis. The sex of the belugas was determined by polymerase chain reaction at Saint Mary's University (Halifax, NS, Canada) following methods based on Gilson *et al.* (1998). The other aliquot was transferred to a -30°C freezer in the laboratory until chemical and hormonal analyses (sections 2.3.2 and 2.3.3).

Sampling methods with SLE belugas were approved by the Institutional Animal Care Committee of the Université du Québec à Montréal (Montreal, QC, Canada) (permit no. 970), which complies with guidelines

issued by the Canadian Council on Animal Care (Ottawa, ON, Canada). Sampling was conducted under permits granted by Parks Canada (SAGMP-2019-32682) and Fisheries and Oceans Canada (DFO) (QUE-LEP-003-2019).

In addition to SLE beluga skin biopsies, samples of plasma, inner blubber, outer blubber, and skin from five Canadian Arctic belugas were provided by DFO (Dr. Lisa Loseto; Winnipeg, MB, Canada). These samples were freshly collected as part of the Inuvialuit subsistence hunt during summer 2018 at Hendrickson Island (Eastern Beaufort Sea, NWT, Canada). These samples were used to compare hormone levels these different matrices to assess the relevance of using skin as an alternative matrix to plasma for thyroid hormones. The different layers of blubber and skin were also used to investigate how thyroid hormones distribute in these tissues (i.e., stratification), and if skin biopsies can be used instead of blubber biopsies for thyroid hormone quantification.

2.3.2 Thyroid hormone analysis

Thyroid hormones (T_3 , T_4 , rT_3 , $3,5-T_2$, and $3,3'-T_2$) were analyzed in SLE beluga skin and Canadian Arctic beluga skin, inner blubber, outer blubber, and plasma samples at the University of Victoria Genome BC Proteomics Centre (Victoria, BC, Canada).

An internal standard solution was prepared by adding $^{13}C_6-T_3$ hydrochloride (Sigma-Aldrich, St-Louis, MO, USA) and $^{13}C_6-T_4$ (Sigma-Aldrich) to a 20% methanol-10 mM NaOH solution. Standard solutions of each hormone (T_3 , T_4 , Sigma-Aldrich; rT_3 , $3,5-T_2$, $3,3'-T_2$, Toronto Research Chemicals, Toronto, ON, Canada) were prepared in the internal standard solution by serial dilution ($2,5 \times 10^{-6}$ to $1 \mu M$).

Minced skin and blubber aliquots (10-100 mg) were transferred to 2 mL Eppendorf tubes. A skin pooled sample and a blubber pooled sample were also prepared similarly and used for quality control along the entire analytical procedure. An anti-oxidation buffer (Dithiothreitol 5 mg/mL in water and ascorbic acid 5 mg/mL in water) and the internal standard solution were added to each aliquot (1.5 and 0.5 μL /mg of tissue, respectively). The samples were homogenized with a MM 400 mixer mill (Retsch, Hann, NRW, Germany) and two 4 mm metal balls at a shaking frequency of 30 Hz for one min and cooled down on ice between each homogenization. This procedure was repeated five times. Methanol was added to the samples (8 μL /mg of tissue), which were homogenized once again and sonicated in an ice-water ultrasonic

bath for five min. The samples were then centrifuged (21,000 x *g*, 5°C, 10 min) and 100 uL of the clear supernatant of each sample was collected and mixed with 0.9 mL of NaOH (10 mM).

Plasma aliquots (50 µL) and a pooled plasma sample used for quality control were mixed with 50 µL of an anti-oxidation buffer (see above) and 100 µL of the internal standard solution. The plasma solution was mixed with a vortex, 800 µL of methanol was added to the solution, and the mixture was sonicated in an ice-water ultrasonic bath for 5 min before centrifugation (21,000 x *g*, 10 min). The supernatant (300 µL) was collected and mixed with 2.7 mL of NaOH (10 mM).

The skin, blubber and plasma samples were cleaned up using a polymeric reversed-phase C18 solid-phase extraction cartridge (200 mg/3 mL, Strata, Phenomenex, Torrance, CA, USA) preconditioned with 10 mM NaOH, and activated with 2 ml of methanol. The loading solution was percolated through the cartridge under a positive pressure and the flow-through fraction was discarded. Analytes were eluted with 2 mL of 95% methanol-10 mM NaOH solution. The collected fraction was then dried in a speed-vacuum concentrator. The residues from the skin and blubber samples were diluted in 50 µL of a 20% methanol-10 mM NaOH solution. The residues from the plasma samples were diluted in 30 µL of a 20% methanol-10 mM NaOH solution.

Aliquots (10 µL) of samples were injected onto an Acquity UPLC system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) coupled to a QTRAP 6500+ mass spectrometer (Sciex, Framingham, MA, USA) operating in positive ion detection mode. Separation of analytes was performed on a BEH C18 column (2.1 × 100 mm × 1.7 µm, Waters Corporation) at a temperature of 45°C and a flow rate of 0.3 mL/min. A solution of 0.2% formic acid in water was used as the mobile phase and 0.2% formic acid in acetonitrile was used as solvent B for binary-solvent gradient elution (20% to 80% B in 10 min). The quality control pooled samples were injected at the beginning, middle, and the end of UPLC-MRM/MS batch runs to ensure accuracy and repeatability of the method.

Concentrations of thyroid hormones in samples were obtained by interpolating the linear calibration curve of thyroid hormone standard solutions with the analyte-to-internal standard signal ratio. Method limits of detection (MLODs) and quantification (MLOQs) can be found in Appendix S2.1 and Table S2.1. The coefficient of variation (standard deviation divided by the mean) of the quality control sample injections (4 for blubber and skin, 3 for plasma) were as follow: 3,3'-T₂: 19%; 3,5-T₂: 3%; rT₃: 8%; T₃: 5%; and T₄: 5%.

2.3.3 Chemical analysis

SLE beluga skin samples were extracted, cleaned-up and analyzed for 35 PBDEs and 12 other HFRs (see Table S2.6, and Table S2.7) at Université du Québec à Montréal (Montreal, QC, Canada); 41 PCBs and 31 OCPs (see Table S2.4 and Table S2.5) were analyzed at AGAT laboratories (Montreal, QC, Canada). Methods for extraction, clean-up and analysis of SLE beluga skin samples have been described by Simond *et al.* (2017) and were applied with minor modifications. Briefly, skin sample aliquots (40-50 mg) were homogenized with diatomaceous earth (J.T. Baker, Phillipsburg, NJ, USA) and spiked with 100 µL of a 200 ng/mL internal standard solution (BDE-30, BDE-156, ¹³C-BDE-209, and ¹³C-*anti*-DP) for HFRs, 4 µL of a 100 ng/mL performance standard solution (CB-16, -65, -166, and -200) and 20 µL of a 1 µg/mL performance standard solution (2,4,5,6-Tetrachloro-*m*-xylene) for OCPs. Sample extraction was carried out using a pressurized liquid extraction system (Fluid Management Systems, Billerica, MA, USA) using dichloromethane and *n*-hexanes (50:50, volume ratio). The extracted samples were further cleaned-up using an acid-basic-neutral silica column followed by a neutral alumina column (Fluid Management Systems), both PBDE-free. The lipid content of each sample was determined gravimetrically. PBDEs and other HFRs were identified and quantified using a gas chromatograph (GC) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (MS) (Agilent Technologies 5975C Series, Palo Alto, CA, USA) operating in electron capture negative ionization mode (ECNI). The analytical column was a fused silica DB-5 HT capillary column (15 m × 0.25 mm × 0.10 µm; J & W Scientific, Brockville, ON, Canada).

The final cleaned skin sample extracts were subsequently sent for PCB and OCP analyses. PCBs and OCPs were identified and quantified using a 6890N GC coupled to a 5975B inert mass selective detector (MSD), while a 7890A GC coupled to a 5975C MSD (Agilent Technologies) was used for OCPs. Both GC/MSD were equipped with a fused silica RXI-5SIL MS capillary column (30 m × 0.25 mm × 0.25 µm) (Restek Corporation, Bellefonte, PA, USA) and were operated in selected ion monitoring mode (SIM).

Quality control and assurance procedures included the analysis of procedural method blanks and standard reference material (NIST 1945 Whale Blubber, Gaithersburg, MD, USA) for each batch of ten samples. The mean percentage of variation from certified concentrations in standard reference material was 7% for PBDEs (4 congeners), 27% for PCBs (26 congeners) and 49% for OCPs (3 compounds). We excluded CB-209 and *p,p'*-DDE from further analyses because of high variations between measured concentrations and certified values in reference material. The recoveries (mean ± SD) of internal standards were as follows: BDE-30: 99 ± 6%, BDE-156: 95% ± 8, ¹³C-BDE-209: 36 ± 9%, ¹³C-*anti*-DP: 97 ± 9%. We excluded BDE-209

from further analyses. The recoveries (mean \pm SD) of performance standards for PCBs and OCPs were: CB-16: 86 \pm 17%, CB-65: 96 \pm 19%, CB-166: 96 \pm 18%, CB-200: 99 \pm 17%, 2,4,5,6-Tetrachloro-m-xylene: 81 \pm 23%. Concentrations of PBDEs and other HFRs were inherently recovery-corrected since quantification was based on an internal standard method, while concentrations of PCBs and OCPs were not recovery-corrected. Analytes that were detected in blanks at concentrations exceeding 5% of the mean sample concentrations were blank-corrected in all samples (i.e., BDE-10, -28/Polybutylene terephthalate [PBT], -66, and -77, PBEB, and HBB). Analyte concentrations are reported in ng/g wet weight because no correlations were found between the lipid content of the samples and the analyte concentrations. MLODs and MLOQs are listed in Table S2.4, Table S2.5, Table S2.6, and Table S2.7.

2.3.4 Statistical analysis

Values below MLODs or MLOQs for organohalogenes were assigned a concentration of zero and individual organohalogen compounds or congeners were summed into their respective chemical classes (Σ_{40} PCB, Σ_{29} OCPs, Σ_{34} PBDEs, and Σ_{12} other HFRs). Non-detects for thyroid hormones were replaced with a value computed using NDexpo (Lavoué, 2013) before generating the mean. This web application uses a method based on the robust regression on order statistics approach to replace censored data with values estimated assuming a log-normal distribution. Only the organohalogen classes and individual thyroid hormones (T_3 , T_4 , rT_3 , 3,5- T_2 , 3,3'- T_2) that were detected in more than 65% of the samples were included in statistical analyses. The normality of the data was verified using the Shapiro-Wilk test. Variables were log-transformed when needed to meet this assumption. Homogeneity of variance was tested using Shapiro-Wilk and Bartlett's test. Differences in variable means between SLE beluga males and females were tested using the Student's T tests for normally distributed data, otherwise the non-parametric Wilcoxon signed-rank test was used.

To investigate the potential effects of contaminants on thyroid hormone levels, we built 16 multiple linear regression candidate models explaining thyroid hormone level variations in SLE beluga skin based on a priori hypotheses (Table S2.9). A null model (intercept-only) was included to assess the relative support in favor of models compared to the null model. The homoscedasticity and normality of residuals were verified with the most complex models. Multicollinearity was assessed for each predictor using the variance inflation factor (VIF) score (Table S2.10). Variables with a VIF higher than 2.5 were not included in the same model. Candidate models were compared using the Akaike information criterion corrected for small sample sizes (AICc) using the AICcmodavg package (Mazerolle, 2020). Correlations between

organohalogen and thyroid hormone concentrations were investigated using the Spearman's rank test. All statistical analyses were performed in R 4.1.1 (R Core Team, 2021).

2.4 Results

2.4.1 Thyroid hormone concentrations in Canadian Arctic belugas

Thyroid hormones and their deiodinated products (T_3 , T_4 , rT_3 , and $3,5-T_2$) were quantified in plasma, skin, outer blubber, and inner blubber of the five Canadian Arctic belugas, while $3,3'-T_2$ was not detected in any samples. No statistical analyses were performed due to low sample size. Expectedly, plasma showed the highest T_4 levels compared to the other matrices (Table S2.2). Concentrations of T_3 in skin (0.83 ± 0.06 pmol/g ww; mean \pm SEM) were approximately 3-4 times higher than those in outer blubber (0.27 ± 0.04 pmol/g ww) and inner blubber (0.22 ± 0.02 pmol/g ww). Concentrations of T_4 in outer blubber and inner blubber were within a similar range as those determined in skin (2.90-12 pmol/g ww; Fig. S2.3). The T_4/T_3 level ratios was higher in plasma than in blubber (~4-fold) and skin (~12-fold) (Table S2.3). There were no apparent relationships between skin and plasma levels of T_3 , T_4 , and the T_4/T_3 level ratios though no statistical analyses were performed (Fig. S2.5, Fig. S2.6, and Fig. S2.7).

2.4.2 Thyroid hormone concentrations in SLE belugas

The T_3 , T_4 and their deiodinated metabolites $3,5-T_2$ and rT_3 were all successfully quantified in more than 65% of the SLE beluga skin samples (100, 100, 85, and 70% of belugas, respectively), while $3,3'-T_2$ was only quantified in a few samples (25% of belugas). The most abundant thyroid hormones in SLE beluga skin was T_4 (10.2 ± 0.73 pmol/g ww; mean \pm SEM) followed by T_3 (1.43 ± 0.20 pmol/g ww), while $3,5-T_2$ (0.34 ± 0.05 pmol/g ww) and rT_3 (0.24 ± 0.04 pmol/g ww) were measured at much lower levels (respectively 30 and 43-fold lower than T_4). The skin T_3 and T_4 levels strongly correlated with their respective deiodinated products, namely $3,5-T_2$ (Spearman's $\rho = 0.92$, $p < 0.001$) and rT_3 (Spearman's $\rho = 0.72$, $p < 0.001$). There was also a moderate negative correlation between T_3 and rT_3 (Spearman's $\rho = -0.42$, $p = 0.007$).

There were no differences between males and females for concentrations of thyroid hormones and their metabolites (Table S2.8). The T_4/T_3 level ratios were significantly lower (~2-fold) in SLE beluga females than males (9.97 ± 2.50 and 20.15 ± 6.39 , respectively; $t = -2.49$, $p = 0.02$).

Table 2.1. Mean concentrations (\pm SEM and range; pmol/g ww) of thyroid hormones and their deiodinated metabolites in biopsied skin of male and female SLE beluga.

	Male belugas <i>n</i> = 20	Female belugas <i>n</i> = 20
T ₃	0.99 \pm 0.15 (0.07 – 2.85)	1.86 \pm 0.34 (0.29 – 6.10)
T ₄	10.5 \pm 0.71 (4.85 – 15.2)	9.83 \pm 1.28 (1.09 – 28.7)
rT ₃	0.29 \pm 0.05 (<MLOQ – 0.76)	0.19 \pm 0.04 (<MLOQ – 0.68)
3,5-T ₂	0.22 \pm 0.05 (<MLOQ – 0.64)	0.46 \pm 0.09 (<MLOQ – 1.39)

2.4.3 Organohalogen contaminant concentrations in SLE belugas

The most abundant organohalogen classes were Σ_{40} PCB (257 \pm 28 ng/g ww) and Σ_{29} OCP (46 \pm 4 ng/g ww), accounting for 81% and 14% of the sum of all organohalogens, respectively, while Σ_{34} PBDE (15 \pm 1.36 ng/g ww) accounted for 5%. Other HFRs (HBB and PBEB) contributed to less than 1% to this sum and were only detected in 60% of the SLE beluga skin samples (Table S2.7). Therefore, they were not included in subsequent statistical analyses. The most abundant congeners for PCBs and PBDEs were CB-153 (17% of Σ_{40} PCB) and BDE-47 (60% of Σ_{34} PBDE), respectively (Table S2.4, Table S2.5). Only two OCPs were quantified; HCB and trans-nonachlor (39% and 61% of the total detection, respectively; Table S2.6).

