UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

EFFETS DE L'EXPOSITION À L'EFFLUENT DE MONTRÉAL SUR LE MÉTABOLISME ÉNERGÉTIQUE DU GRAND BROCHET

MÉMOIRE PRÉSENTÉ COMME EXIGENCE PARTIELLE DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

> PAR JULIE REINLING

> > AOÛT 2017

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.07-2011). 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.»

AVANT-PROPOS

Ce projet de maîtrise s'inscrit dans le cadre des programmes de recherche de Jonathan Verreault et de Magali Houde qui visent à mieux comprendre les sources, la bioaccumulation et les modes d'action des contaminants émergents, ainsi que leurs impacts sur la santé des espèces aviaires et aquatiques. Fruit d'une collaboration entre l'Université du Québec à Montréal et Environnement et Changement climatique Canada, cette étude a eu pour but d'évaluer les effets chroniques liés à l'exposition à l'effluent de Montréal sur le métabolisme énergétique du grand brochet, un poisson prédateur d'importance pour l'écosystème du fleuve Saint-Laurent. À l'heure actuelle, les effluents municipaux représentent toujours une menace pour l'intégrité des écosystèmes aquatiques en raison des nombreux contaminants qu'ils renferment. Dans un tel contexte, un projet comme celui-ci s'avère tout à fait pertinent et représente un intérêt environnemental certain.

Des recherches antérieures ont suggéré que l'effluent de Montréal était une source majeure de retardateurs de flamme halogénés tels que les polybromodiphényléthers, c'est pourquoi une emphase particulière a été mise sur cette classe de contaminants dont la toxicité est attestée. Ainsi, l'approche adoptée a consisté à mesurer les réponses physiologiques des brochets exposés à plusieurs niveaux de leur organisation biologique et à les mettre en relation avec les concentrations tissulaires de retardateurs de flamme. Cette étude a permis de mettre en lumière l'existence d'une perturbation à plusieurs échelles du métabolisme énergétique du grand brochet qui est liée à l'exposition aux rejets urbains de Montréal. Elle a également révélé le potentiel d'utilisation des polybromodiphényléthers en tant que traceurs chimiques de l'exposition à l'effluent de Montréal chez une espèce située au sommet de la chaîne alimentaire. Les résultats présentés dans le chapitre 2 de ce mémoire ont fait l'objet d'un article qui a été accepté pour publication dans la revue *Aquatic Toxicology*.

Avant d'entrer dans le vif du sujet, je tiens tout d'abord à remercier sincèrement mes superviseurs de recherches, Jonathan Verreault et Magali Houde, pour la confiance qu'ils m'ont accordée et pour la qualité de leur encadrement. Grâce à eux, j'ai appris à faire preuve de rigueur scientifique, qualité nécessaire à tout jeune bon chercheur en devenir. J'aimerais donc leur adresser un énorme merci pour leur disponibilité et leurs précieux conseils, pour leurs encouragements et pour les opportunités qu'ils m'ont données de communiquer mes recherches, sans parler de l'excellente ambiance de travail qu'ils savent instaurer au sein de leurs équipes.

Je remercie le CRSNG et Environnement et Changement climatique Canada pour l'octroi des fonds de recherches accordés à Jonathan Verreault et à Magali Houde qui m'ont permis de bénéficier d'une bourse d'études tout au long de ma maîtrise. Merci également à la Faculté des sciences de l'UQÀM qui m'a accordé la bourse d'excellence pour les cycles supérieurs (FARE) durant deux années consécutives. Ce support financier m'a permis de me consacrer pleinement à mon projet de recherche.

J'aimerais remercier Ling Wang, notre technicienne de laboratoire qui a réalisé les analyses chimiques de mes échantillons. Ling qui œuvre dans l'ombre mais dont le rôle est crucial dans la production des résultats et dans l'avancement de nos recherches. Merci également à Romy Técher, Maeva Giraudo et Mélanie Douville qui m'ont formée aux techniques et aux bonnes pratiques de laboratoire qui m'ont permis de réaliser mes analyses génétiques et enzymatiques avec succès. Ces analyses n'auraient évidemment pas été possibles sans l'aide de l'équipe de terrain pour la collecte des échantillons. Merci à Conrad Beauvais, Germain Brault, Guillaume Cottin, Mélanie Douville, Magali Houde, Mélanie Lépine, Martin Pilote et Caroline Robert.

Je remercie également du fond du cœur mes collègues et amis : Anthony François, Manon Sorais, Romy Técher, Chloé F. Desjardins, Antoine Simond, Christine Dépatie, Pierre-Luc Gagné, Marie-Line Gentes et Ludovick Brown; pour leur support, pour les dîners animés dans la salle du TOXEN, mais aussi pour les sorties, toutes nos belles discussions et nos rires. Vous côtoyez durant ces trois années a été un réel plaisir et une grande source de joie, même dans les moments plus difficiles. Grâce à votre amitié et à votre bonne humeur, vous avez contribué à la réussite de ce projet et fait en sorte que mon passage dans ce laboratoire soit une expérience des plus agréables. Merci.

V

Il ne serait possible de passer à côté des remerciements que j'aimerais adresser à ma famille. À mes parents, à ma sœur et à mes nièces, qui m'ont toujours encouragée et soutenue dans mes choix, malgré la distance physique qui nous sépare. À vous qui n'avez jamais douté de ma réussite, même lorsque je traversais des périodes de découragement.

Et enfin, un immense merci à Louis-Philippe qui a toujours été en première ligne et d'un soutien incroyable, autant dans les bons que dans les mauvais moments qui ont jalonné ce parcours. Tu as été mon pilier durant toute cette aventure.

TABLE DES MATIÈRES

AVA	NT-PROPOSiii
TAB	LE DES MATIÈRESvii
LIST	E DES FIGURESxi
LIST	E DES TABLEAUXxiii
LIST	E DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMESxv
RÉS	UMÉxvii
INTE	RODUCTION1
CHA ÉTA	PITRE I T DES CONNAISSANCES
1.1	La problématique environnementale des effluents municipaux5
	1.1.1 Limites et pertinence du sujet
	1.1.2 Effets délétères associés à l'exposition aux effluents municipaux chez les poissons
1.2	L'effluent de Montréal : une source de contamination en polluants organiques et inorganiques pour le fleuve Saint-Laurent
	1.2.1 La station d'épuration des eaux usées de Montréal9
	1.2.2 Un effluent pollué
	1.2.3 La signature de l'effluent de Montréal dans les tissus des poissons 13
	1.2.4 Toxicité de l'effluent de Montréal14
1.3	Évaluer les impacts des effluents municipaux sur le métabolisme énergétique lipidique des poissons
	1.3.1 Les lipides : une source énergétique essentielle pour les poissons
	1.3.2 Le métabolisme lipidique et l'implication des hormones thyroïdiennes

	1.3.3 Perturbation du métabolisme énergétique à plusieurs niveaux biologi chez les poissons exposés à des effluents municipaux	ques 21
1.4	Objectifs de l'étude	26
CHA ENV EFF	APITRE II VIRONMENTAL EXPOSURE TO A MAJOR URBAN WASTEWATER 'LUENT: EFFECTS ON THE ENERGY METABOLISM OF NORTHERN	PIKE 29
2.1	Abstract	30
2.2	Introduction	32
2.3	Materials and methods	34
	2.3.1 Field sampling	34
	2.3.2 Age and sex determination	35
	2.3.3 Chemical analysis	36
	2.3.4 RNA extraction and reverse transcription	37
	2.3.5 Primer design	38
	2.3.6 Real-time quantitative PCR analysis	39
	2.3.7 ACOX activity determination	39
	2.3.8 T ₃ analysis	40
	2.3.9 Statistical analysis	40
2.4	Results	41
	2.4.1 Differences between sexes	41
	2.4.2 HFR concentrations in liver	42
	2.4.3 Gene mRNA levels in liver	45
	2.4.4 Hepatic ACOX activity	48
	2.4.5 Circulating T ₃ levels	49
	2.4.6 Total hepatic lipid content and body condition	50
2.5	Discussion	51
	2.5.1 HFR concentrations in liver	51
	2.5.2 Transcriptional and ACOX activity responses to effluent exposure	52
	2.5.3 Disturbance of thyroid hormone homeostasis	54

viii

	2.5.4 Total hepatic lipid reserves and body condition	56
	2.5.5 Association between biological responses and PBDE concentrations	57
2.6	Conclusions	58
2.7	Acknowledgments	59
2.8	Supporting information	60
2.9	References	62
CON	NCLUSIONS GÉNÉRALES	69
BIB	LIOGRAPHIE	71

ix



LISTE DES FIGURES

Page

Figure

l.1	Point de déversement et panache de dispersion de l'effluent de l'île de Montréal (d'après Gagné <i>et al.</i> , 2004)
1.2.	Représentations A) d'une molécule de triacylglycérol composée d'un résidu glycérol auquel sont estérifiées trois chaines d'acides gras; B) de l'acide phosphatidique, structure de base des glycérophospholipides (Tocher, 2003).17
1.3.	Représentation schématique du métabolisme des acides gras chez les poissons d'eau douce. ACOX : acyl-coA oxydase; FABP : <i>fatty acid binding protein</i> ; FAS : <i>fatty acid synthase</i> ; PPAR : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes; TAG : triacylglycérol
1.4.	PPAR γ : structure et mode de régulation de la transcription des gènes chez les vertébrés. a) La structure de PPAR γ comprend un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de liaison au ligand C-terminal et deux domaines d'activation, AF-1 étant ligand indépendant et AF-2 ligand dépendant. b) PPAR γ forme un hétérodimère avec RXR et se lie à l'élément de réponse de PPAR situé en

induit le recrutement de co-activateurs et le déplacement de co-répresseurs ainsi 2.1. Relative abundance (fold-change; mean \pm SEM) of A) *acox1* and B) *fasn* in liver of female (n = 33) and male (n = 15) northern pike collected 4 km upstream and 4 km downstream of the Montreal's WWTP in the St. Lawrence River (QC, Canada). T-tests were performed on log₁₀-transformed data. Foldchange value < 1 indicates a down-regulation, while fold-change value > 1

amont des gènes ciblés. La liaison des ligands (endogènes ou xénobiotiques)

Relationship between hepatic concentrations of Σ_{34} PBDE (ng/g ww) and fold-2.2. change values of the transcription of acoxI in liver of male (n = 15) northern pike collected 4 km upstream (triangle) and 4 km downstream (dot) of the Montreal's WWTP in the St. Lawrence River (QC, Canada). [rho = -0.57; p =

- 2.5. Sampling sites in the St. Lawrence River (QC, Canada) in June 2014 and 2015

xii

LISTE DES TABLEAUX

Tabl	Page
2.1.	Genes, symbols and primers used for RT-qPCR analysis in northern pike liver
2.2.	Mean (\pm SEM) and range (in parenthesis) of age, morphological variables, ACOX activity and circulating T ₃ levels in northern pike collected upstream and downstream of the Montreal's WWTP in the St. Lawrence River (QC, Canada)
2.3.	Concentrations [mean \pm SEM (range); ng/g wet weight] of halogenated flame retardants in liver of northern pike collected upstream and downstream of the Montreal's WWTP in the St. Lawrence River. Means were provided if at least 50% of the samples had concentrations of the compound greater than the method limits of quantification (MLOQ)
2.4.	Mean \pm SEM (range) for age and morphological variables of northern pike collected upstream and downstream of Montreal's WWTP (QC, Canada)61
2.5.	Relative abundance (fold-change; mean \pm SEM) of selected genes in liver of female (n = 33) and male (n = 15) northern pike collected 4 km upstream and 4 km downstream of the Montreal's WWTP. Gene transcription is expressed as fold-change of mRNA levels in each site compared to the mean value of all samples. Significant difference in relative abundance between sites is indicated in bold



LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

ACADVL	Acyl-coenzyme A déshydrogénase
ACOX	Acyl-coenzyme A oxydase
ATP	Adénosine triphosphate
BEHTBP	Bis(2-ethylhexyl)-tétrabromophthalate
BPA	Bisphénol A
BPC	Biphényls polychlorés
CAT	Catalase
CHREBP	Carbohydrate-responsive element-binding protein
СР	Chlordene Plus
Cq	Quantification cycle
DBDPE	Decabromodiphenyl ethane
DBO	Demande biologique en oxygène
DCO	Demande chimique en oxygène
Dec	Dechlorane
DEHP	Phthalate de bis(2-éthylhexyle)
DP	Dechlorane Plus
E ₂	17β-estradiol
ECNI	Electron capture negative ionization
EE ₂	17α-éthinylestradiol
FABP	Fatty acid binding protein
FAS	Fatty acid synthase
FT ₃	Free triiodothyronine
GC	Gas chromatography
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HBB	Hexabromobenzene

xvi

HFR	Halogenated flame retardant
LXR	Liver X receptor
MLOD	Method limits of detection
MLOQ	Method limits of quantification
MS	Mass spectrometry
MWWE	Municipal wastewater effluent
OBIND	Octabromo-1,3,3-trimethyl-1-phenylindan
PBB	Polybrominated biphenyls
PBDE	Polybromodiphényléthers/Polybrominated diphenylethers
PBEB	Pentabromoéthylbenzène/Pentabromoethylbenzene
PBT	Polybutylene terephthalate
PFOA	Acide perfluorooctanoïque
PPAR	Peroxisome proliferator-activated receptors
RFH	Retardateur de flamme halogéné
RIA	Radioimmunoassay
ROS	Reactive oxygen species/espèces réactives de l'oxygène
RXR	Retinoid X receptor
SOD	Superoxyde dismutase
SREBP1	Sterol regulatory element-binding protein-1c
SRM	Standard reference material
T ₃	Triiodothyronine
T_4	Thyroxine
TT ₃	Total triiodothyronine
TTR	Transthyretin
WWTP	Wastewater treatment plant