Table 2.2. Mean concentrations (\pm SEM and range; ng/g ww) of organohalogen contaminants in biopsied skin of male and female SLE beluga.

	Male belugas <i>n</i> = 20	Female belugas <i>n</i> = 20
Skin lipid content (%)	8.12 \pm 0.91 (1.90 – 16.6)	8.48 \pm 0.99 (2.94 – 16.6)
Σ_{40} PCB ^a	265 \pm 38.8 (0-613)	250 \pm 46.5 (<MLOQ – 681)
Σ_{29} OCP ^b	44.6 \pm 5.2 (5 – 95)	46.7 \pm 5.9 (8 – 95)
Σ_{34} PBDE ^c	15.9 \pm 2.02 (2.40 – 33.7)	13.7 \pm 1.83 (1.92 – 31.0)

^a Sum of CB-17, -18, -28, -31, -44, -49, -52, -70, -74, -87, -95, -99, -101, -105, -110, -118, -128, -132, -138, -149, -151, -153, -158, -169, -170, -171, -177, -180, -183, -187, -191, -199, -206, and -208. Congeners that were not detected in any samples: CB-33, -82, -156, -195, -194, and -205.

^b Sum of HCB and trans-nonachlor. Pesticides that were not detected in any samples: alachlor, aldrin, α - and γ -chlordane, oxychlordane, dimethyl tetrachloroterephthalate, dieldrin, α - and β -endosulfan, endosulfan sulfate, endrin, endrin aldehyde, endrin ketone, heptachlor, heptachlor epoxyde, α -, β -, γ - and δ -hexachlorocyclohexane, imidacloprid, methoxychlor, mirex, octachlorostyrene, *p,p'*-dichlorodiphenyldichloroethane, *p,p'*-dichlorodiphenyltrichloroethane, *trans*- and *cis*-permethrin.

^c Sum of BDE-7, -10, -17, -28/PBT, -47, -49, -66, -77, -85, -99, -100, -126, -154/2,2',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl [BB-153], -153, and -203. Congeners that were not detected in any samples: BDE-15, -71, -119, -138, -139, -140, -171, -180, -183, -184, -191, -196, -197, -201 -204, -205, -206, -207, and -208.

2.4.4 Associations between thyroid hormone and organohalogen contaminant concentrations

The top-ranked models explaining the concentrations of T_3 , rT_3 , 3,5- T_2 , and T_4/T_3 level ratio all included the single variable sex. These models obtained a weak support (AICc weight: 14-26%). The second-ranked model for T_3 , 3,5- T_2 , and T_4/T_3 included both Σ_{34} PBDE and sex (AICc weight: 11-16%). This suggests that the predictors sex and Σ_{34} PBDE were weakly associated with levels of these thyroid hormones and deiodinated metabolites in SLE beluga skin. However, the intercept-only model was within an AICc score of 2 from the top ranked models for T_3 , rT_3 , and 3,5- T_2 . This indicates that there was no substantial evidence that top-ranked models were better at explaining thyroid hormone level variations than the null model. The intercept-only model ranked first for T_4 concentrations.

Table 2.3. Highest ranked linear models ($\Delta\text{AICc} < 2$) explaining thyroid hormone levels in SLE beluga skin ($n = 40$).

T₃	K	AICc	ΔAICc	w
T ₃ ~ Sex	3	106.8	0.00	0.19
T ₃ ~ $\Sigma_{34}\text{PBDE} + \text{Sex}$	4	107.1	0.24	0.17
T ₃ ~ Intercept	2	108.1	1.28	0.10
T ₃ ~ $\Sigma_{29}\text{OCP} + \text{Sex}$	4	108.7	1.92	0.07
T₄				
T ₄ ~ Intercept	2	64.3	0.00	0.24
T ₄ ~ Sex	3	65.4	1.10	0.14
T ₄ ~ $\Sigma_{29}\text{OCP}$	3	66.1	1.79	0.10
T ₄ ~ $\Sigma_{34}\text{PBDE}$	3	66.3	1.97	0.09
rT₃				
rT ₃ ~ Sex	3	126.6	0.00	0.23
rT ₃ ~ Intercept only	2	127.0	0.36	0.19
3,5-T₂				
3,5-T ₂ ~ Sex	3	133.8	0.00	0.17
3,5-T ₂ ~ $\Sigma_{34}\text{PBDE} + \text{Sex}$	4	134.4	0.65	0.13
3,5-T ₂ ~ Intercept only	2	134.7	0.99	0.11
3,5-T ₂ ~ $\Sigma_{115}\text{OHC}$	4	134.9	1.19	0.10
3,5-T ₂ ~ $\Sigma_{40}\text{PCB} + \text{Sex}$	4	135.0	1.20	0.10
3,5-T ₂ ~ $\Sigma_{29}\text{OCP} + \text{Sex}$	4	135.4	1.63	0.08
T₄/T₃				
T ₄ /T ₃ ~ Sex	3	108.7	0.00	0.31
T ₄ /T ₃ ~ $\Sigma_{34}\text{PBDE} + \text{Sex}$	4	109.8	1.10	0.18

K: Number of estimated parameters

AICc: Second order Akaike information criterion

ΔAICc : Difference in AICc score between the current model and the top-ranked model

w: Akaike weight

$\Sigma_{115}\text{OHC}$: Sum of all PBDEs and other HFRs, PCBs, and OCPs.

Because the AICc suggested a weak influence of sex on T₃ levels, correlations were tested for males and females separately. We found a moderate positive correlation between T₃ concentrations and those of

Σ_{34} PBDE (Spearman's $\rho = 0.48$, $p = 0.03$; Figure 2.1) in males only. No other correlations were found between any organohalogenes and thyroid hormones (Fig. S2.9).

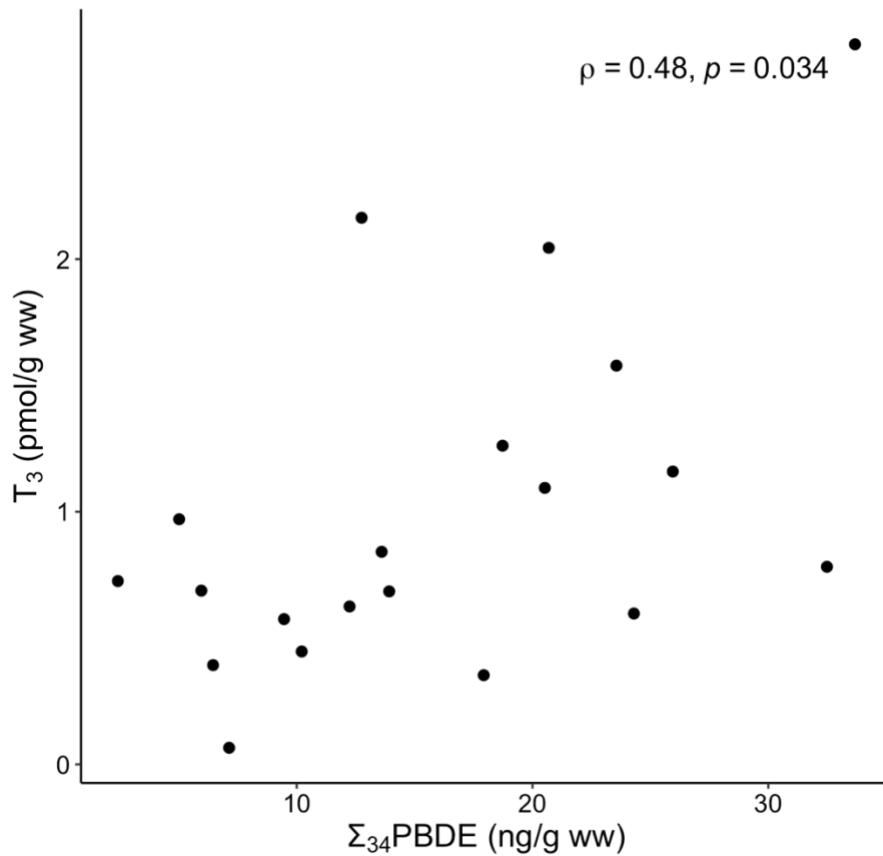


Figure 2.1. Spearman's correlation between T₃ and Σ_{34} PBDE concentrations in skin of male SLE belugas ($n = 20$).

2.5 Discussion

The present study showed that thyroid hormones (T₃ and T₄) and their deiodinated products (rT₃ and 3,5-T₂) can be isolated from a minimal amount of skin (biopsy) sample (minimum: 14 mg) collected from free-ranging SLE belugas and quantified using UPLC-MRM/MS. Compared to immunoassays that are typically used for hormone analysis, methods based on liquid-chromatography yields greater sensitivity, specificity, and accuracy (Cross et Hornshaw, 2016; Taylor *et al.*, 2015). The T₃, T₄, and rT₃ have previously been quantified in plasma and serum of other beluga populations (Norwegian Arctic, Alaska, and captive belugas) (Flower *et al.*, 2015; Hansen *et al.*, 2017). However, to our knowledge, this is the first report of quantification of these hormones in skin biopsies of any cetaceans.

2.5.1 Skin as an alternative matrix for thyroid hormone determination

Blood (plasma, serum) samples have traditionally been used to determine thyroid hormone levels in wildlife species. However, for the analysis of hormone levels in free-ranging marine mammals, especially for species or populations at risk, ethical and technical considerations have led to the development of minimally invasive sampling methods. Hormone-related studies in cetaceans have mainly focused on steroid hormones to assess stress response (cortisol) and reproductive status (estrogens, androgens, and progestogens), while thyroid hormone levels have been rarely studied in cetaceans despite their important role as biomarkers of nutritional stress and endocrine disruption.

Fecal thyroid hormone metabolites (thyroid hormones altered by gut bacteria and/or sulfation and glucuronidation) have been measured in scat samples collected from the sea surface originating from North Pacific gray whales (*Eschrichtius robustus*) (Lemos *et al.*, 2020), North Atlantic humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) (Hunt *et al.*, 2019), and southern resident killer whales (*Orcinus orca*) (Ayres *et al.*, 2012; Wasser *et al.*, 2017). They have also been quantified in respiratory samples (blow) collected from North Atlantic right whales (*Eubalaena glacialis*) (Hunt *et al.*, 2014). Blubber biopsy samples have also been used for steroid hormone quantification (reviewed by Amaral, 2010; reviewed by Hunt *et al.*, 2013). For example, blubber concentrations of progesterone were used to confirm pregnancy in humpback whales (Pallin *et al.*, 2018), minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*) (Mansour *et al.*, 2002) and some *Delphinidae* species (Galligan *et al.*, 2020; Kellar *et al.*, 2006; Pérez *et al.*, 2011). Several steroid hormones (e.g., cortisol, aldosterone, corticosterone, testosterone, dehydroepiandrosterone, and progesterone) were also quantified in epidermis samples of humpback whales (Cates *et al.*, 2019), bottlenose dolphins (Bechshoft *et al.*, 2020), and harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) (Bechshoft *et al.*, 2015). However, there is to our knowledge no report of thyroid hormone levels in skin or blubber of any cetaceans. Beluga skin is a promising matrix for the study of lipophilic hormones such as thyroid hormones. Indeed, beluga skin contains high ratio of lipids and thyroid hormones are involved in lipid metabolism. Thyroid hormones are also involved in skin homeostasis and proliferation of epidermal cells in certain mammals (e.g., humans and rats) (Mancino *et al.*, 2021; Safer *et al.*, 2004) and are suspected to be involved in the process of molting in certain populations of belugas (St. Aubin *et al.*, 1990).

In the present study, comparisons of thyroid hormone levels between different matrices (plasma, skin, outer blubber, and inner blubber) collected from Canadian Arctic belugas showed that thyroid hormones can be quantified in blubber and skin. Specifically, concentrations of T₃, T₄ and rT₃ in Canadian Arctic beluga

blubber were lower or within the same range compared to those in skin (no statistical analyses could be performed due to low sample size). Moreover, concentrations of T_3 , T_4 and rT_3 were comparable between outer and inner blubber. This suggests no clear influence of blubber depth on thyroid hormone concentrations, although further research should be conducted with a larger sample size to confirm this. This is in contrast with cortisol, a lipophilic glucocorticoid for which the concentrations have been reported to increase with increasing blubber depth in another study on Canadian Arctic belugas (Trana *et al.*, 2015). The authors suggested that this could be due to stratification in blubber which presents differences in metabolic activity, structure, and composition with depth.

Hormone levels in skin and blubber from Canadian Arctic belugas in the present study were not related with those in plasma. Also, concentrations of T_4 and T_4/T_3 level ratios were markedly higher in plasma than in skin and blubber. This was expected as most of T_4 conversion to T_3 and further deiodination takes place in cells of peripheral tissues. Thus, hormone levels in skin should be interpreted with caution as they do not represent the circulating thyroid status of the animal. Further investigation is needed to determine the relationships between thyroid hormone levels in tissues and plasma, as the sample size of this study was not large enough to draw firm conclusions. However, concentrations of thyroid hormones and their deiodinated metabolites in skin may provide useful information on potential perturbations of thyroid hormone levels in the skin.

2.5.2 Thyroid hormones in SLE beluga skin

Previous studies on thyroid hormones in belugas have reported T_3 , T_4 , and rT_3 levels in serum and plasma, thus complicating comparisons with those measured in the present study (T_3 , T_4 , rT_3 and 3,5- T_2) in skin biopsies of SLE belugas. The most abundant hormone in SLE beluga skin was expectedly T_4 . This reflects the fact that thyroid hormones are synthesized and released into the circulation primarily in the form of T_4 in mammals. Indeed, mean circulating T_4/T_3 ratios between 43.1 and 117 were reported in various beluga populations (reviewed by Hansen *et al.*, 2017). The high sensitivity of the UPLC-MRM/MS also allowed for the quantification of 3,5- T_2 , which was to our knowledge reported in belugas for the first time. This metabolite of thyroid hormones is weakly bioactive and was reported to have a role in energy metabolism in rodents (Senese *et al.*, 2018). There were no significant differences between male and female SLE belugas for T_3 , T_4 , rT_3 , nor 3,5- T_2 levels. However, the T_4/T_3 level ratio was significantly lower in females compared to males. Contradictory information has been reported regarding the influence of sex on thyroid hormone levels in belugas. As such, Hansen (2017) and Villanger *et al.* (2011b) reported no

difference between males and females for concentrations of T_3 , T_4 and rT_3 in serum of belugas from the Norwegian Arctic (Svalbard), although the authors suggested that this lack of difference might be due to the low sample size. Conversely, significantly greater concentrations of circulating T_4 were measured in adult male belugas from the Canadian Arctic (St. Aubin *et al.*, 2001) and from captivity (Flower *et al.*, 2015) compared to females.

2.5.3 Organohalogen levels in SLE belugas

Organohalogen concentrations in SLE beluga tissues previously reported by Simond *et al.* (2019, 2020) were measured in the innermost layer of skin/blubber biopsies, which consists of dermis and occasionally some blubber. By comparison, organohalogens in the present study were measured in the epidermis and dermis, thus complicating comparisons between studies. Indeed, organohalogen concentrations may vary with depth in beluga skin and blubber tissues due to stratification (Krahn *et al.*, 2004). Concentrations of PCBs and PBDEs determined in present SLE beluga males were approximately 5- and 9-fold lower, respectively, than those reported by Simond *et al.* (2020) in dermis/blubber. Nevertheless, consistently with findings reported by Simond *et al.* (2020) for dermis/blubber, Σ_{40} PCBs measured in the present study were the most abundant contaminant class in SLE beluga skin despite their ban in Canada in the late 1970s and their listing in the Stockholm Convention on POPs in 2001. Moreover, the most abundant congener for PBDEs was BDE-47, a major component of the commercial Penta-BDE mixture, and for PCBs it was CB-153, a major component of PCB technical mixtures (e.g., Clophen A60), respectively. These highly bioaccumulative congeners were also previously reported as consistently dominant in SLE beluga blubber (Bernier-Graveline *et al.*, 2021; Simond *et al.*, 2019).

Concentrations of POPs are regularly found to differ between sexes of marine mammal due to maternal transfer through lactation and the placenta, as also documented in belugas (Cadieux *et al.*, 2016). However, no difference was found for any contaminant concentrations between present SLE male and female belugas. Bernier-Graveline *et al.* (2021) similarly found no difference between males and females in concentrations of Σ_{35} PBDE in blubber of SLE beluga carcasses recovered between 1998 and 2016, whereas Σ_{40} PCB and Σ_{25} OCP concentrations were significantly higher in males compared to females. This lack of differences in POP concentrations in skin between males and females in the present study could be partially explained by the fact that sampling of females observed with a calf (and likely lactating) was avoided for ethical reasons. Also, contaminant concentrations in belugas are known to vary with age,

which was not controlled for as a robust method for aging free-ranging belugas has not been validated (Lebeuf *et al.*, 2014; Simond *et al.*, 2017).

2.5.4 Associations between organohalogenes and thyroid hormones

Concentrations of T₃ in skin were positively correlated with those of Σ34PBDE in male SLE belugas, while no such correlation was observed in females. No other correlations between contaminant classes and thyroid hormones were found. These results suggest that PBDEs could potentially interfere with the regulation of thyroid hormones in skin of SLE belugas. Studies investigating the associations between thyroid hormone levels and organohalogen exposure in mammals have used matrices that differ from the present study (e.g., plasma and blubber) and have reported conflicting results. For example, a few studies on marine mammals have reported positive associations between tissue contaminant concentrations and thyroid hormone levels. Specifically, in harbor seals (*Phoca vitulina*) sampled in the United Kingdom, circulating levels of total T₃ were found to positively correlate with blubber concentrations of PCBs and PBDEs (Hall et Thomas, 2007). In polar bears (*Ursus maritimus*) from East Greenland, both positive and negative correlations were found between adipose tissue concentrations of organohalogenes (PCBs, PBDEs, and OCPs) and circulating levels of thyroid hormones, and these associations differed between sexes and age classes (Villanger *et al.*, 2011a). As such, in subadults and females without cubs, BDE-100 and -99 were among the strongest determinants for thyroid hormone level variations and were positively correlated with total T₃. Age was also outlined as a confounding variable in a study on Faroese pilot whales, in which positive correlations between plasma concentrations of several organohalogenes (PCBs, p,p'-DDE, *trans*-nonachlor, and BDE-47) and thyroid hormones (total T₃ and T₄, and free T₃) in the youngest juveniles were reported (Hoydal *et al.*, 2016). However, our results are in contrast with several reports of negative associations between thyroid hormones and organohalogen concentrations in marine mammals such as polar bears from the Norwegian Arctic (Bourgeon *et al.*, 2017), hooded seals (*Cystophora cristata*) from the Greenland Sea (Gabrielsen *et al.*, 2011), harbor seals from the coast of British Columbia (Canada) and northern Washington State (USA) (Tabuchi *et al.*, 2006), and belugas from the Norwegian Arctic (Villanger *et al.*, 2011b). Specifically, in the study by Villanger *et al.* (2011b), blubber concentrations of PBDEs (BDE-28, -47, -99, -100, and -154), CB-105, and HCB were negatively correlated with circulating levels of total T₄, free T₄, and free T₃ in Arctic belugas from Svalbard. The use of skin as an alternative matrix to plasma could also partly explain why the results of the present study differ from those of previous studies. Indeed, thyroid hormone levels in skin may not reflect those in plasma as these hormones are metabolized in

target cells. Moreover, the potential endocrine disruption mechanism may differ between these two matrices.

PBDEs and several other organohalogenes can disrupt thyroid hormone signaling and homeostasis in many target sites because of their structural similarities with these hormones. For instance, PBDEs and their hydroxylated metabolites (OH-PBDEs) were shown to bind to the transport proteins thyroxine-binding globulin and transthyretin as well as thyroid hormone nuclear receptors (Cao *et al.*, 2010; Ren *et al.*, 2013; Sheikh et Beg, 2020). Moreover, PBDE exposure can alter the synthesis of thyroid hormones. For example, exposure to BDE-209 (500 mg/kg body weight) in rats was associated with damage of the thyroid gland, reduced synthesis of thyroid hormones and a downregulation of several genes (e.g., thyroid peroxidase, and sodium/iodide symporter) involved in the synthesis of these hormones (Wang *et al.*, 2019).

Exposure to selected organohalogenes have been associated with changes in mRNA levels of other thyroid-related genes. In SLE beluga skin biopsies, Simond *et al.* (2017) found a negative correlation between transcription levels of the gene encoding for the thyroid hormone receptor beta in epidermis and concentrations of Dechlorane-604 component B (a debrominated product of the flame retardant Dechlorane-604) in dermis/blubber. These authors further reported positive correlations between transcription levels of the gene encoding for the deiodinase type 2 in epidermis and certain organochlorines (PCBs, p,p'-DDE, *trans*-nonachlor, and HCB) in dermis/blubber.

PBDEs and other organohalogenes were also reported to disrupt the metabolism of thyroid hormones by modulating the activity of certain enzymes such as sulfotransferases, and glucuronosyltransferases, which are involved in the clearance of thyroid hormones in the liver as well as deiodinases that metabolize thyroid hormones in target cells (Butt et Stapleton, 2013; Roberts *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2002). As such, *in vitro* studies showed that the activity of deiodinase type 2, which is involved in the deiodination of T₄ to T₃, was reduced by 50% when exposed to hydroxylated metabolites of BDE-47 and -99 at doses of 1-5 μM in cultured human glial cells (Roberts *et al.*, 2015). Contrastingly, in free-ranging polar bears, concentrations of PBDEs, PCBs and their hydroxylated metabolites in plasma were generally positively associated with deiodinase type 1 and 2 activity in muscle, liver, and kidney tissues (Gabrielsen *et al.*, 2015). Since the deiodinases type 1 and 2 catalyze the transformation of T₄ to T₃, the positive association observed between PBDE concentrations and T₃ levels in present SLE beluga males could potentially stem, at least in part, from the perturbation of deiodinase activity.

In contrast to males, there was no correlation between PBDE concentrations and T_3 in females. This difference may be due to confounding factors affecting sexes differently, such as potential interactions between sex and thyroid hormones. Indeed, there are evidence of crosstalk reported between thyroid hormone signaling and reproductive hormone systems in mammals (Thambirajah *et al.*, 2022). The metabolic and biotransformation capacity towards PBDE and other organohalogenes may also differ between sexes in belugas (McKinney *et al.*, 2004), although further research is needed to explore this hypothesis.

The assessment of endocrine disruption in wildlife is challenging because of the potential roles of several confounding factors. In belugas, thyroid hormone levels may fluctuate in response to several biological and environmental variables including age, reproductive and nutritional status, seasonal change, and water temperature (Flower *et al.*, 2015). For example, in captive and free-ranging belugas (Eastern Chukchi Sea and Bristol Bay, coast of Alaska, USA), juveniles exhibited higher serum total T_3 and T_4 levels than adults (Flower *et al.*, 2015). In the present study, only adult belugas were sampled, although their age was unknown. Age can also influence organohalogen concentrations in tissues of belugas such that older adult belugas generally accumulate higher concentrations of several OCPs (e.g., DDT, HCB, and Mirex) and PCBs (Cadieux *et al.*, 2016; Lebeuf *et al.*, 2014; Martineau *et al.*, 1987; Villanger *et al.*, 2011b). However, no relationship between age and PBDE concentrations in blubber of SLE beluga carcasses has been reported by Lebeuf *et al.* (2014), whereas a positive correlation was found by Simond *et al.* (2017). Moreover, foraging habitat use strategy may also influence exposure to contaminants. In SLE belugas, Simond *et al.* (2020) observed different profiles of contaminants between belugas sampled upstream and downstream of the Saguenay River mouth in the SLE. Specifically, belugas sampled upstream exhibited significantly greater concentrations of short-chain chlorinated paraffins and lower concentrations of PBEB in blubber biopsy. The authors also noted differences in fatty acid concentrations in blubber between belugas sampled in these two areas, which suggested a differences in diet composition associated with habitat use. Considering these results, the authors suggested that lipid metabolism may be a target for disruption by organohalogenes as several associations between concentrations of short-chain chlorinated paraffins and selected fatty acids were reported. Because thyroid hormones are involved in lipid metabolism (synthesis, mobilization, and degradation of lipids), the assessment of lipid metabolism in conjunction with thyroid hormone levels and organohalogen exposure could provide a better understanding of potential endpoints of endocrine disruption in belugas.

Thyroid hormones were also reported to be useful biomarkers of nutritional status in marine mammals. For example, Wasser *et al.* (2017) observed that fecal T₃ concentrations decreased in response to nutritional stress in Southern Resident killer whales, a trend that has been observed in other mammals (reviewed by Behringer *et al.*, 2018). According to Lair *et al.* (2016), nutritional stress should be investigated as a risk factor for dystocia in SLE belugas. In fact, nutritional stress is often associated with increased risk of parturition-related complications in other mammals such as cows and sheep (Jacobson *et al.*, 2020; Mee, 2008). In the study on Southern Resident killer whales, low prey availability was associated with unsuccessful pregnancy (Wasser *et al.*, 2017). During weight loss, lipid mobilization increases the concentrations of lipophilic contaminants stocked in blubber of marine mammals as well as their release into the circulation, potentially because these contaminants are mobilized less efficiently from the blubber than lipids are (Hall *et al.*, 2008; Louis *et al.*, 2014). Consequently, belugas may be more vulnerable to adverse effects of contaminant exposure during periods of nutritional stress. In SLE belugas, Bernier-Graveline *et al.* (2021) reported higher concentrations of non-PBDE flame retardants in blubber from females in poor and moderate body condition compared to those in good body condition. Moreover, in that study, blubber concentrations of certain fatty acids were found to decline between 1998 and 2016, suggesting a deterioration of energy reserves in SLE belugas over these last three decades. Considering the increasing occurrence of dystocia and perinatal mortality in the SLE beluga population, factors influencing body condition of these animals should be further investigated.

2.6 Conclusions

This study reported for the first time the concentrations of thyroid hormones in skin of a free-ranging marine mammal, demonstrating that skin biopsy represents a promising alternative matrix to measure thyroid hormones in wild marine mammals. However, additional research is needed to assess the relationships between thyroid hormone levels in skin and those in plasma. It was previously suggested that exposure to elevated levels of organohalogenes may play a role in the increased number of parturition-related mortality in the SLE beluga population by lowering thyroid hormone levels. The positive correlation found between skin PBDE and T₃ concentrations in males suggests that these contaminants may act as endocrine disruptors although does not support the hypothesis of lowered thyroid hormone levels in this highly contaminant-exposed beluga population. Regardless, these results must be interpreted with caution since no cause-effect relationship can be established from this correlation. In fact, many confounding variables were not controlled for (e.g., age, nutritional status, other unmeasured contaminants, etc.). Further research assessing deiodinase activity along with thyroid hormones and their

metabolites could provide a better understanding of the potential mechanism of action of thyroid disruption in St. Lawrence belugas. Nevertheless, our study suggests that biopsy sampling represents a useful and minimally invasive technique to simultaneously monitor contaminant and thyroid hormone levels in free-ranging marine mammals. Further studies should focus on the evaluation of steroid hormones (e.g., cortisol, estrogens, androgens, and progestogens) in addition to thyroid hormones, as preliminary results indicated that these can also be quantified in SLE beluga skin and blubber biopsies. Steroid and thyroid hormone analyses could provide information on stress, nutritional status, reproductive status, and endocrine disruption in this endangered population. This knowledge is essential to better understand the possible causes for the lack of recovery of this declining beluga population.

2.7 Acknowledgements

This research was supported primarily by the Fisheries and Oceans (DFO) Canada's Whale Science for Tomorrow program and the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We acknowledge the contributions of Alexandre Bernier-Graveline (Université du Québec à Montréal) for assistance with fieldwork, Michel Moisan (GREMM) and his team for biopsy sampling, Ling Wang (Université du Québec à Montréal) for HFR analysis, and Jun Han (University of Victoria Genome BC Proteomics Centre) for thyroid hormone analysis. We would also like to thank Dr. Lisa Loseto (DFO, Winnipeg, MB, Canada) for kindly providing samples of Arctic beluga for this project.

2.8 Supporting information

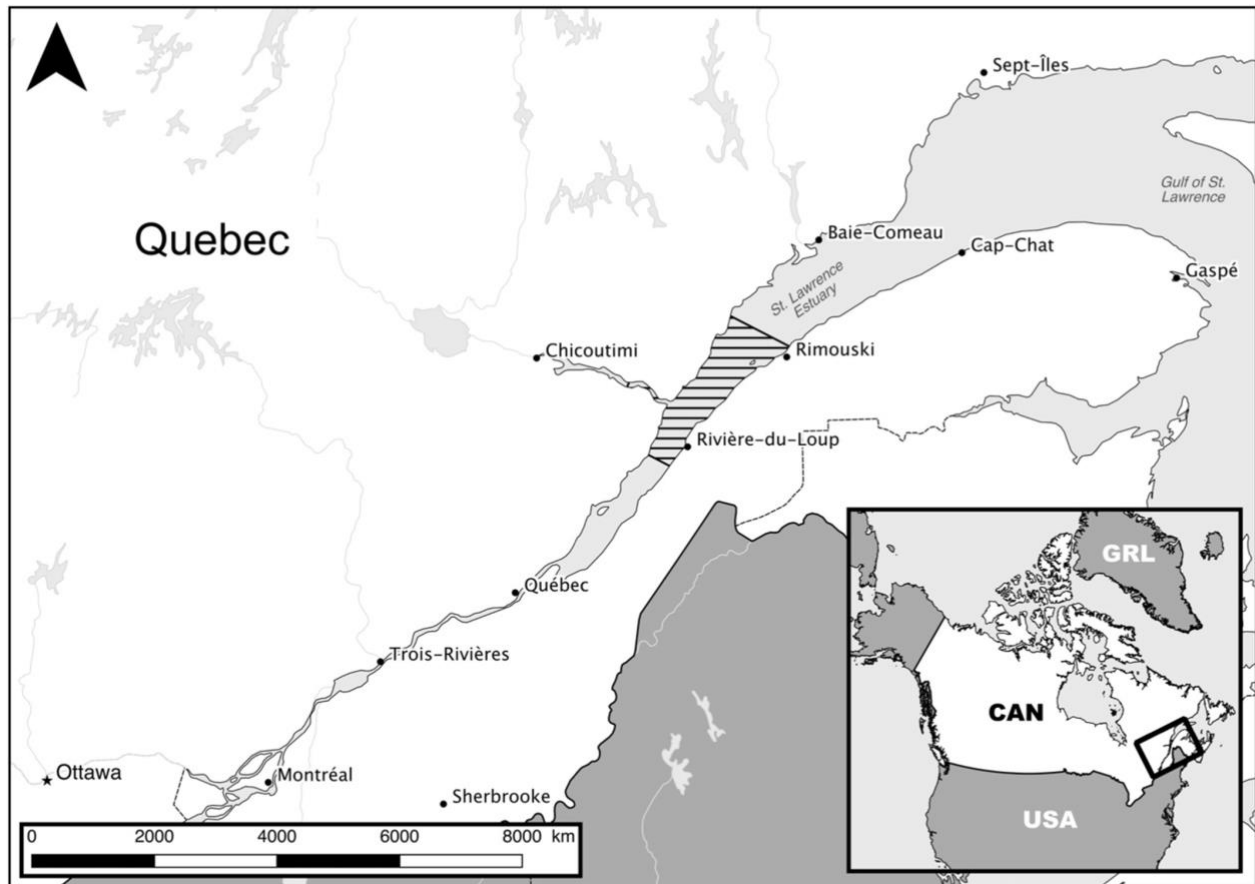


Fig. S2.1. Sampling area (hatched) in the St. Lawrence Estuary (QC, Canada), corresponding to the critical habitat of the SLE beluga (figure adapted from Simond *et al.* (2019))

Appendix S2.1. Information on method limits of detection (MLODs) and method limit of quantification (MLOQs)

The MLODs for thyroid hormone analysis was defined as the lowest concentration of analyte yielding a signal to noise ratio (S/N) >3 and a coefficient of variation (CV) ≤15% between triplicate injections. The MLOQ was defined as the lowest concentration of analyte yielding a S/N >10 and a CV ≤10% between triplicate injections, and where inclusion of the lowest concentration in the low-concentration least-square regression for each analyte generated a correlation coefficient (R^2) ≥0.998.