RÉSUMÉ

Les effluents municipaux sont des sources de contamination environnementale qui peuvent affecter les organismes des milieux récepteurs à plusieurs niveaux de leur organisation biologique. L'effluent de Montréal constitue un apport important au fleuve Saint-Laurent en retardateurs de flamme halogénés (RFH) tels que les polybromodiphényléthers (PBDE), des composés toxiques, bioaccumulables et persistants. De fortes concentrations de RFH ont récemment été rapportées chez trois espèces de poissons échantillonnées en aval du point de déversement des eaux traitées, ainsi qu'une altération des niveaux de transcription des gènes et une modification de l'activité d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique, suggérant une perturbation de celui-ci. Ce projet de maîtrise a eu pour but d'étudier les relations entre l'exposition chronique à cet effluent et de potentiels effets sur le métabolisme lipidique du grand brochet (Esox lucius), une espèce sédentaire située au sommet de la chaîne trophique. Le premier objectif visait à évaluer l'impact de l'exposition à l'effluent sur l'expression de certains gènes impliqués dans la synthèse, le transport et la dégradation des acides gras, ainsi que sur l'activité l'acyl-coA oxydase (ACOX), une enzyme clé de leur catabolisme. Le deuxième objectif a consisté à déterminer si l'exposition à l'effluent pouvait altérer les niveaux d'hormones thyroïdiennes circulantes, puisque celles-ci interviennent dans la régulation de la lipogenèse et la lipolyse. Enfin, il s'agissait de déterminer si les réserves lipidiques hépatiques et la condition générale des brochets exposés pouvaient être affectées. Une importante exposition à l'effluent a été confirmée par des concentrations élevées de PBDE dans le foie des brochets échantillonnés dans le panache de l'effluent. Chez les mâles, cette exposition a été associée avec une diminution de la transcription des gènes acox1 (acyl-coenzyme A oxydase) et fasn (fatty acid synthase) qui sont respectivement impliqués dans le catabolisme et la synthèse des lipides, ainsi qu'avec une diminution de l'activité de l'ACOX dans le foie. Une élévation des niveaux de triiodothyronine dans le plasma et une tendance à l'augmentation du pourcentage de lipides totaux dans le foie a été observée chez les femelles exposées à l'effluent comparativement au site en amont de la station d'épuration. Cette étude indique que chez le brochet, l'exposition chronique à l'effluent de Montréal est associée à des effets sur le métabolisme des acides gras qui sont spécifiques au sexe et qui se manifestent par une diminution de la transcription (acox et fasn) et de l'activité (ACOX) d'enzymes lipolytiques et par une altération de l'homéostasie thyroïdienne.

Mots clés : retardateurs de flamme halogénés; effluents municipaux; métabolisme lipidique; transcription des gènes; hormones thyroïdiennes; ACOX; poissons.

xviii

INTRODUCTION

Composés d'un mélange complexe et fluctuant de polluants d'origine anthropique, les effluents municipaux représentent d'importantes sources de contamination environnementale (Holeton *et al.*, 2011 ; Luo *et al.*, 2014 ; Racz et Goel, 2010). Le déversement d'eaux usées partiellement traitées constitue un apport continu de composés biologiques et chimiques potentiellement nuisibles pour les milieux aquatiques récepteurs. L'exposition chronique des organismes aquatiques à ces eaux peut induire des effets délétères qui se manifestent à plusieurs niveaux de l'organisation biologique des individus, ce qui peut éventuellement avoir des répercussions à l'échelle des populations.

Chez les poissons, l'exposition à des effluents municipaux *in situ* et en laboratoire a notamment été associée à des effets œstrogéniques (Liney *et al.*, 2006 ; Vajda *et al.*, 2011), à une altération des fonctions reproductrices et immunitaires (Aravindakshan *et al.*, 2004; Ings *et al.*, 2011 ; Ménard *et al.*, 2010 ; Tetreault *et al.*, 2011, 2012 ; Vajda *et al.*, 2008) et à du stress oxydatif (Houde *et al.*, 2013, 2014a ; Petala *et al.*, 2009). L'observation de changements dans l'expression des gènes reliés au métabolisme du glucose, du glycogène et des lipides (Bahamonde *et al.*, 2015 ; Hasenbein *et al.*, 2014 ; McElroy *et al.*, 2015 ; Vidal-Dorsch *et al.*, 2013b) suggère que le métabolisme énergétique des poissons exposés à des effluents urbains peut être impacté, ce qui se traduit également au niveau de l'activité de certaines enzymes impliquées dans ces processus (Houde *et al.*, 2014a ; Ings *et al.*, 2012 ; Rodrigues *et al.*, 2015). À la différence des mammifères dont le métabolisme énergétique repose essentiellement sur les glucides (Bruslé et Quignard, 2005), pour de nombreuses espèces de poissons l'utilisation des lipides représente la principale source d'énergie

et est indispensable à de nombreux processus physiologiques tels que la croissance, la reproduction, ou la locomotion (Tocher, 2003). Il est donc essentiel de mieux comprendre comment l'exposition à des effluents municipaux peut perturber le métabolisme lipidique des poissons et quelles conséquences cela peut avoir à l'échelle de l'individus, dans la mesure où d'autres processus physiologiques tels que la reproduction peuvent être indirectement affectés.

Les volumes d'eaux usées traités par la station d'épuration de Montréal en font une des plus importantes en Amérique du Nord et l'effluent qu'elle génère renferme une grande variété de contaminants (Marcogliese *et al.*, 2015). Il a été suggéré que cet effluent était la source locale principale de polybromodiphényléthers (PBDE) dans le fleuve Saint-Laurent (Pelletier et Rondeau, 2013; Houde *et al.*, 2014a, 2014b). Peu d'informations sont disponibles sur la contamination des poissons présents dans le fleuve à proximité de Montréal et plus particulièrement dans le panache de l'effluent. En effet, la plupart des recherches qui se sont intéressées aux effets écologiques des polluants présents dans le fleuve se sont concentrées sur les lacs fluviaux Saint-François, Saint-Louis et Saint-Pierre (Marcogliese *et al.*, 2015).

Les retardateurs de flamme halogénés (RFH) – dont les PBDE font partie – suscitent l'intérêt des chercheurs depuis la fin des années 1980. Utilisés pour en réduire l'inflammabilité, ces additifs sont incorporés dans une multitude de matériaux (plastiques, textiles, polymères synthétiques, produits électroniques, mousses de rembourrage) (Covaci *et al.*, 2011) et sont maintenant retrouvés dans tous les compartiments de l'environnement (eau, air, sédiments, biote), y compris dans des régions très éloignées des sources de production et d'utilisation (de Wit, 2010). La persistance, la toxicité et le fort potentiel de bioaccumulation de ces composés sont préoccupantes tant pour la faune que pour l'être humain (Law *et al.*, 2014 ; Linares *et al.*, 2015). C'est le cas des PBDE dont la structure chimique est similaire à celles des hormones thyroïdiennes et qui sont des perturbateurs endocriniens reconnus, notamment chez les poissons (Noyes et Stapleton, 2014). Métabolisables et

hautement lipophiles, les PBDE sont transférés le long de la chaîne trophique, y compris dans les milieux aquatiques (Kelly *et al.*, 2008; Law *et al.*, 2006 ; Nilsen *et al.*, 2014 ; Roberts *et al.*, 2011).

D'importantes concentrations de RFH ont été mesurées chez la perchaude (*Perca flavescens*), le grand brochet (*Esox lucius*) et le masquinongé (*Esox masquinongy*) échantillonnés en aval du point de déversement de l'effluent de Montréal relativement à un site de référence en amont (Houde *et al.*, 2014b). Prédateur opportuniste, le grand brochet se nourrit à différents niveaux trophiques. Bien que l'essentiel de son régime alimentaire soit composé de poissons tels que perchaudes, meuniers (*Catostomus spp.*), crapets (*Lepomis spp.*) et cyprinidés, le grand brochet n'est pas exclusivement piscivore et peut consommer à l'occasion insectes, grenouilles, rongeurs ou canetons (Bernatchez et Giroux, 2012). Cette espèce est relativement sédentaire, sauf pendant la fraie, et est abondamment présente dans le fleuve Saint-Laurent où elle peut vivre jusqu'à 12 ans. Par son mode de vie et son régime alimentaire, le brochet qui fréquente les eaux de l'est de l'île de Montréal est donc exposé de manière chronique à l'effluent de la ville, ce qui en fait un sujet d'étude particulièrement intéressant.

Ce projet a pour objectif de déterminer si l'exposition chronique à l'effluent de Montréal peut être associée à des effets sur le métabolisme lipidique du grand brochet, en adoptant une approche basée sur une comparaison entre un site en amont et un site en aval de la station d'épuration. Une emphase particulière a été mise sur les PBDE dont les concentrations tissulaires ont été utilisées comme traceurs chimiques de l'exposition à l'effluent. Un ensemble de biomarqueurs allant de la transcription des gènes à la condition générale des individus ont été utilisés dans le but de mieux comprendre les impacts biologiques de l'exposition à des rejets urbains chez une espèce située au sommet de la chaîne trophique aquatique.

Ce document est présenté sous la forme d'un mémoire par article et se divise en deux chapitres. Le premier expose l'état des connaissances actuel de la problématique liée

aux effluents municipaux et à la perturbation du métabolisme énergétique lipidique des poissons, où l'accent sera mis sur le cas de Montréal. Le deuxième chapitre, rédigé en anglais et sous la forme d'un article scientifique, porte sur la variation de certains marqueurs du métabolisme lipidique du brochet exposé à l'effluent de Montréal.

4

CHAPITRE I

ÉTAT DES CONNAISSANCES

1.1 La problématique environnementale des effluents municipaux

1.1.1 Limites et pertinence du sujet

Les organismes aquatiques qui vivent dans les écosystèmes recevant un apport d'effluents urbains sont exposés de façon chronique à des mélanges complexes de polluants dont les modes d'action peuvent être très différents. La problématique des effluents municipaux est particulière puisque ces derniers exercent de multiples effets biologiques qui peuvent parfois se combiner (Liney et al., 2006), ce qui les rend d'autant plus difficiles à comprendre et à prévoir. En effet, l'impact individuel d'un contaminant peut varier selon qu'il fait partie ou non d'un mélange. Bizarro et collaborateurs (2016) ont exposé des cellules hépatiques de morue atlantique (Gadus morhua) à du chlorpyrifos, du phthalate de bis(2-éthylhexyle) (DEHP), de l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) et à du 17α -éthinylestradiol (EE₂) pendant 24 à 48h, afin de mesurer les effets de ces contaminants présents dans les effluents municipaux sur la transcription de gènes intervenant dans différents processus métaboliques. Les cellules hépatiques ont été exposées à un seul composé à la fois (chlorpyrifos, DEHP, PFOA : 0,1-100 μ M; EE₂ : 0,01-10 μ M; concentrations finales) ou à un mélange des 4, à la plus faible concentration utilisée lors des tests individuels (EE₂ 0,01 μ M; chlorpyrifos, DEHP, PFOA 0,1 µM) ou à des concentrations environnementales (EE₂ 0,01 µM; chlorpyrifos 0,1 µM; DEHP et PFOA 1 µM). Les auteurs ont constaté que lorsque ces composés étaient testés individuellement, seul le EE2 avait un effet significatif sur les niveaux de transcription des gènes cyp1a1, cyp3a, fabp et vtga. L'exposition au mélange de chlorpyrifos, DEHP, PFOA et EE₂ provoquait un changement des niveaux de transcription des gènes cyp3a, fabp et vtga qui suivaient le même patron que les résultats obtenus suite à l'exposition au EE₂ seul, mais à des concentrations plus faibles de EE2. En revanche, plus aucun effet n'a été observé sur la transcription de *cyp1a1*. De plus, bien que les niveaux de transcription des gènes hmg-CoA et cyp24a1 n'étaient pas affectés lors des scénarios d'exposition individuelle, ils l'étaient suite à l'exposition au mélange de chlorpyrifos, DEHP, PFOA et EE₂. Ainsi, l'exposition à un mélange peut provoquer des effets différents de ceux qui sont induits par l'action isolée des contaminants qui composent ce mélange, ce qui est parfois qualifié d'« effet cocktail » (Celander et al., 2011). Or jusqu'à présent, il existe encore peu d'information sur les effets des mélanges de contaminants sur les poissons (Celander et al., 2011; Corcoran et al., 2010; Overturf et al., 2015).

Notre compréhension des effets délétères sur le vivant des contaminants contenus dans les effluents repose bien souvent sur l'étude des réponses biologiques observées dans le cadre d'un scénario d'exposition ponctuel à une substance individuelle. Bien qu'essentielles, ces études ne sont cependant pas représentatives de la réalité environnementale dans laquelle les organismes ne sont jamais exposés à un seul composé. De plus, la complexité des interactions potentielles entre les contaminants (ex. synergie, additivité, antagonisme) empêche toute extrapolation aux expositions environnementales. C'est pourquoi, les études *in situ* ont toute leur importance dans un contexte d'évaluation de la toxicité des effluents municipaux. En outre, les caractéristiques physico-chimiques des effluents, la méthode de traitement des eaux usées et les caractéristiques du milieu récepteur peuvent également influencer l'impact des effluents sur les organismes aquatiques (Holeton *et al.*, 2011; Luo *et al.*,

2014; Petala *et al.*, 2009; Rayne et Ikonomou, 2005; Vidal-Dorsch *et al.*, 2013b) et doivent donc être pris en considération. Enfin, établir un lien entre l'exposition à un effluent et des effets chez l'organisme exposé représente un défi puisqu'il n'est pas possible d'attribuer ceux-ci à un contaminant spécifique (Ings *et al.*, 2012) et que d'autres types de stress peuvent entrer en jeu (ex. : exposition à une plus grande concentration de micro-organismes pathogènes).