The MLODs for organohalogen analysis was defined the lowest concentration of analyte yielding a S/N >3. The MLOQ was defined as the lowest concentration of analyte yielding a S/N >10. MLOQs and MLODs determination was based on replicate injections ($n = 8$ for HFRs and 10 for PCBs and OCPs) of matrix samples spiked at a concentration of 3-5 times the estimated detection limit.

Table S2.1. Method limits of detection (MLODs; pM) and method limits of quantification (MLOQs; pM) for the analyses of thyroid hormones and their deiodinated metabolites by ultra-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry in multiple reaction monitoring mode (UPLC-MRM/MS).

	MLODs	MLOQs
T ₃	0.2	5.1
T ₄	0.2	5.1
rT ₃	0.2	5.1
3,5-T ₂	0.6	2
3,3'-T ₂	0.6	2

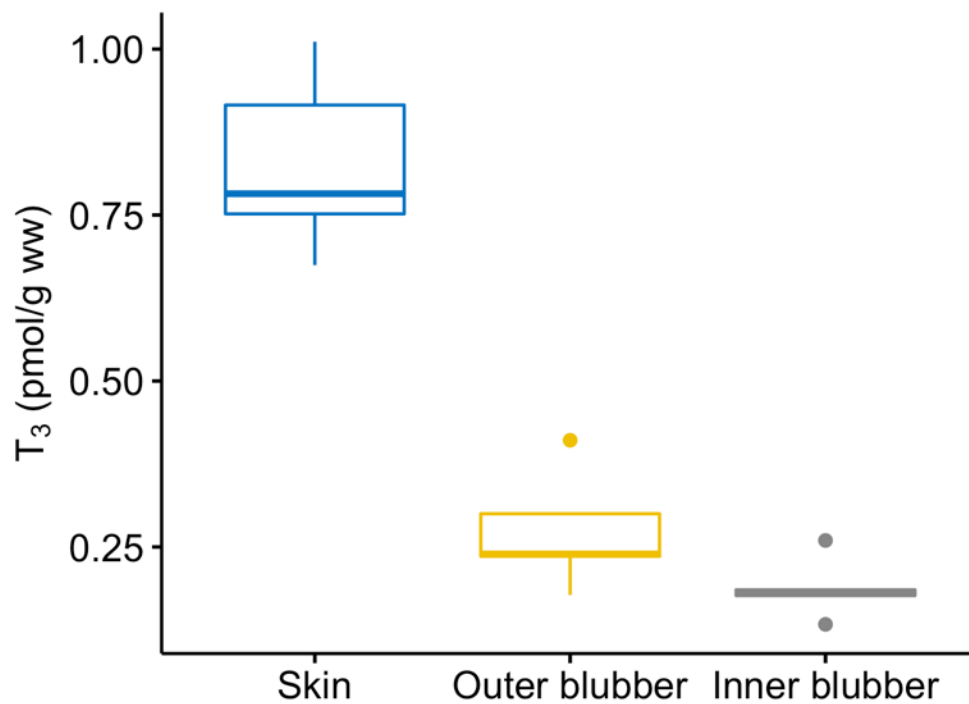


Fig. S2.2. Concentrations (pmol/g ww) of T₃ in skin, outer blubber, and inner blubber of Canadian Arctic belugas (n = 5). Vertical lines represent the range, the box delimits the first and third quartile, the horizontal line across the box is the median and the dots are outliers.

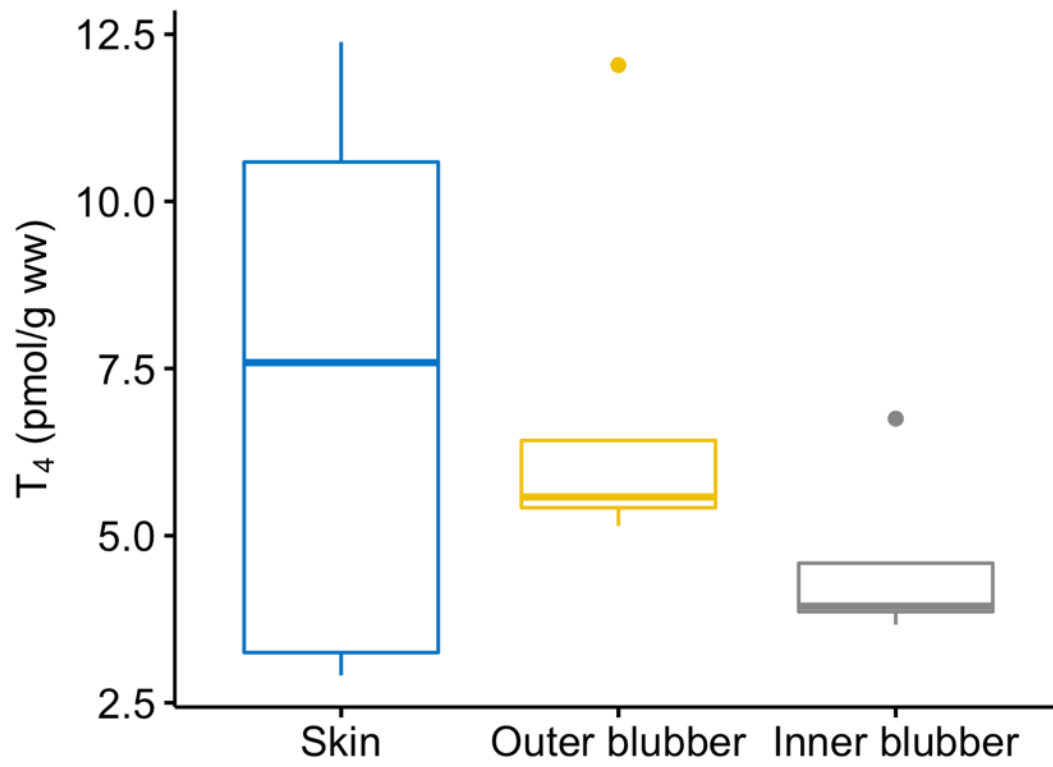


Fig. S2.3. Concentrations (pmol/g ww) of T₄ in skin, outer blubber, and inner blubber of Canadian Arctic belugas (n = 5). Vertical lines represent the range, the box delimits the first and third quartile, the horizontal line across the box is the median and the dots are outliers.

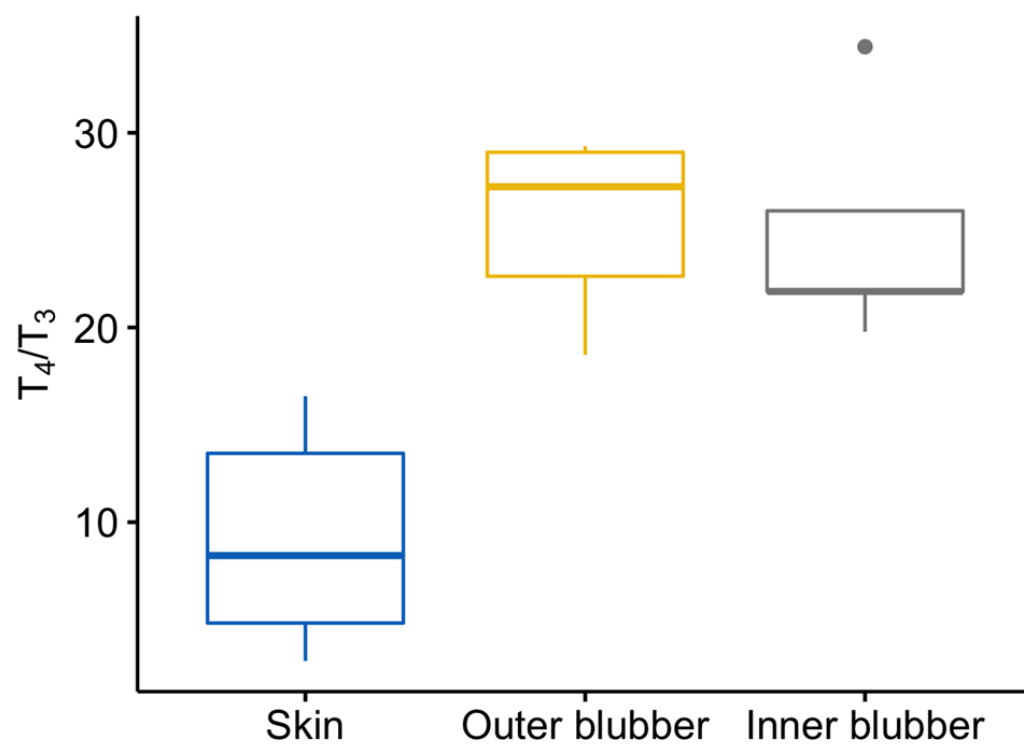


Fig. S2.4. Level ratios of T_4/T_3 in skin, outer blubber, and inner blubber of Canadian Arctic belugas ($n = 5$). Vertical lines represent the range, the box delimits the first and third quartile, the horizontal line across the box is the median and the dots are outliers.

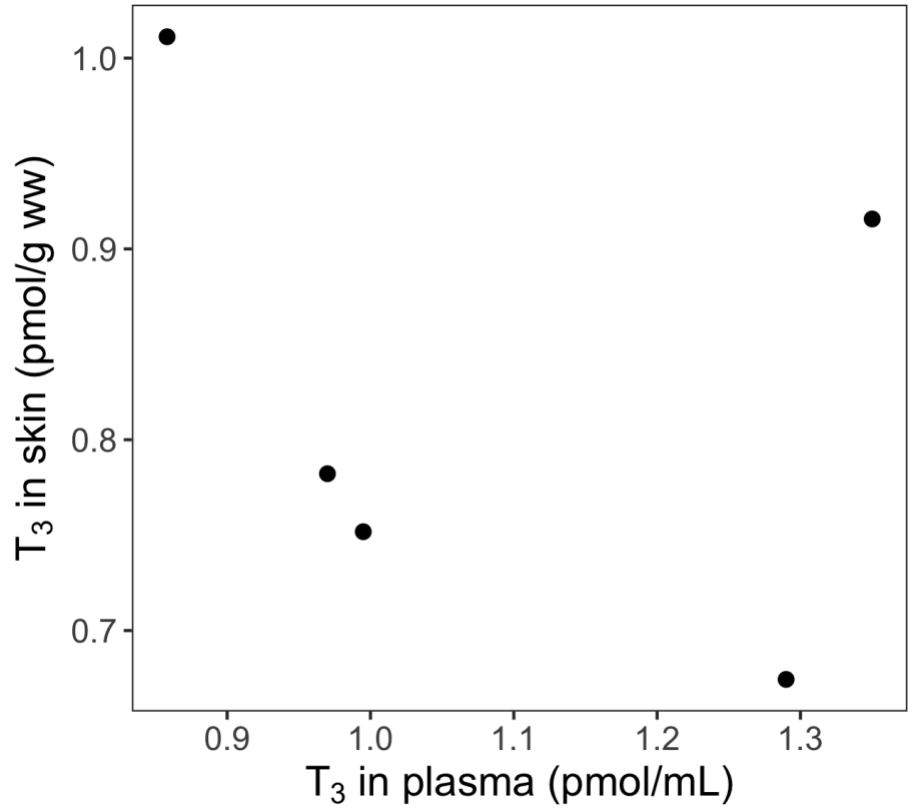


Fig. S2.5. Scatterplot of T₃ concentrations in skin (pmol/g ww) and plasma (pmol/mL) of Canadian Arctic belugas (n = 5).

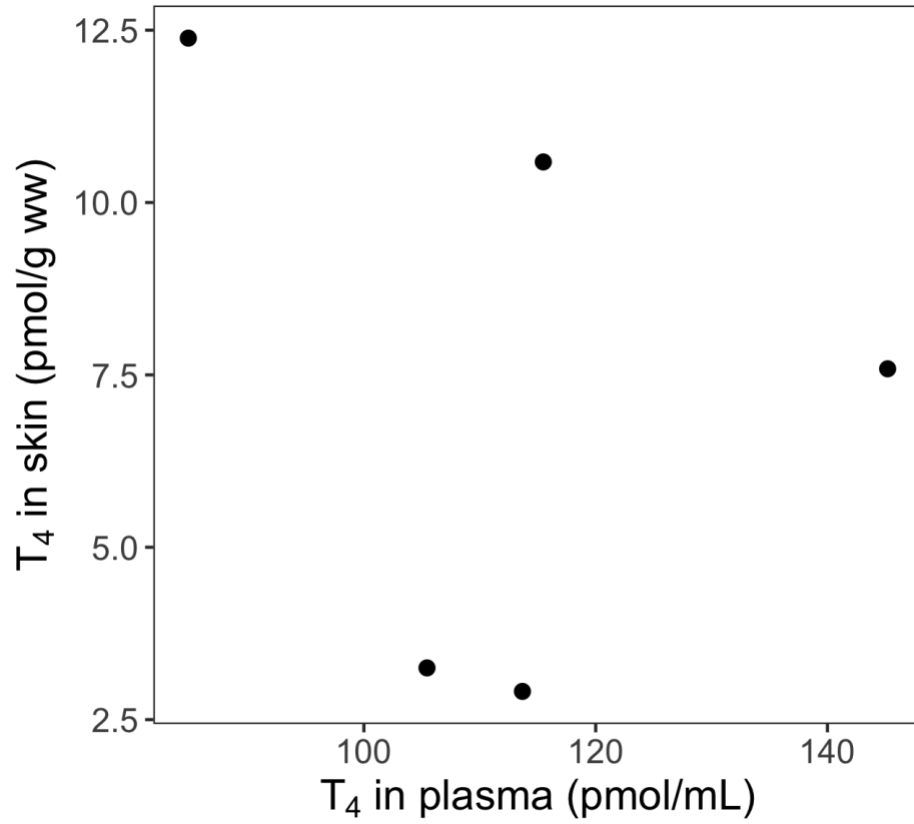


Fig. S2.6. Scatter plot of T₄ concentrations in skin (pmol/g ww) and plasma (pmol/mL) of Canadian Arctic beluga (n = 5).

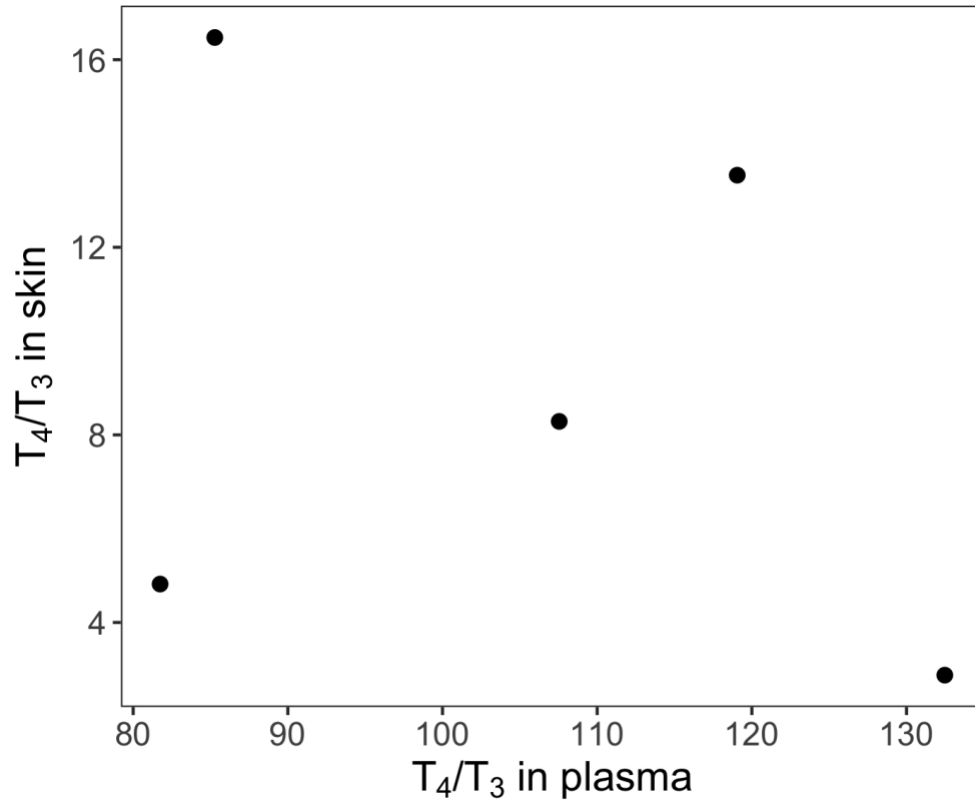


Fig. S2.7. Scatter plot of T_4/T_3 level ratios in skin and plasma of Canadian Arctic belugas ($n = 5$).

Table S2.2. Thyroid hormones and their deiodinated metabolites analyzed in skin of SLE belugas (n=40) and skin, blubber and plasma of Canadian Arctic belugas (n=5) with associated percentages of samples with concentrations above method limits of quantification (% > MLOQs), mean concentrations (\pm SEM). Concentrations are reported in pmol/g ww for tissues and pmol/mL for plasma.

SLE beluga skin			
	% samples > MLOQ	Mean concentration	SEM
T₃	100	1.43	0.20
T₄	100	10.2	0.73
rT₃	70.0	0.24	0.04
3,5-T₂	85.0	0.34	0.05
3,3'-T₂	22.5	-	-
Canadian Arctic beluga skin			
	% samples > MLOQ	Mean concentration	SEM
T₃	100	0.83	0.06
T₄	100	7.34	1.90
rT₃	80.0	0.54	0.26
3,5-T₂	100	0.28	0.03
3,3'-T₂	0.00	-	-
Canadian Arctic beluga outer blubber			
	% samples > MLOQ	Mean concentration	SEM
T₃	100	0.27	0.04
T₄	100	6.92	1.30
rT₃	100	0.25	0.06
3,5-T₂	40.0	-	-
3,3'-T₂	0.00	-	-

Canadian Arctic beluga inner blubber			
	% samples > MLOQ	Mean concentration	SEM
T₃	100	0.19	0.02
T₄	100	4.56	0.57
rT₃	100	0.25	0.04
3,5-T₂	40.0	-	-
3,3'-T₂	0.00	-	-

Canadian Arctic beluga plasma			
	% > samples MLOQ	Mean concentration	SEM
T₃	100	1.09	0.10
T₄	100	113	9.73
rT₃	100	4.34	0.49
3,5-T₂	100	0.18	0.01
3,3'-T₂	0.00	-	-

Table S2.3. Mean (\pm SEM) T_4/T_3 level ratios in skin of SLE beluga (n=40) and skin, blubber and plasma of Canadian Arctic beluga (n=5).

SLE belugas		
Matrix	Mean ratio	SEM
Skin	15.1	3.48
Canadian Arctic belugas		
Matrix	Mean ratio	SEM
Skin	9.20	2.57
Outer blubber	25.4	2.07
Inner blubber	24.8	2.61
Plasma	105	9.72

Table S2.4. Polychlorinated biphenyls (PCBs) analyzed in SLE beluga skin (n=40) and their respective method limits of detection (MLODs; ng/g ww), percentages of samples with concentrations above MLODs (% > MLOD), mean concentrations (\pm SEM; ng/g ww), and relative contributions (%) of each congener to Σ_{40} PCB.

PCB congener	MLOD	% samples > MLOD	Mean Concentration	SEM	Relative contribution to Σ_{40} PCB
CB-17/18	5	15.0	2.3	0.9	0.9
CB-28/31	5	75.0	10.8	1.2	4.2
CB-33	5	0.0	0.0	0.0	0.0
CB-44	5	2.5	0.2	0.2	0.1
CB-49	5	7.5	1.4	1.0	0.5
CB-52	5	70.0	15.6	2.0	6.1
CB-70	5	5.0	0.3	0.2	0.1
CB-74	5	20.0	1.3	0.4	0.5
CB-82	5	0.0	0.0	0.0	0.0
CB-87	5	40.0	4.6	1.2	1.8
CB-95	5	80.0	14.2	1.6	5.5
CB-99	5	75	15.4	2.2	6.0
CB-101	5	62.5	17.9	2.7	7.0
CB-105	5	40.0	3.0	0.6	1.2
CB-110	5	42.5	3.1	0.6	1.2
CB-118	5	80.0	14.2	1.6	5.5
CB-128	5	7.5	1.0	0.6	0.4
CB-132	5	2.5	2.5	2.5	1.0
CB-149	5	85.0	20.5	2.4	8.0
CB-151	5	45.0	5.4	1.0	2.1
CB-153	5	92.5	44.3	5.3	17.2
CB-156	5	0.0	0.0	0.0	0.0
CB-158/138	5	80.0	30.2	4.1	11.7
CB-169	5	2.5	0.3	0.3	0.1
CB-170	5	15.0	1.8	0.7	0.7
CB-171	5	2.5	0.3	0.3	0.1
CB-177	5	22.5	2.7	1.0	1.0
CB-180	5	77.5	21.8	2.7	8.5
CB-183	5	22.5	2.9	1.0	1.1
CB-187	5	75.0	16.3	2.4	6.3
CB-191	5	5.0	2.0	1.5	0.8
CB-194	5	0.0	0.0	0.0	0.0
CB-195	5	0.0	0.0	0.0	0.0
CB-199	5	2.5	0.4	0.4	0.2
CB-205	5	0.0	0.0	0.0	0.0
CB-206	5	5.0	0.7	0.5	0.3
CB-208	5	2.5	0.2	0.2	0.1

Table S2.5. Organochlorine pesticides (OCPs) analyzed in SLE beluga skin (n=40) and their respective method limits of detection (MLODs; ng/g ww), percentage of samples with concentrations above MLODs (% > MLODs), mean concentrations (\pm SEM; ng/g ww), and relative contributions (%) of each congener to the Σ_{29} OCP.

OCP	MLOD	% samples > MLOD	Mean Concentration	SEM	Contribution
Alachlor	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Aldrin	5	0.0	0.0	0.0	0.0
p,p'-DDD	5	0.0	0.0	0.0	0.0
p,p'-DDT	5	0.0	0.0	0.0	0.0
α -HCH	5	0.0	0.0	0.0	0.0
β -HCH	5	0.0	0.0	0.0	0.0
γ -HCH (Lindane)	5	0.0	0.0	0.0	0.0
δ -HCH	5	0.0	0.0	0.0	0.0
α -Chlordane	5	0.0	0.0	0.0	0.0
γ -Chlordane	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Dieldrin	5	0.0	0.0	0.0	0.0
DCPA	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Endosulfane I	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Endosulfane II	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Endosulfane sulfate	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Endrin	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Endrin aldehyde	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Endrin ketone	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Heptachlor epoxide	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Heptachlor	5	0.0	0.0	0.0	0.0
HCB	5	95.0	18.3	1.3	40.1
Imidacloprid	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Methoxychlor	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Mirex	5	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Trans</i> -Nonachlor	5	92.5	28.4	3.0	62.1
Octachlorostyrene	5	0.0	0.0	0.0	0.0
Oxychlordane	5	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Cis</i> -Permethrin	5	0.0	0.0	0.0	0.0
<i>Trans</i> -Permethrin	5	0.0	0.0	0.0	0.0

DDD: dichlorodiphenyldichloroethane; DDE: dichlorodiphenyldichloroethylene; DDT: dichlorodiphenyltrichloroethane; HCH: Hexachlorocyclohexane; HCB: Hexachlorobenzene; DCPA: Dimethyl tetrachloroterephthalate.

Table S2.6. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) analyzed in SLE beluga skin (n=40) and their respective method limits of detection (MLODs; ng/g ww), method limits of quantification (MLOQs ; ng/g ww), percentage of samples with concentrations above MLOQs (% > MLOQs), mean concentrations (\pm SEM; ng/g ww), and relative contributions (%) of each congener to the Σ_{34} PBDE.

PBDE congener	MLOD	MLOQ	% samples > MLOQ	Mean Concentration	SEM	Contribution
BDE-7	0.01	0.01	87.8	0.27	0.03	1.8
BDE-10	0.01	0.01	75.6	0.12	0.02	0.8
BDE-15	0.01	0.03	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-17	0.01	0.01	61.0	0.11	0.02	0.8
BDE-28/PBT	0.01	0.01	100	0.62	0.05	4.2
BDE-47	0.01	0.02	100	8.83	0.87	60.2
BDE-49	0.01	0.02	80.5	0.16	0.02	1.1
BDE-66	0.01	0.02	63.4	0.12	0.02	0.8
BDE-71	0.01	0.01	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-77	0.01	0.02	2.4	0.00	0.00	0.0
BDE-85	0.01	0.02	95.1	0.64	0.06	4.4
BDE-99	0.01	0.04	100	1.84	0.17	12.5
BDE-100	0.01	0.04	100	1.32	0.14	9.0
BDE-119	0.01	0.03	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-126	0.01	0.02	48.8	0.16	0.03	1.1
BDE-138	0.01	0.05	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-139	0.01	0.03	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-140	0.01	0.03	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-153	0.01	0.02	29.3	0.07	0.02	0.5
BDE-154/BB-153	0.01	0.01	70.7	0.40	0.06	2.7
BDE-171	0.01	0.05	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-180	0.01	0.02	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-183/Dec-604	0.01	0.03	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-184	0.01	0.04	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-191	0.01	0.01	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-196	0.01	0.03	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-197/-204	0.02	0.07	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-201	0.01	0.03	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-203	0.02	0.06	2.4	0.01	0.01	0.1
BDE-205	0.04	0.13	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-206	0.23	0.76	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-207	0.03	0.1	0.0	0.00	0.00	0.0
BDE-208	0.04	0.14	0.0	0.00	0.00	0.0

PBT: Polybutylene terephthalate; BB-153: 2,2',4,4',5,5'-hexabromobiphenyl; Dec: Dechlorane.

Table S2.7. Non-PBDE halogenated flame retardants (Non-PBDE HFRs) analyzed in SLE beluga skin (n=40) and their respective method limits of detection (MLODs; ng/g ww), method limits of quantification (MLOQs; ng/g ww), percentage of samples with concentrations above MLOQs (% > MLOQs), mean concentrations (\pm SEM; ng/g ww).

Non-PBDE HFR	MLOD	MLOQ	% samples > MLOQ	Mean Concentration	SEM
PBEB	0.01	0.01	31.7	0.03	0,01
HBB	0.01	0.01	56.1	0.39	0.07
OBIND	0.06	0.19	0.0	0.00	0.00
DBDPE	0.36	1.21	0.0	0.00	0.00
DBCD	0.20	0.60	0.0	0.00	0.00
Cplus	0.01	0.05	0.0	0.00	0.00
Dec-601	0.02	0.08	0.0	0.00	0.00
Dec-602	0.02	0.08	0.0	0.00	0.00
Dec-604 CB	0.01	0.01	0.0	0.00	0.00
Dec-603	0.14	0.47	0.0	0.00	0.00
syn-DP	0.04	0.12	0.0	0.00	0.00
anti-DP	0.01	0.05	0.0	0.00	0.00

PBEB : Pentabromoethylbenzene; HBB : Hexabromobenzene; OBIND (octabromo-1,3,3-trimethyl-1-phenylindane); DBDPE: Decabromodiphenyl Ethane; DBCB: Dibromochlordene; CPlus: Chlordene plus; Decabromodiphenylethane; Dec: Dechlorane; Dec-604 CB: Dec-604 Component B; DP: Dechlorane Plus

Table S2.8. Summary of mean comparison tests of thyroid hormone and deiodinated metabolite levels and organohalogen contaminant concentrations in male and female SLE beluga (n=40). Hormone levels were log-transformed. Differences in variable means between males and females were tested using the Student's T tests (T statistic) when the assumptions of normality and homogeneity of variance were met, otherwise the non-parametric Wilcoxon signed-rank test (W statistic) was used.

Variable	Test statistic	P-value
Σ_{34} PBDE	T = -0.78	0.44
Σ_{40} PCB	T = -0.25	0.81
Σ_{29} OCP	T = 0.27	0.79
T ₃	W = 262	0.10
T ₄	W = 152	0.20
rT ₃	T = -1.63	0.11
3,5-T ₂	W = 271	0.06
T ₄ /T ₃	T = -2.49	0.02

Table S2.9. Candidate linear models and a priori hypotheses predicting hormone and deiodinated metabolite levels (TH) in SLE beluga skin.

Candidate model	Biological hypothesis
$TH \sim \Sigma_{34}PBDE$ $TH \sim \Sigma_{34}PBDE + Sex$	Thyroid hormone and metabolite levels vary with exposure to PBDEs
$TH \sim \Sigma_{40}PCB$ $TH \sim \Sigma_{40}PCB + Sex$	Thyroid hormone and metabolite levels vary with exposure to PCBs
$TH \sim \Sigma_{29}OCP$ $TH \sim \Sigma_{29}OCP + Sex$	Thyroid hormone and metabolite levels vary with exposure to OCPs
$TH \sim \Sigma_{40}PCB + \Sigma_{34}PBDE$ $TH \sim \Sigma_{40}PCB + \Sigma_{34}PBDE + Sex$	Thyroid hormone and metabolite levels vary with exposure to the structurally similar PCBs and PBDE
$TH \sim \Sigma_{115}OHC$ $TH \sim \Sigma_{115}OHC + Sex$	Thyroid hormone and metabolite levels vary with exposure to OHCs
$TH \sim Sex$	Thyroid hormone and metabolite levels vary with sex
$TH \sim \text{Intercept-only}$	Null model

Table S2.10. Variance inflation factor (VIF) of predictors in most complex candidate models.