1.1.2 Effets délétères associés à l'exposition aux effluents municipaux chez les poissons

Les impacts des effluents municipaux sur la santé des poissons sont multiples et touchent plusieurs systèmes physiologiques et ce à différents niveaux de l'organisation biologique. Parmi les impacts qui sont rapportés dans la littérature, plusieurs études ont établi un lien entre l'exposition chronique à des effluents municipaux et une altération des fonctions reproductrices chez les poissons. Celles-ci se manifestent notamment par une diminution de la taille des gonades, une réduction du nombre de spermatozoïdes, du succès de la fertilisation et de la survie après éclosion, par une élévation des niveaux de vitellogénine dans le plasma et une féminisation des mâles (intersexe) chez le meunier noir (*Catostomus commersoni*), le méné à grosse tête (Pimephales promelas) et le dard arc-en-ciel (Etheostoma caeruleum) (Bahamonde et al., 2014, 2015; Fuzzen et al., 2015; Vajda et al. 2008, 2011). L'absence d'expression de certaines caractéristiques sexuelles secondaires (tubercules nuptiaux, ovipositeur) ainsi qu'une diminution du comportement sexuel compétitif des mâles pour la protection du nid ont également été rapportés chez le méné à grosse tête exposé pendant deux à quatre semaines à des effluents, in situ ou en conditions contrôlées (Garcia-Revero et al., 2011; Vajda et al., 2011; Vidal-Dorsch et al., 2013b).

L'impact des effluents municipaux se traduit également par des changements au niveau de la transcription des gènes qui indiquent que divers processus physiologiques tels que la reproduction, les réponses immunitaires, la réponse au stress oxydatif ou le métabolisme des xénobiotiques peuvent être affectés. Ainsi, Bahamonde et collaborateurs (2015) ont constaté que les gènes impliqués dans l'oogenèse et le développement des spermatides étaient respectivement sur- et sousrégulés dans les gonades des dards arc-en-ciel mâles collectés en aval des stations d'épuration de Waterloo, Kitchener et Guelph (Ontario), et présentant un intersexe. Cette même étude rapporte également une sous-régulation des gènes impliqués dans l'éclosion, l'ovulation, le métabolisme des stéroïdes et les réponses immunitaires et inflammatoires dans les gonades des femelles. Chez la truite arc-en-ciel (Oncorhynchus mykiss) exposée en cage à différentes concentrations d'un effluent tertiaire pendant 14 jours, Ings et collaborateurs (2011) ont mesuré des changements dans l'expression hépatique de nombreux gènes liés à la réponse au stress, aux récepteurs hormonaux et aux fonctions immunitaires. Cette réponse transcriptomique semble varier en fonction du type de traitement des eaux usées qui est appliqué dans les stations d'épuration. L'analyse du transcriptome hépatique du méné à grosse tête exposé en laboratoire à 5% d'un effluent primaire avancé ou secondaire pendant 14 jours a révélé que seuls 10% des gènes différemment exprimés étaient communs aux deux groupes (Vidal-Dorsch et al., 2013b). Il s'agissait principalement de gènes impliqués dans les mécanismes de lutte contre le stress oxydatif, de détoxification des xénobiotiques, dans la réponse immunitaire et les fonctions endocrines. Dans le groupe exposé à l'effluent primaire, ce sont surtout des gènes impliqués dans le métabolisme des stéroïdes et le transport des lipides qui étaient affectés, tandis qu'une exposition à l'effluent secondaire touchait davantage les voies de signalisation cellulaire.

Les réponses induites par l'exposition aux effluents peuvent se manifester rapidement et varier selon la durée d'exposition. Une exposition à une dilution à 0,5% d'un

8

effluent secondaire d'une station de recherche pendant 96h était suffisante pour constater des changements au niveau de l'activité d'enzymes intervenant dans le métabolisme des glucides (glucose-6-phosphatase, glycogène phosphorylase) et dans les mécanismes de défense anti-oxydante (glutathion S-transférase, superoxyde dismuatase, catalase) ainsi qu'une altération de la glycémie et de la triglycéridémie chez le colin de Kerguelen (*Nothothenia rosii*) et la bocasse à tête massive (*Notothenia coriiceps*), deux espèces antarctiques (Rodrigues *et al.*, 2015). Une diminution du contenu hépatique en glycogène et un changement d'activité de la phosphoenolpyruvate carboxykinase (enzyme gluconéogenique), de la pyruvate kinase et de l'hexokinase (enzymes glycolytiques) qui variait selon la durée d'exposition (2, 8 ou 14 jours) et le pourcentage de dilution de l'effluent municipal (0, 20 ou 90%) ont été rapportées chez la truite arc-en-ciel (Ings *et al.*, 2012).

L'impact biologique des effluents municipaux s'exerce donc de différentes manières chez les espèces ichtyologiques et peut varier d'un effluent à l'autre. L'évaluation du potentiel toxique d'un effluent nécessite donc une certaine connaissance du milieu ainsi qu'une caractérisation chimique de ces eaux qui sont déversées dans l'environnement aquatique avoisinant.

1.2 L'effluent de Montréal : une source de contamination en polluants organiques et inorganiques pour le fleuve Saint-Laurent

1.2.1 La station d'épuration des eaux usées de Montréal

Avec ses 3,9 millions d'habitants recensés en 2016, la Communauté métropolitaine de Montréal constitue le centre urbain le plus important le long du fleuve Saint-Laurent et concentre 48% de la population du Québec (Communauté métropolitaine de Montréal, [s.d]). À Montréal, le réseau des égouts combine la collecte des eaux usées domestiques, industrielles et de ruissellement sur 63% du territoire (Boulay *et*

al., 1999). Ces eaux sont acheminées jusqu'à la station d'épuration située à la pointe est de l'île. Inaugurée en 1984, il s'agit de la plus grande installation du genre en Amérique du Nord en termes de volume d'eau traitée (Boulay *et al.*, 1999; Marcogliese *et al.*, 2015). La station d'épuration de Montréal prend en charge près de la moitié du volume des eaux usées de la province. Chaque jour, elle déverse entre 2,5 et 7,6 millions de m³ d'eau dans le fleuve Saint-Laurent selon les conditions météorologiques (Marcogliese *et al.*, 2009; Moreira, 2011), ce qui représente le plus important volume d'eau traitée rejeté dans cet écosystème fluvial (Marcogliese *et al.*, 2015). Au sein de la Communauté métropolitaine de Montréal, les rejets de la station d'épuration contribuent à eux seuls à 72% de la charge de matières en suspension et à 66% de la charge du phosphore total qui sont apportées au fleuve (Moreira, 2011).

Les eaux usées de la ville font l'objet d'un traitement primaire avancé qui a pour objectif premier d'éliminer les particules en suspension par floculation chimique grâce à l'ajout de sel ferrique et d'un polymère anionique (Marcogliese *et al.*, 2015). L'effluent qui en résulte est directement déversé dans le fleuve Saint-Laurent à environ 4,5 km du rivage via une canalisation souterraine située à 7 m de profondeur (Fig.1.1) (Pham et Proulx, 1997). Ce type de traitement sert avant tout à retirer la matière organique présente dans l'eau, ce qui permet de réduire les concentrations des contaminants hydrophobes à faible solubilité dans l'eau (dont les RFH font partie) qui ont une grande affinité pour les particules en suspension (Pham et Proulx, 1997). En revanche, il s'avère relativement inefficace (et n'a d'ailleurs pas été conçu dans cette optique) pour éliminer les contaminants tels que les substances pharmaceutiques ou les hormones (Behera *et al.*, 2011 ; Carballa *et al.*, 2004).