Model	VIF score
TH ~ Σ_{29}OCP + Sex	Σ_{29} OCP and Sex : 1.00
TH ~ Σ_{115}OHC + Sex	Σ_{115} OHC and Sex : 1.00
TH ~ Σ_{40}PCB + Σ_{34}PBDE + Sex	Σ_{40} PCB : 1.61 Σ_{34} PBDE : 1.63 Sex : 1.02

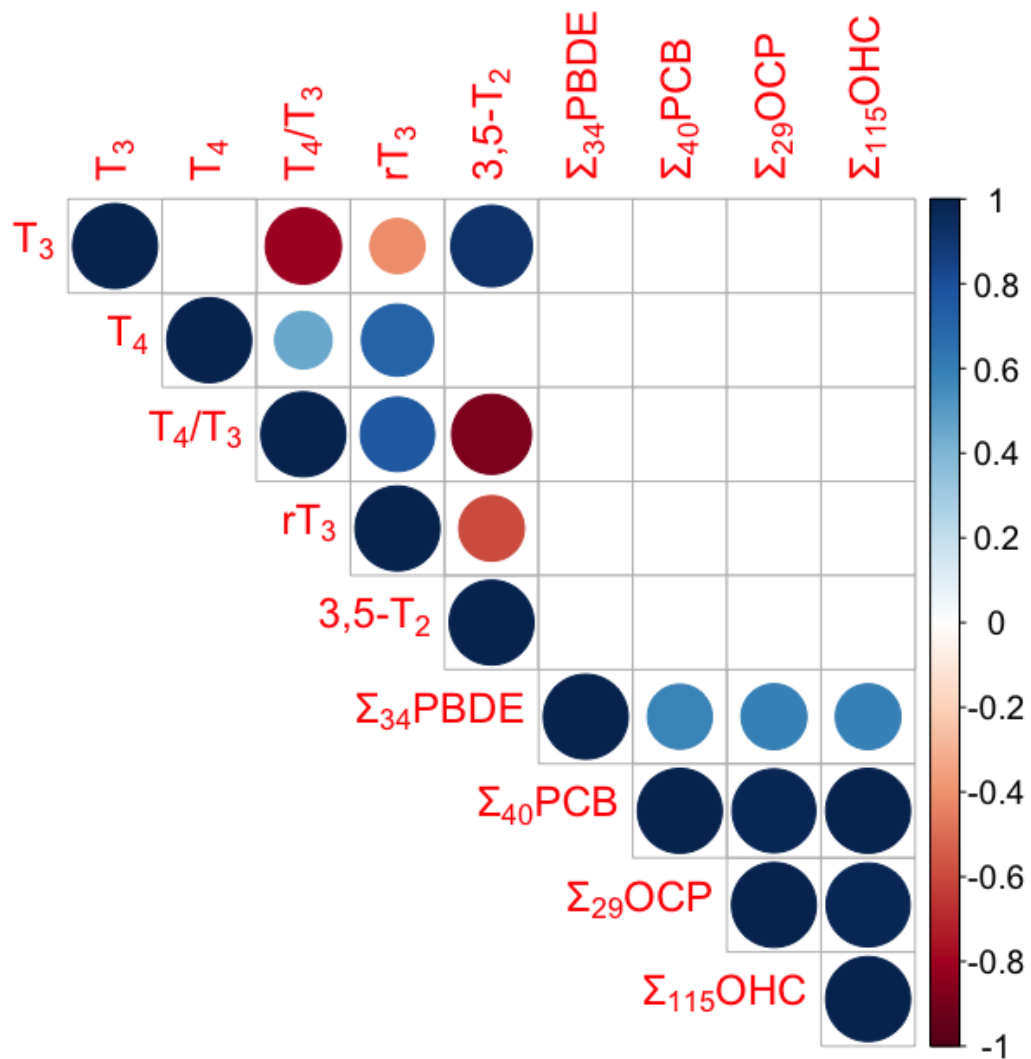


Fig. S2.8. Heatmap of correlations between levels of thyroid hormones and their deiodinated metabolites and concentrations of organohalogenes in SLE beluga (n=40). The color scale on the left represents the Spearman correlation coefficient. Only significant correlations ($p \leq 0.05$) are represented on the diagram with circles; size and color intensity are proportional to the correlation coefficient.

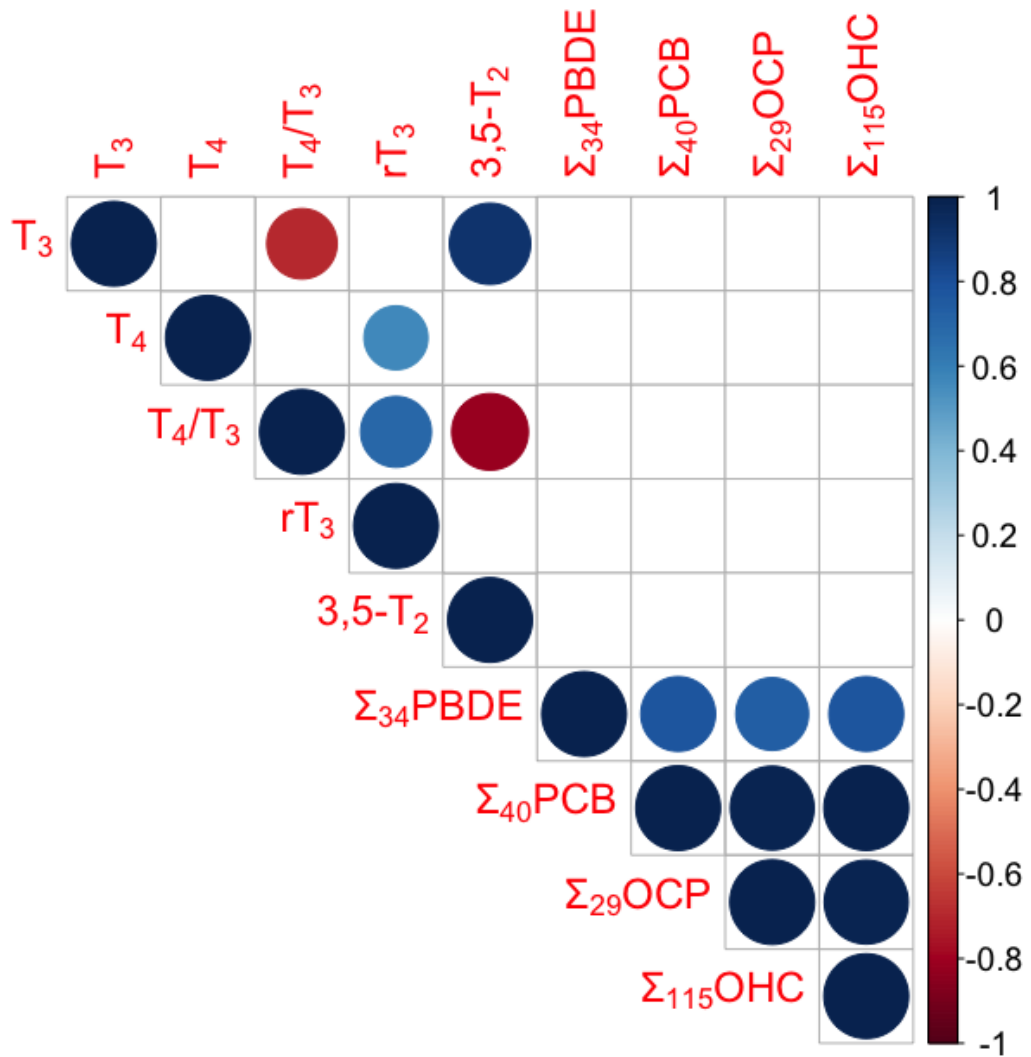


Fig. S2.9. Heatmap of correlations between levels of thyroid hormones and their deiodinated metabolites and concentrations of organohalogenes in female SLE beluga (n=20). The color scale on the left represents the Spearman correlation coefficient. Only significant correlations ($p < 0.05$) are represented on the diagram with circles; size and color intensity are proportional to the correlation coefficient.

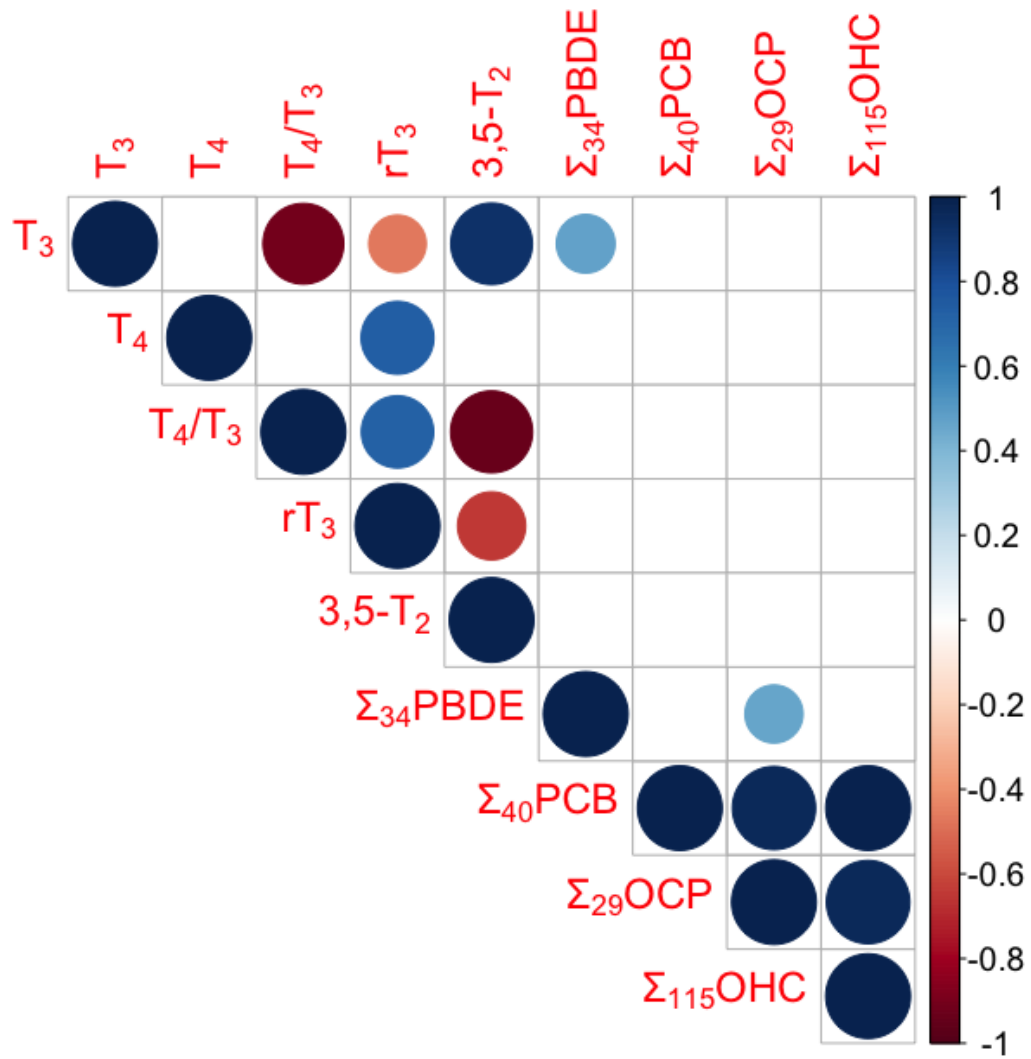


Fig. S2.10. Heatmap of correlations between levels of thyroid hormones and their deiodinated metabolites and concentrations of organohalogenes in male SLE beluga (n=20). The color scale on the left represents the Spearman correlation coefficient. Only significant correlations ($p < 0.05$) are represented on the diagram with circles; size and color intensity are proportional to the correlation coefficient.

CONCLUSION GÉNÉRALE

L'objectif général de cette étude était d'évaluer les relations entre l'accumulation de contaminants organohalogénés (PCB, pesticides organochlorés, PBDE et autres retardateurs de flamme halogénés) et les niveaux d'hormones thyroïdiennes (T_3 , T_4 et certains de leurs métabolites désiodés) chez les bélugas du Saint-Laurent. L'étude des hormones et des perturbateurs endocriniens chez les cétacés en liberté pose de nombreux défis. En effet, l'obtention d'échantillons de plasma pour l'analyse des hormones nécessite la capture et la contention de ces animaux de grande taille, ce qui implique des enjeux éthiques et techniques. Il n'est donc pas possible d'obtenir d'échantillons de plasma chez la population de bélugas du Saint-Laurent. Ainsi, ce projet avait aussi pour objectif de tester et utiliser une nouvelle méthode basée sur l'UPLC-MRM/MS pour analyser les hormones thyroïdiennes dans des échantillons de peau de bélugas obtenus par biopsie à la place du plasma.

Cette méthode a été testée en analysant les concentrations d'hormones thyroïdiennes dans différentes matrices (épiderme, gras externe, gras interne et plasma) provenant de cinq carcasses de bélugas de l'Arctique canadien issues de la chasse traditionnelle inuite. L'analyse des concentrations d'hormones thyroïdiennes dans les paires d'échantillons de peau et de plasma de bélugas de l'Arctique canadien a prouvé que les niveaux d'hormones thyroïdiennes sont quantifiables dans la peau. Toutefois, les niveaux d'hormones thyroïdiennes dans la peau ne semblaient pas refléter ceux dans le plasma. Cela était attendu, car les hormones thyroïdiennes sont métabolisées au niveau intracellulaire dans les tissus cibles entre autres par les désiodases. Les niveaux d'hormone dans la peau ne reflètent donc pas nécessairement le statut hormonal de l'animal, ce qui limite l'interprétation des résultats. Comme la taille de l'échantillon de la présente étude est petite, des études supplémentaires sont nécessaires pour examiner les relations entre les niveaux d'hormones thyroïdiennes dans la peau des bélugas et les niveaux dans le plasma.

Cette méthode a permis de quantifier la T_3 , la T_4 , la rT_3 et la $3,5-T_2$ pour la première fois chez la population de bélugas du Saint-Laurent (40 bélugas mâles et femelles). En ce qui concerne les contaminants organohalogénés, 34 congénères de PCB, 15 congénères de PBDE, ainsi que le HCB et le *trans*-nonachlore ont été quantifiés dans les échantillons de peau de bélugas du Saint-Laurent par GC/MS. Une corrélation positive a été observée entre les niveaux de T_3 et les concentrations de contaminants organohalogénés dans la peau des mâles de cette population. Cela suggère que les PBDE pourraient agir comme des perturbateurs endocriniens chez les bélugas du Saint-Laurent. Toutefois, ces résultats ne supportent pas

l'hypothèse supposant une association négative entre les niveaux d'hormones thyroïdiennes et l'exposition aux contaminants organohalogénés chez cette population, comme cela a été observé chez d'autres populations de mammifères marins. L'utilisation de la peau comme matrice d'analyse limite les comparaisons des résultats avec d'autres études sur les perturbateurs endocriniens chez les mammifères marins, car les hormones sont généralement quantifiées dans le plasma. Il est aussi important de noter que les résultats pourraient avoir été influencés par des variables confondantes qui n'ont pu être contrôlées, telles que l'âge des bélugas et certains contaminants n'ayant pas été analysés. Ainsi, la corrélation rapportée dans cette étude doit être interprétée avec prudence et ne peut être considérée comme une relation de cause à effet.

Cette étude s'inscrit dans un effort de recherche pour développer de nouvelles méthodes peu invasives pour étudier les populations de mammifères marins en liberté, particulièrement celles en péril. Nos résultats indiquent que la biopsie de peau est un outil prometteur pour l'étude des hormones et des perturbateurs endocriniens chez ce type de population. En ce qui a trait aux bélugas du Saint-Laurent, l'exposition aux contaminants organohalogénés est considérée comme l'une des principales menaces contribuant potentiellement au déclin de cette population. La poursuite de la recherche au sujet des perturbateurs endocriniens permettrait de mieux comprendre cette menace dans une optique de conservation de cette population. Par exemple, d'autres hormones telles que les hormones stéroïdes pourraient être analysées. En effet, des résultats préliminaires ont montré que ces hormones (par ex. : le cortisol, l'estrogène, la progestérone et la testostérone) étaient quantifiables dans les échantillons utilisés pour ce projet. L'étude des hormones thyroïdiennes et stéroïdes pourrait fournir des informations non seulement sur les perturbations endocriniennes, mais aussi sur le stress, le statut reproducteur et le statut nutritionnel des bélugas du Saint-Laurent. Ces connaissances pourraient aider à mieux comprendre les causes du déclin de cette population en voie d'extinction dans une optique de conservation de la faune.

RÉFÉRENCES

- Amaral, R. S. (2010). Use of alternative matrices to monitor steroid hormones in aquatic mammals: A review. *Aquatic Mammals*, 36(2), 162-171. <https://doi.org/10.1578/AM.36.2.2010.162>
- Ayres, K. L., Booth, R. K., Hempelmann, J. A., Koski, K. L., Emmons, C. K., Baird, R. W., Balcomb-Bartok, K., Hanson, M. B., Ford, M. J. et Wasser, S. K. (2012). Distinguishing the impacts of inadequate prey and vessel traffic on an endangered killer whale (*Orcinus orca*) population. *PLoS ONE*, 7(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0036842>
- Barrett, H., Du, X., Houde, M., Lair, S., Verreault, J. et Peng, H. (2021). Suspect and Nontarget Screening Revealed Class-Specific Temporal Trends (2000-2017) of Poly- And Perfluoroalkyl Substances in St. Lawrence Beluga Whales. *Environmental Science and Technology*, 55(3), 1659-1671. https://doi.org/10.1021/ACS.EST.0C05957/SUPPL_FILE/ES0C05957_SI_001.PDF
- Bechshoft, T., Wright, A. J., Styrishave, B. et Houser, D. (2020). Measuring and validating concentrations of steroid hormones in the skin of bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Conservation Physiology*, 8(1). <https://doi.org/10.1093/CONPHYS/COAA032>
- Bechshoft, T., Wright, A. J., Weisser, J. J., Teilmann, J., Dietz, R., Hansen, M., Björklund, E. et Styrishave, B. (2015). Developing a new research tool for use in free-ranging cetaceans: recovering cortisol from harbour porpoise skin. *Conservation Physiology*, 3(1). <https://doi.org/10.1093/CONPHYS/COV016>
- Behringer, V., Deimel, C., Hohmann, G., Negrey, J., Schaebs, F. S. et Deschner, T. (2018). Applications for non-invasive thyroid hormone measurements in mammalian ecology, growth, and maintenance. *Hormones and Behavior*, 105, 66-85. <https://doi.org/10.1016/J.YHBEH.2018.07.011>
- Bernier-Graveline, A., Lesage, V., Cabrol, J., Lair, S., Michaud, R., Rosabal, M. et Verreault, J. (2021). Lipid metabolites as indicators of body condition in highly contaminant-exposed belugas from the endangered St. Lawrence Estuary population (Canada). *Environmental Research*, 192, 110272. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2020.110272>
- Blouin, K., Malaisé, F., Verreault, J., Lair, S. et Lu, Z. (2022). Occurrence and temporal trends of industrial antioxidants and UV absorbents in the endangered St. Lawrence Estuary beluga whale (*Delphinapterus leucas*). *Science of The Total Environment*, 842, 156635. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2022.156635>
- Boggs, A. S. P., Schock, T. B., Schwacke, L. H., Galligan, T. M., Morey, J. S., Mcfee, W. E. et Kucklick, J. R. (2017). Rapid and reliable steroid hormone profiling in *Tursiops truncatus* blubber using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). *Analytical and bioanalytical chemistry*, 409(21), 5019-5029. <https://doi.org/10.1007/s00216-017-0446-z>

- Bourgeon, S., Riemer, A. K., Tartu, S., Aars, J., Polder, A., Jenssen, B. M. et Routti, H. (2017). Potentiation of ecological factors on the disruption of thyroid hormones by organo-halogenated contaminants in female polar bears (*Ursus maritimus*) from the Barents Sea. *Environmental Research*, 158, 94-104. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.05.034>
- Butt, C. M. et Stapleton, H. M. (2013). Inhibition of thyroid hormone sulfotransferase activity by brominated flame retardants and halogenated phenolics. *Chemical Research in Toxicology*, 26(11). <https://doi.org/10.1021/tx400342k>
- Cadioux, M. A., Muir, D. C. G., Béland, P. et Hickie, B. E. (2016). Lactational Transfer of Polychlorinated-Biphenyls (PCBs) and Other Organochlorines in St. Lawrence Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 70(1), 169-179. <https://doi.org/10.1007/s00244-015-0223-y>
- Cao, J., Lin, Y., Guo, L. H., Zhang, A. Q., Wei, Y. et Yang, Y. (2010). Structure-based investigation on the binding interaction of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers with thyroxine transport proteins. *Toxicology*, 277(1-3), 20-28. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2010.08.012>
- Cates, K. A., Atkinson, S., Gabriele, C. M., Pack, A. A., Straley, J. M. et Yin, S. (2019). Testosterone trends within and across seasons in male humpback whales (*Megaptera novaeangliae*) from Hawaii and Alaska. *General and Comparative Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.03.013>
- COSEPAC. (2014). *Évaluation et Rapport de situation du COSEPAC sur le Béluga Delphinapterus leucas*. https://publications.gc.ca/collections/collection_2016/eccc/CW69-14-703-2015-fra.pdf
- COSEWIC. (2014). *Beluga whale (Delphinapterus leucas) St. Lawrence estuary: COSEWIC assessment and status report 2014*. <https://www.canada.ca/en/environment-climate-change/services/species-risk-public-registry/cosewic-assessments-status-reports/beluga-whale.html>
- Cross, T. G. et Hornshaw, M. P. (2016). Can LC and LC-MS ever replace immunoassays? *Journal of Applied Bioanalysis*, 2(4). <https://doi.org/10.17145/jab.16.015>
- DFO. (2012). *Recovery Strategy for the beluga whale (Delphinapterus leucas), St. Lawrence Estuary population in Canada*. Species at Risk Act recovery strategy series. Fisheries and Oceans Canada. <https://publications.gc.ca/site/fra/9.620379/publication.html>
- DFO. (2014). *Status of beluga (Delphinapterus leucas) in the St. Lawrence River estuary*. Canadian Science Advisory Secretariat science advisory report. Fisheries and Oceans Canada Canadian Science Advisory Secretariat.
- DFO. (2017a). *An update of beluga (Delphinaterus leucas) abundance and reported deaths in the St. Lawrence River Estuary*. [Report]. DFO Canadian Science Advisory Secretariat science advisory. http://epe.lac-bac.gc.ca/100/201/301/weekly_acquisitions_list-ef/2017/17-19/publications.gc.ca/collections/collection_2017/mpo-dfo/Fs70-6-2017-015-eng.pdf

- DFO. (2017b). *St. Lawrence Estuary beluga : a science based review of recovery actions for three at-risk whale populations*. Fisheries and Oceans Canada. <https://www.dfo-mpo.gc.ca/species-especies/publications/mammals-mammiferes/whalereview-revuebaleine/review-revue/beluga/index-eng.html>
- Eales, J. G. (1988). The Influence of Nutritional State on Thyroid Function in Various Vertebrates. *Integrative and Comparative Biology*, 28(2), 351-362. <https://doi.org/10.1093/ICB/28.2.351>
- Flower, J. E., Allender, M. C., Giovanelli, R. P., Summers, S. D., Spoon, T. R., Leger, J. A. st., Goertz, C. E. C., Dunn, J. L., Romano, T. A., Hobbs, R. C. et Tuttle, A. D. (2015). Circulating concentrations of thyroid hormone in beluga whales (*delphinapterus leucas*): influence of age, sex, and season. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine*, 46(3), 456-467. <https://doi.org/10.1638/2014-0127.1>
- Gabrielsen, K. M., Krokstad, J. S., Villanger, G. D., Blair, D. A. D., Obregon, M. J., Sonne, C., Dietz, R., Letcher, R. J. et Jenssen, B. M. (2015). Thyroid hormones and deiodinase activity in plasma and tissues in relation to high levels of organohalogen contaminants in East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*). *Environmental Research*, 136, 413-423. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2014.09.019>
- Gabrielsen, K. M., Villanger, G. D., Lie, E., Karimi, M., Lydersen, C., Kovacs, K. M. et Jenssen, B. M. (2011). Levels and patterns of hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) and their associations with thyroid hormones in hooded seal (*Cystophora cristata*) mother-pup pairs. *Aquatic Toxicology*, 105(3-4), 482-491. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.08.003>
- Galligan, T. M., Balmer, B. C., Schwacke, L. H., Bolton, J. L., Quigley, B. M., Rosel, P. E., Ylitalo, G. M. et Boggs, A. S. P. (2019). Examining the relationships between blubber steroid hormones and persistent organic pollutants in common bottlenose dolphins. *Environmental Pollution*, 249, 982-991. <https://doi.org/10.1016/J.ENVPOL.2019.03.083>
- Galligan, T. M., Boggs, A. S. P., Balmer, B. C., Rowles, T., Smith, C. R., Townsend, F., Wells, R. S., Kellar, N. M., Zolman, E. S. et Schwacke, L. H. (2020). Blubber steroid hormone profiles as indicators of physiological state in free-ranging common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 239, 110583. <https://doi.org/10.1016/J.CBPA.2019.110583>
- Gilson, A., Syvanen, M., Levine, K. et Banks, J. (1998). Deer gender determination by polymerase chain reaction: Validation study and application to tissues, bloodstains, and hair forensic samples from California. *California Fish and Game*, 84(4).
- Gosselin, J.-F., Hammill, M. O. et Mosnier, A. (2014). *Summer abundance indices of St. Lawrence Estuary beluga (Delphinapterus leucas) from a photographic survey in 2009 and 28 line transect surveys from 2001 to 2009*. DFO Can. Sci. Advis. Sec. Res. Doc. <http://www.dfo-mpo.gc.ca/csas-sccs/>
- Hall, A. J., Gulland, F. M. D., Ylitalo, G. M., Greig, D. J. et Lowenstine, L. (2008). Changes in blubber contaminant concentrations in California sea lions (*Zalophus californianus*) associated with weight

- loss and gain during rehabilitation. *Environmental science & technology*, 42(11), 4181-4187. <https://doi.org/10.1021/ES702685P>
- Hall, A. J. et Thomas, G. O. (2007). Polychlorinated biphenyls, DDT, polybrominated diphenyl ethers, and organic pesticides in United Kingdom harbor seals (*Phoca vitulina*) - Mixed exposures and thyroid homeostasis. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 26(5), 851-861. <https://doi.org/10.1897/06-310R.1>
- Hammill, M. O., Measures, L., Gosselin, J.-F. et Lesage, V. (2007). Lack of recovery in St. Lawrence Estuary beluga. [Research Document]. DFO Canadian Science Advisory Secretariat science advisory. 2007/026.
- Hansen, M., Villanger, G. D., Bechshoft, T., Levin, M., Routti, H., Kovacs, K. M. et Lydersen, C. (2017). Circulating thyroid hormones and associated metabolites in white whales (*Delphinapterus leucas*) determined using isotope-dilution mass spectrometry. *Environmental Research*, 156, 128-131. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2017.03.027>
- Houde, M., Berryman, D., de Lafontaine, Y. et Verreault, J. (2014). Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence River, Canada. *Science of The Total Environment*, 479-480(1), 48-56. <https://doi.org/10.1016/J.SCITOTENV.2014.01.105>
- Hoydal, K. S., Ciesielski, T. M., Borrell, A., Wasik, A., Letcher, R. J., Dam, M. et Jensen, B. M. (2016). Relationships between concentrations of selected organohalogen contaminants and thyroid hormones and vitamins A, E and D in Faroese pilot whales. *Environmental Research*, 148, 386-400. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2016.04.012>
- Hunt, K. E., Moore, M. J., Rolland, R. M., Kellar, N. M., Hall, A. J., Kershaw, J., Raverty, S. A., Davis, C. E., Yeates, L. C., Fauquier, D. A., Rowles, T. K., Kraus, S. D. et Cooke, S. (2013). Overcoming the challenges of studying conservation physiology in large whales: a review of available methods. *Conservation Physiology*, 1(1). <https://doi.org/10.1093/CONPHYS/COT006>
- Hunt, K. E., Robbins, J., Buck, C. L., Bérubé, M. et Rolland, R. M. (2019). Evaluation of fecal hormones for noninvasive research on reproduction and stress in humpback whales (*Megaptera novaeangliae*). *General and Comparative Endocrinology*, 280, 24-34. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.04.004>
- Hunt, K. E., Rolland, R. M. et Kraus, S. D. (2014). Detection of steroid and thyroid hormones via immunoassay of North Atlantic right whale (*Eubalaena glacialis*) respiratory vapor. *Marine Mammal Science*, 30(2), 796-809. <https://doi.org/10.1111/mms.12073>
- Jacobson, C., Bruce, M., Kenyon, P. R., Lockwood, A., Miller, D., Refshauge, G. et Masters, D. G. (2020). A review of dystocia in sheep. *Small Ruminant Research*, 192, 106209. <https://doi.org/10.1016/J.SMALLRUMRES.2020.106209>
- Jepson, P. D., Bennett, P. M., Deaville, R., Allchin, C. R., Baker, J. R. et Law, R. J. (2005). Relationships between polychlorinated biphenyls and health status in harbor porpoises (*Phocoena phocoena*)

- stranded in the United Kingdom. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 24(1). <https://doi.org/10.1897/03-663.1>
- Jugan, M. L., Levi, Y. et Blondeau, J. P. (2010, 1 avril). *Endocrine disruptors and thyroid hormone physiology. Biochemical Pharmacology*. 79(7), 939-947. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.11.006>
- Kannan, K., Blankenship, A. L., Jones, P. D. et Giesy, J. P. (2000). Toxicity reference values for the toxic effects of polychlorinated biphenyls to aquatic mammals. *Human and Ecological Risk Assessment (HERA)*, 6(1). <https://doi.org/10.1080/10807030091124491>
- Kellar, N. M., Trego, M. L., Marks, C. I. et Dizon, A. E. (2006). Determining pregnancy from blubber in three species of delphinids. *Marine Mammal Science*, 22(1), 1-16. <https://doi.org/10.1111/J.1748-7692.2006.00001.X>
- Krahn, M. M., Herman, D. P., Ylitalo, G. M., Sloan, C. a, Burrows, D. G., Hobbs, R. C., Mahoney, B. a, Yanagida, G. K., Calambokidis, J. et Moore, S. E. (2004). Stratification of lipids, fatty acids and organochlorine contaminants in blubber of white whales and killer whales. *Journal of Cetacean Research and Management*, 6(2), 175-189.
- Lair, S., Martineau, D. et Measures, L. N. (2014). *Causes of mortality in St. Lawrence Estuary beluga (Delphinapterus leuca) from 1983 to 2012*. [Research document]. DFO Canadian Science Advisory Secretariat. https://publications.gc.ca/collections/collection_2014/mpo-dfo/Fs70-5-2013-119-eng.pdf
- Lair, S., Measures, L. N. et Martineau, D. (2016, 1^{er} janvier). *Pathologic Findings and Trends in Mortality in the Beluga (Delphinapterus leucas) Population of the St Lawrence Estuary, Quebec, Canada, From 1983 to 2012*. *Veterinary Pathology*, 53(1), 22-36. SAGE Publications Inc. <https://doi.org/10.1177/0300985815604726>
- Lebeuf, M. (2009). La contamination du béluga de l'estuaire du Saint-Laurent par les polluants organiques persistants en revue. *Revue des sciences de l'eau*, 22(2), 199. <https://doi.org/10.7202/037482ar>
- Lebeuf, M., Measures, L., Noël, M., Raach, M. et Trottier, S. (2014). A twenty-one year temporal trend of persistent organic pollutants in St. Lawrence Estuary beluga, Canada. *Science of the Total Environment*, 485-486(1), 377-386. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.03.097>
- Lemos, L. S., Olsen, A., Smith, A., Chandler, T. E., Larson, S., Hunt, K. et Torres, L. G. (2020). Assessment of fecal steroid and thyroid hormone metabolites in eastern North Pacific gray whales. *Conservation Physiology*, 8(1). <https://academic.oup.com/conphys/article/8/1/coaa110/6025074>
- Lesage, V. (2021). The challenges of a small population exposed to multiple anthropogenic stressors and a changing climate: the St. Lawrence Estuary beluga. *Polar Research*, 40, 5523. <https://doi.org/10.33265/POLAR.V40.5523>