Une unité de désinfection de l'eau par ozonation est actuellement en cours d'installation à Montréal et devrait être opérationnelle en 2018 (Ville de Montréal, [s.d.]). Les résultats générés par le présent projet pourraient donc servir de point de comparaison avant/après installation de ce système d'ozonation, afin d'en évaluer les possibles répercussions sur les concentrations en RFH rejetées dans le fleuve.

10



Figure 1.1 Point de déversement et panache de dispersion de l'effluent de l'île de Montréal (d'après Gagné *et al.*, 2004)

1.2.2 Un effluent pollué

L'effluent de Montréal contient une large gamme de polluants. On y retrouve des métaux (Gagnon et Saulnier, 2003; Gobeil *et al.*, 2005), des biphényls polychlorés (BPC) et des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Pham *et al.*, 1999), mais aussi des contaminants organiques émergents tels que des produits pharmaceutiques et de soins corporels (Lajeunesse et Gagnon, 2007; Lajeunesse *et al.*, 2008) et des retardateurs de flamme (Pelletier et Rondeau, 2013). Depuis 2009, le penta- et l'octa-bromodiphényléther, deux des trois mélanges commerciaux des PBDE, sont inscrits dans l'annexe A de la Convention de Stockholm sur les polluants organiques persistants dont le Canada est signataire. Cette convention exige que les parties prennent des mesures pour éliminer la production et l'usage de ces substances

et pour en réduire les rejets dans l'environnement. Au Canada, les congénères tetra-, penta-, hexa-, hepta-, octa-, nona- et decaBDE ont été ajoutés à l'annexe 1 du *Règlement sur certaines substances toxiques* (2012) en 2016 qui en interdit la fabrication, l'utilisation, la vente, la mise en vente ou l'importation. Ces restrictions ne s'appliquent cependant pas aux produits manufacturés qui contiennent ces PBDE.

Les PBDE sont présents dans le fleuve Saint-Laurent. Il existe potentiellement 209 congénères de PBDE qui sont numérotés selon le nombre et la position des atomes de brome sur les anneaux aromatiques de la molécule. En 2013, Pelletier et Rondeau ont publié un document qui fait état de la situation et des variations spatiales et temporelles des concentrations de PBDE dans le fleuve. Les auteurs y ont rapporté que le BDE-28, -47, -49, -66, -85, -99, - 100, -153, -183 et -209 sont les congénères de PBDE les plus souvent détectés dans l'eau et dans les sédiments des trois lacs fluviaux (lac Saint-François, lac Saint-Louis et lac Saint-Pierre), le BDE-209 atteignant des niveaux plus élevées que la somme des concentrations des BDE-17, -28, -47, -49, -66, -71, -77, -85, -99, -100, -119, -126, -138, -153, -154, -156, -183, -184, -191, -196, -197, -206 et -207 dans les sédiments de surface. Dans les matières en suspension, la concentration médiane de Σ_{23} PBDE augmente d'amont en aval, passant de 8 ng/g au niveau de Carillon à 25,4 ng/g au niveau Lavaltrie, tandis que la concentration médiane de BDE-209 passe de 14 ng/g à la décharge du lac Ontario ou à l'embouchure de la rivière des Outaouais à 50 ng/g au niveau de Québec. Dans les sédiments des lacs fluviaux, les concentrations médianes de Σ_{23} PBDE suivent le même patron et sont 9 fois plus élevées au Lac Saint-Pierre qu'au Lac Saint-François alors que la concentration médiane de BDE-209 varie peu entre ces deux lacs. Ces résultats suggèrent que Montréal et sa rive nord contribuent de manière importante à l'enrichissement du fleuve en PBDE autres que le BDE-209 dont l'apport ne peut être seulement imputable à ces émissaires urbains mais également à des sources atmosphériques et aux Grands Lacs (Pelletier et Rondeau, 2013).

1.2.3 La signature de l'effluent de Montréal dans les tissus des poissons

Non seulement présents dans l'eau de surface et les sédiments du fleuve, ces contaminants sont également détectés dans les tissus de certains organismes, dont certaines espèces de poissons. Laliberté (2011) a constaté que les teneurs en PBDE dans des échantillons de chair de doré jaune (Sander vitreus), de grand brochet (Esox lucius) et de perchaude (Perca flavescens) étaient plus élevées chez les individus collectés au lac Saint-Pierre situé en aval de la station d'épuration de Montréal que chez les poissons provenant du lac Saint-François situé en amont de cette station. L'auteur en a conclu que l'effluent de Montréal était une source majeure de PBDE dans le fleuve Saint-Laurent. Cette conclusion est partagée par Houde et collaborateurs (2014b) qui ont constaté que les concentrations de PBDE dans les poissons capturés en aval de la station d'épuration de Montréal (foie du maskinongé [Esox masquinongy] et du brochet et perchaude entière) étaient plus importantes qu'en amont. Sur les 38 congénères de PBDE et les 16 retardateurs de flamme émergents qui ont été mesurés, ce sont les PBDE qui ont été les plus abondamment détectés chez les trois espèces susmentionnées. À l'exception des BDE-171, -203, -205, -206 et -208, tous les congénères ont été détectés et ce sont les BDE-47, -99, -100, -49 et -153 qui étaient dominants, dans des proportions qui variaient selon l'espèce. La concentration des PBDE totaux pour la perchaude, le brochet et le maskinongé était en moyenne de 963 ± 126 , 2876 ± 533 et 3873 ± 2260 ng/g l.w. (*lipid weight*) respectivement. Les concentrations maximales atteintes pour ces trois espèces étaient de 2480, 5971 et 24 115 ng/g l.w. Le BDE-209, le congénère le plus abondant dans les matières en suspension et dans les sédiments (Pelletier et Rondeau, 2013), a aussi été retrouvé dans les tissus des poissons (Houde et al., 2014b). En plus des PBDE, 12 retardateurs de flamme émergents ont été détectés dans le foie des brochets et des maskinongés, dont le bis(2-ethylhexyl)-tétrabromophthalate (BEHTBP), le pentabromoéthylbenzène (PBEB), le Dechlorane Plus (isomères anti

and *syn*), le Dechlorane (Dec) 602, -604, et -604 CB et le Chlordene Plus (CP). Leurs concentrations totales moyennes étaient de $15,1 \pm 4,3$ ng/g l.w. chez le brochet et de 179 ± 162 ng/g l.w. chez le maskinongé (Houde *et al.*, 2014b).