- Lesage, V., Lair, S., Turgeon, S. et Beland, P. (2020). Diet of St. Lawrence Estuary Beluga (*Delphinapterus leucas*) in a changing ecosystem. *The Canadian Field-Naturalist*, 134(1), 21-35. <https://doi.org/10.22621/CFN.V134I1.2421>
- Lesage, V., Measures, L., Mosnier, A., Lair, S., Michaud, R. et Béland, P. (2014). *Mortality patterns in St. Lawrence Estuary beluga (Delphinapterus leucas), inferred from the carcass recovery data, 1983-2012*. DFO Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/118.
- Louis, C., Dirtu, A. C., Stas, M., Guiot, Y., Malarvannan, G., Das, K., Costa, D. P., Crocker, D. E., Covaci, A. et Debier, C. (2014). Mobilisation of lipophilic pollutants from blubber in northern elephant seal pups (*Mirounga angustirostris*) during the post-weaning fast. *Environmental Research*, 132, 438-448. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2014.04.016>
- Mancino, G., Miro, C., di Cicco, E. et Dentice, M. (2021). Thyroid hormone action in epidermal development and homeostasis and its implications in the pathophysiology of the skin. *Journal of Endocrinological Investigation*, 44(8). <https://doi.org/10.1007/s40618-020-01492-2>
- Mansour, A. A. H., Mky, D. W., Lien, J., Orr, J. C., Banoub, J. H., Øien, N. et Stenson, G. (2002). Mansour, A. A., Mky, D. W., Lien, J., Orr, J. C., Banoub, J. H., Øien, N., & Stenson, G. (2002). Determination of pregnancy status from blubber samples in minke whales (*Balaenoptera acutorostrata*). *Marine Mammal Science*, 18(1), 112-120. <https://doi.org/10.1111/J.1748-7692.2002.TB01022.X>
- Martineau, D., Béland, P., Desjardins, C. et Lagacé, A. (1987). Levels of organochlorine chemicals in tissues of beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence Estuary, Québec, Canada. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 16(2). <https://doi.org/10.1007/BF01055795>
- Mazerolle, M. J. (2020). *AICcmodavg: Model Selection and Multimodel Inference Based on (Q)AIC(c)* (Version 2.3-1). R package.
- McKinney, M. A., Arukwe, A., de Guise, S., Martineau, D., Béland, P., Dallaire, A., Lair, S., Lebeuf, M., & Letcher, R. J. (2004). Characterization and profiling of hepatic cytochromes P450 and phase II xenobiotic-metabolizing enzymes in beluga whales (*Delphinapterus leucas*) from the St. Lawrence River Estuary and the Canadian Arctic. *Aquatic Toxicology*, 69(1). <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2004.04.010>
- McNabb, F. M. A. (1992). *Thyroid hormones*. Prentice Hall.
- Mee, J. F. (2008). Prevalence and risk factors for dystocia in dairy cattle: A review. *Veterinary Journal*, 176(1). <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.12.032>
- Mosnier, A., Doniol-Valcroze, T., Gosselin, J. F., Lesage, V., Measures, L. N. et Hammill, M. O. (2015). Insights into processes of population decline using an integrated population model: The case of the St. Lawrence Estuary beluga (*Delphinapterus leucas*). *Ecological Modelling*, 314, 15-31. <https://doi.org/10.1016/J.ECOLMODEL.2015.07.006>

- MPO. (2014). *Situation du béluga (Delphinapterus leucas) de l'estuaire du fleuve Saint-Laurent.*, 19.
- Obregon, M. J. (2014). *Adipose tissues and thyroid hormones.* *Frontiers in Physiology*, 5(Nov). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fphys.2014.00479>
- O'corry-Crowe, G. M. (2009). Beluga Whale: *Delphinapterus leucas.* *Encyclopedia of Marine Mammals*, 108-112. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373553-9.00030-4>
- Olivier, M. J. (2012). *Chimie de L'environnement.* Productions Jacques Bernier.
- Pallin, L., Robbins, J., Kellar, N., Bérubé, M. et Friedlaender, A. (2018). Validation of a blubber-based endocrine pregnancy test for humpback whales. *Conservation Physiology*, 6(1). <https://doi.org/10.1093/CONPHYS/COY031>
- Panciera, D. L., Purswell, B. J. et Kolster, K. A. (2007). Effect of short-term hypothyroidism on reproduction in the bitch. *Theriogenology*, 68(3), 316-321. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2007.04.026>
- Pelletier, M. et Rondeau, M. (2013). *Polybrominated diphenyl ethers in the suspended matter and sediments of the St. Lawrence River.* *Environment Canada.* https://publications.gc.ca/collections/collection_2014/ec/En14-67-2012-eng.pdf
- Pérez, S., García-López, Á., De Stephanis, R., Giménez, J., García-Tiscar, S., Verborgh, P., Juan, ·, Mancera, M. et Martínez-Rodríguez, G. (2011). Use of blubber levels of progesterone to determine pregnancy in free-ranging live cetaceans. *Mar Biol*, 158, 1677-1680. <https://doi.org/10.1007/s00227-011-1676-9>
- Plourde, S., Galbraith, P. S., Lesage, V., Grégoire, F., Bourdages, H., Gosselin, J.-F., McQuinn, I. et Scarratt, M. (2014). *Ecosystem perspective on changes and anomalies in the Gulf of St. Lawrence: a context in support of the management of the St. Lawrence beluga whale population.* Canadian Science Advisory Secretariat Research Document 2013/129. DFO Canadian Science Advisory Secretariat. https://publications.gc.ca/collections/collection_2014/mpo-dfo/Fs70-5-2013-129-eng.pdf
- Pucci, E., Chiovato, L. et Pinchera, A. (2000). Thyroid and lipid metabolism. *International Journal of Obesity*, 24, S109-S112. <https://doi.org/10.1038/sj.ijo.0801292>
- R Core Team. (2021). *R: A Language and Environment for Statistical Computing (4.1.1).* <https://www.r-project.org/>
- Reinling, J., Houde, M. et Verreault, J. (2017). Environmental exposure to a major urban wastewater effluent: Effects on the energy metabolism of northern pike. *Aquatic Toxicology*, 191(August), 131-140. <https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2017.08.003>
- Ren, X. M., Guo, L. H., Gao, Y., Zhang, B. T. et Wan, B. (2013). Hydroxylated polybrominated diphenyl ethers exhibit different activities on thyroid hormone receptors depending on their degree of bromination.

Toxicology and Applied Pharmacology, 268(3), 256-263.
<https://doi.org/10.1016/J.TAAP.2013.01.026>

Roberts, S. C., Bianco, A. C. et Stapleton, H. M. (2015). Disruption of Type 2 Iodothyronine Deiodinase Activity in Cultured Human Glial Cells by Polybrominated Diphenyl Ethers. *Chemical Research in Toxicology*, 28(6), 1265-1274.
https://doi.org/10.1021/ACS.CHEMRESTOX.5B00072/SUPPL_FILE/TX5B00072_SI_001.PDF

Routti, H., Diot, B., Panti, C., Duale, N., Fossi, M. C., Harju, M., Kovacs, K. M., Lydersen, C., Scotter, S. E., Villanger, G. D. et Bourgeon, S. (2019). Contaminants in Atlantic walrus in Svalbard Part 2: Relationships with endocrine and immune systems. *Environmental Pollution*, 246, 658-667.
<https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.11.097>

Safer, J. D., Crawford, T. M. et Holick, M. F. (2004). A Role for Thyroid Hormone in Wound Healing through Keratin Gene Expression. *Endocrinology*, 145(5), 2357-2361. <https://doi.org/10.1210/EN.2003-1696>

Santé Canada. (2005). *Votre santé et vous - BPC*. <https://www.canada.ca/fr/sante-canada/services/vie-saine/votre-sante-vous/environnement/bpc.html>

Senese, R., de Lange, P., Petito, G., Moreno, M., Goglia, F. et Lanni, A. (2018). 3,5-Diiodothyronine: A novel thyroid hormone metabolite and potent modulator of energy metabolism. *Frontiers in Endocrinology*, 9(JUL), 427. <https://doi.org/10.3389/FENDO.2018.00427/BIBTEX>

Sergeant, D. E. et Brodie, P. F. (1969). Body Size in White Whales, *Delphinapterus leucas*. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 26(10), 2561-2580. <https://doi.org/10.1139/f69-251>

Sergeant, D. E. et Hoek, W. (1988). An update of the status of white whales *Delphinapterus leucas* in the Saint Lawrence estuary, Canada. *Biological Conservation*, 45(4), 287-302.
[https://doi.org/10.1016/0006-3207\(88\)90060-2](https://doi.org/10.1016/0006-3207(88)90060-2)

Sheikh, I. A. et Beg, M. A. (2020). Structural studies on the endocrine-disrupting role of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in thyroid diseases. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(30).
<https://doi.org/10.1007/s11356-020-09913-8>

Simond, A. E., Houde, M., Lesage, V., Michaud, R. et Verreault, J. (2020). Metabolomic profiles of the endangered St. Lawrence Estuary beluga population and associations with organohalogen contaminants. *Science of the Total Environment*, 717, 137204.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.137204>

Simond, A. E., Houde, M., Lesage, V., Michaud, R., Zbinden, D. et Verreault, J. (2019). Associations between organohalogen exposure and thyroid-and steroid-related gene responses in St. Lawrence Estuary belugas and minke whales. *Marine Pollution Bulletin*, 145, 174-184.
<https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2019.05.029>

- Simond, A. E., Houde, M., Lesage, V. et Verreault, J. (2017). Temporal trends of PBDEs and emerging flame retardants in belugas from the St. Lawrence Estuary (Canada) and comparisons with minke whales and Canadian Arctic belugas. *Environmental Research*, 156, 494-504. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.03.058>
- Sonne, C., Siebert, U., Gonnsen, K., Desforges, J. P., Eulaers, I., Persson, S., Roos, A., Bäcklin, B. M., Kauhala, K., Tange Olsen, M., Harding, K. C., Treu, G., Galatius, A., Andersen-Ranberg, E., Gross, S., Lakemeyer, J., Lehnert, K., Lam, S. S., Peng, W. et Dietz, R. (2020). Health effects from contaminant exposure in Baltic Sea birds and marine mammals: A review. *Environment International*, 139, 105725. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.105725>
- St. Aubin, D. J., Deguise, S., Richard, P. R., Smith, T. G. et Geraci, J. R. (2001). Hematology and plasma chemistry as indicators of health and ecological status in beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Arctic*, 54(3), 317-331. <https://doi.org/10.14430/arctic791>
- St. Aubin, D. J., Smith, T. G. et Geraci, J. R. (1990). Seasonal epidermal molt in beluga whales, *Delphinapterus leucas*. *Canadian Journal of Zoology*, 68(2), 359-367. <https://doi.org/10.1139/z90-051>
- Tabuchi, M., Veldhoen, N., Dangerfield, N., Jeffries, S., Helbing, C. C. et Ross, P. S. (2006). PCB-related alteration of thyroid hormones and thyroid hormone receptor gene expression in free-ranging harbor seals (*Phoca vitulina*). *Environmental Health Perspectives*, 114(7), 1024-1031. <https://doi.org/10.1289/ehp.8661>
- Taylor, A. E., Keevil, B. et Huhtaniemi, I. T. (2015). Mass spectrometry and immunoassay: how to measure steroid hormones today and tomorrow. *European journal of endocrinology*, 173(2), D1-D12. <https://doi.org/10.1530/EJE-15-0338>
- Thambirajah, A. A., Wade, M. G., Verreault, J., Buisine, N., Alves, V. A., Langlois, V. S. et Helbing, C. C. (2022). Disruption by stealth - Interference of endocrine disrupting chemicals on hormonal crosstalk with thyroid axis function in humans and other animals. *Environmental Research*, 203. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2021.111906>
- Trana, M. R., Roth, J. D., Tomy, G. T., Anderson, W. G. et Ferguson, S. H. (2015). Influence of sample degradation and tissue depth on blubber cortisol in beluga whales. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 462, 8-13. <https://doi.org/10.1016/J.JEMBE.2014.10.010>
- UNEP. (2017). *The 16 New POPs*. <http://chm.pops.int/tabid/2511/Default.aspx>
- UNEP. (2019). *The 12 Initial POPs*. <http://www.pops.int/TheConvention/ThePOPs/The12InitialPOPs/tabid/296/Default.aspx>
- Villanger, G. D., Jenssen, B. M., Fjeldberg, R. R., Letcher, R. J., Muir, D. C. G., Kirkegaard, M., Sonne, C. et Dietz, R. (2011a). Exposure to mixtures of organohalogen contaminants and associative interactions

- with thyroid hormones in East Greenland polar bears (*Ursus maritimus*). *Environment International*, 37(4), 694-708. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2011.01.012>
- Villanger, G. D., Lydersen, C., Kovacs, K. M., Lie, E., Skaare, J. U. et Jenssen, B. M. (2011b). Disruptive effects of persistent organohalogen contaminants on thyroid function in white whales (*Delphinapterus leucas*) from Svalbard. *Science of the Total Environment*, 409(13), 2511-2524. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.03.014>
- Wang, Y., Chen, T., Sun, Y., Zhao, X., Zheng, D., Jing, L., Zhou, X., Sun, Z. et Shi, Z. (2019). A comparison of the thyroid disruption induced by decabrominated diphenyl ethers (BDE-209) and decabromodiphenyl ethane (DBDPE) in rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 174, 224-235. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2019.02.080>
- Wasser, S. K., Lundin, J. I., Ayres, K., Seely, E., Giles, D., Balcomb, K., Hempelmann, J., Parsons, K. et Booth, R. (2017). Population growth is limited by nutritional impacts on pregnancy success in endangered Southern Resident killer whales (*Orcinus orca*). *PLOS ONE*, 12(6), e0179824. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0179824>
- West, K. L., Ramer, J., Brown, J. L., Sweeney, J., Hanahoe, E. M., Reidarson, T., Proudfoot, J. et Bergfelt, D. R. (2014). Thyroid hormone concentrations in relation to age, sex, pregnancy, and perinatal loss in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *General and Comparative Endocrinology*, 197, 73-81.
- Zhou, T., Taylor, M. M., De Vito, M. J. et Crofton, K. M. (2002). Developmental exposure to brominated diphenyl ethers results in thyroid hormone disruption. *Toxicological Sciences*. <https://doi.org/10.1093/toxsci/66.1.105>
- Zoeller, R. T., Tan, S. W. et Tyl, R. W. (2007). General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis. *Critical Reviews in Toxicology*, 37(1-2), 11-53. <https://doi.org/10.1080/10408440601123446>