1.2.4 Toxicité de l'effluent de Montréal

Dans les 20 dernières années, plusieurs études ont été réalisées dans les eaux du fleuve Saint-Laurent à proximité de l'île de Montréal et en laboratoire, afin d'évaluer la toxicité de cet effluent sur les invertébrés aquatiques et sur les poissons. Gagné et Blaise (1995) ont constaté que l'exposition *in vitro* de cultures primaires d'hépatocytes de truite arc-en-ciel à l'effluent provoquait une augmentation de la transcription des gènes de la métallothionéine et du cytochrome P450 1A1. Ils ont associé cette réponse à la présence de métaux traces toxiques et de composés coplanaires capables d'activer le récepteur aux hydrocarbures aromatiques (AhR). La même observation a été faite chez des brochets du fleuve Saint-Laurent (Houde *et al.*, 2013). L'exposition à l'effluent a également été associée à un stress oxydatif qui se manifestait par une augmentation de l'activité d'enzymes qui protègent la cellule contre les effets oxydatifs des espèces réactives de l'oxygène (ROS) comme la catalase (CAT) dans le foie et la superoxyde dismutase (SOD) dans les muscles de la perchaude (Houde *et al.*, 2014a).

Le système immunitaire des organismes aquatiques est également affecté par l'effluent de Montréal. On a notamment rapporté une diminution de l'immunocompétence chez des bivalves encagés pendant 60 jours à 4 km en aval de la station d'épuration (Blaise *et al.*, 2002) et chez des juvéniles de truite arc-en-ciel exposés en laboratoire à différentes concentrations de l'effluent (Salo *et al.*, 2007; Hébert *et al.*, 2008). De plus, en milieu naturel l'effluent induit une modulation de l'expression des gènes impliqués dans le système immunitaire chez la perchaude (Houde *et al.*, 2014b), ce qui suggère la présence de composés immunotoxiques dans

l'effluent. Ainsi, les perchaudes capturées en aval de la station d'épuration sousexprimaient les gènes C1q-like 1, C1q-like 2, C1qC-like qui codent pour des protéines impliquées dans l'activation du système du complément, un ensemble de protéines plasmatiques impliquées dans la réponse immunitaire. Une sous-expression du gène de la microglobuline bêta 2, un des composants du complexe majeur d'histocompatibilité, et celui du *g-type lysozyme*, une protéine du système immunitaire inné impliquée dans la défense contre les pathogènes, a également été constatée chez ces individus. Arstikaitis et collaborateurs (2014), quant à eux, ont mesuré une altération du niveau de transcription hépatique de 1300 gènes, dont beaucoup étaient impliqués dans l'apoptose, la réponse immunitaire et le métabolisme cellulaire, chez le méné à grosse tête immature exposé en laboratoire à l'effluent dilué à 0 ou 20% pendant 21 jours.

En outre, plusieurs indices indiquent que certaines substances présentes dans l'effluent peuvent agir comme perturbateurs endocriniens en provoquant une augmentation de l'expression de la vitellogénine et de son activité plasmatique chez le mené queue à tâche noire mâle (*Notropis hudsonius*) et chez le brochet du fleuve Saint-Laurent (Aravindakshan *et al.*, 2004; Houde *et al.*, 2013). L'exposition chronique à l'effluent a également été associée à une féminisation des mâles (phénomène d'intersexe) et une altération des fonctions reproductrices (diminution de la concentration et de la motilité des spermatozoïdes et altération de la spermatogenèse) chez le mené queue à tâche noire (Aravindakshan *et al.*, 2004).

1.3 Évaluer les impacts des effluents municipaux sur le métabolisme énergétique lipidique des poissons

1.3.1 Les lipides : une source énergétique essentielle pour les poissons

Avec les protéines, les lipides sont les constituants organiques principaux des tissus des poissons et sont indispensables à de nombreux processus physiologiques tels que la croissance, la reproduction, la locomotion ou encore la migration chez certaines espèces comme le saumon atlantique (*Salmo salar*) (Eddy et Handy, 2012; Tocher, 2003). Les protéines servent également à la production de glucose par gluconéogenèse. L'importance des glucides quant à elle est relativement faible chez les poissons, en particulier chez les espèces d'eau froide et les espèces marines (Bruslé et Quignard, 2005). À la différence des mammifères, le métabolisme énergétique des poissons ne repose pas sur l'utilisation des glucides qui sont plus difficiles à mobiliser (exception faite du glycogène hépatique), mais sur l'utilisation des protéines et des lipides. Les lipides sont donc une source d'énergie préférentielle et servent à économiser les protéines, surtout chez les espèces carnivores dont les réserves glucidiques sont faibles (Bruslé et Quignard, 2005).

Assimilés via l'alimentation sous la forme de triacylglycérols ou de glycérophospholipides (Fig.1.2), ou synthétisés *de novo* à partir de l'acétyl-coA, les acides gras (une des catégories de lipides) sont métabolisés pour remplir diverses fonctions au sein de l'organisme. Chez les poissons, ils entrent notamment dans la composition des phospholipides membranaires (Henderson, 1996), mais servent avant tout à la production d'énergie et à la formation de réserves sous la forme de triacylglycérols qui sont déposés dans le foie, les muscles, les tissus adipeux mésentériques et les œufs (Ackman, 1980 cité dans Sprague *et al.*, 2012; Bruslé et Quignard, 2005). Leur catabolisme par ß-oxydation est la principale source d'énergie pour de nombreuses espèces de poissons (Tocher, 2003).



Figure 1.2. Représentations A) d'une molécule de triacylglycérol composée d'un résidu glycérol auquel sont estérifiées trois chaines d'acides gras; B) de l'acide phosphatidique, structure de base des glycérophospholipides (Tocher, 2003)

La nage requiert la majeure partie des besoins énergétiques des poissons, mais le succès reproducteur dépend lui aussi de la mobilisation des ressources énergétiques. Un apport suffisant en acides aminés et en acides gras spécifiques qui varient selon les espèces est indispensable à la biosynthèse hépatique de la vitellogénine, une protéine qui amorce la formation du jaune dans les œufs (Bruslé et Quignard, 2005). Medford et Mackay (1978) ont remarqué que le contenu lipidique et protéique des gonades des brochets augmentait significativement avant la période de reproduction. Chez les deux sexes, le poids du foie était à son plus bas niveau après la fraie (qui a lieu en avril-mai), ce qui correspond à une réduction de 2,5 fois par rapport au poids mesuré avant la fraie. Chez la femelle, la taille du foie diminue de façon significative avant la fraie, soit durant la dernière phase de croissance des gonades. Jusqu'à 40% des réserves lipidiques qui sont mobilisées peuvent être transférés aux œufs. Même si les œufs des brochets sont relativement pauvres en lipides (moins de 5% du poids

frais) comparativement aux œufs d'autres espèces, ces lipides sont largement utilisés pendant l'embryogenèse et lors du développement des premiers stades larvaires (Tocher, 2003). Chez les mâles, c'est pendant la fraie que la diminution de la taille du foie a lieu (Medford et Mackay, 1978).

1.3.2 Le métabolisme lipidique et l'implication des hormones thyroïdiennes dans sa régulation



Figure 1.3. Représentation schématique du métabolisme des acides gras chez les poissons d'eau douce. ACOX : acyl-coA oxydase; FABP : *fatty acid binding protein*; FAS : *fatty acid synthase*; PPAR : récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes; TAG : triacylglycérol.

L'homéostasie des lipides repose sur l'équilibre entre la lipolyse (catabolisme des acides gras par ß-oxydation mitochondriale ou peroxysomale) et la lipogenèse
(biosynthèse des acides gras). Lors de la première étape de la lipolyse, l'hydrolyse des liaisons esters du triacylglycérol provenant de l'alimentation ou des réserves corporelles libère les acides gras qui peuvent ensuite être utilisés pour produire de l'énergie (Tocher, 2003) (Fig. 1.3). Leur transport intracellulaire est assuré par la *fatty acid-binding protein* (FABP), une protéine cytoplasmique dont la transcription est induite et régulée par les récepteurs activés par les proliférateurs de peroxysomes (PPAR), ce qui a notamment été démontré chez le poisson zèbre (*Danio rerio*) (Laprairie *et al.*, 2016). Les PPAR sont des récepteurs nucléaires qui jouent un rôle clé dans la régulation du métabolisme lipidique en modulant l'expression des gènes qui codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme des acides gras (Varga *et al.* 2011). Les trois isotypes qui existent chez les vertébrés (α , β/δ et γ) ont été caractérisés chez les poissons et se sont avérés être des homologues des gènes *ppar* des mammifères (Leaver *et al.*, 2005). Olivares-Rubio et Vega-López (2016) ont répertorié 149 séquences de gènes qui ont été identifiées comme étant des gènes codant pour des PPAR, dont 23 pour les Salmoniformes et 8 pour les Esociformes.

La ß-oxydation des acides gras est un processus de dégradation biochimique qui est catalysé dans les mitochondries et les peroxysomes et qui requiert une panoplie d'enzymes qui sont propres à chacun de ces organites (Olivares-Rubio et Vega-López, 2016). Elle aboutit à la formation d'acétyl-coA qui est utilisé pour produire de l'adénosine triphosphate (ATP) nécessaire à la plupart des réactions chimiques qui ont lieu dans l'organisme (Fig. 1.3). La ß-oxydation des acides gras à très longue chaîne a lieu dans les peroxysomes, des organites qui sont également impliqués dans d'autres processus cellulaires liés au métabolisme des lipides et à l'homéostasie des radicaux libres (Cajaraville *et al.* 2003). Ils contiennent des enzymes qui catabolisent les acides gras, les acides aminés et les purines, mais qui interviennent aussi dans la synthèse des acides biliaires, des plasmalogènes (une classe de glycérophospholipides membranaires qui joueraient un rôle dans la protection contre les oxydants) (Boeymans *et al.*, 1995) et du cholestérol. Parmi ces enzymes, l'acyl-coenzyme A

oxydase (ACOX) joue un rôle prépondérant dans le catabolisme des acides gras puisqu'elle catalyse et limite la première réaction de la β-oxydation peroxysomale (Poirier *et al.*, 2006) (Fig. 1.3).

Lors de la lipogenèse, de nouveaux lipides endogènes sont synthétisés à partir de l'acétyl-coA formés dans les mitochondries. Ce processus est catalysé par la *fatty acid synthase* (FAS) (Fig. 1.3), un complexe multienzymatique du cytosol qui a été caractérisé chez les poissons (Sargent, 1989). L'acide palmitique (16:0) et l'acide stéarique (18:0), deux acides gras saturés, sont les principaux produits de cette réaction (Sargent, 1989).

Les hormones thyroïdiennes, soit la thyroxine (T_4) et sa forme biologiquement active, la triiodothyronine (T_3) , interviennent aussi dans la régulation des métabolismes des lipides dans le foie, autant au niveau de la lipolyse que de la lipogenèse (Sinha et al., 2014). Elles peuvent notamment interagir avec certains récepteurs nucléaires tels que le liver X receptor (LXR), le retinoid X receptor (RXR) ou les PPAR (Leaver et al., 2005; Liu et Brent, 2010). Chez la souris, Hashimoto et collègues (2006; 2007; 2009) ont montré que les hormones thyroïdiennes augmentent l'expression des facteurs de transcription tels que la sterol regulatory element-binding protein-lc (SREBP1), la carbohydrate-responsive element-binding protein (CHREBP) et LXR qui régulent l'expression de gènes impliqués dans la lipogenèse. Les hormones thyroïdiennes augmentent également la transcription d'enzymes lipogéniques telles que l'acétyl-coA carboxylase, l'enzyme malique ou la FAS chez la souris (Sinha et al., 2014). Le fonctionnement de l'axe thyroïdien des poissons est moins bien connu que celui des mammifères. Cependant, il semblerait que les hormones thyroïdiennes jouent un rôle similaire dans la régulation du métabolisme lipidique chez ces deux groupes, en parallèle d'autres hormones également impliquées dans ce processus (ex.: hormone de croissance, insuline-like growth factor, hormone adrénocorticotropique, corticostéroïdes, adrénaline, noradrénaline). En effet, l'axe thyroïdien est très conservé parmi les vertébrés (Norris, 2007).

Chez la carpe commune (*Cyprinus carpio*) et la truite arc-en-ciel, l'administration de T_4 a augmenté les niveaux d'acides gras plasmatiques et diminué la graisse abdominale (Barrington *et al.*, 1961; Murat et Serfaty, 1970). L'exposition en aquarium à des concentrations de T_4 de 500 µg/L a aussi provoqué une diminution des réserves lipidiques hépatiques et viscérales ainsi qu'une augmentation des niveaux d'acides gras dans les tissus adipeux chez l'omble de fontaine (*Salvenilus fontinalis*) (Narayansingh et Eales, 1975). La Roche et collègues (1965) ont pour leur part constaté une augmentation des dépôts lipidiques viscéraux après ablation de la thyroïde chez la truite arc-en-ciel.

1.3.3 Perturbation du métabolisme énergétique à plusieurs niveaux biologiques chez les poissons exposés à des effluents municipaux

De nombreux contaminants environnementaux présents dans les effluents municipaux (BPC, hydrocarbures aromatiques halogénés planaires, HAP, pesticides organochlorés et organophosphorés, carbamates, phénols, perchlorates, métaux, RFH et produits pharmaceutiques) peuvent affecter les hormones thyroïdiennes des poissons au niveau de leur synthèse, de leur transport, de leur métabolisme ou de leurs actions, selon différents modes d'action qui ne sont pas toujours élucidés (Brown et al., 2004). Les perturbations de l'axe thyroïdien pourraient indirectement affecter le métabolisme énergétique des poissons. Ainsi, les perchaudes du lac Saint-Louis (au sud de l'île de Montréal) exposées in situ à des contaminants organiques et à des métaux présentaient une augmentation de niveaux de T3 et des réserves de glycogène hépatique, mais une diminution des niveaux de T4, ainsi qu'une diminution de la taille des gonades et du facteur de condition (Hontela et al., 1995). Dans la baie de San Francisco, milieu fortement impacté par les activités anthropiques, on a rapporté une altération des niveaux plasmatiques de T4, de T3 et du ratio T3/T4 qui variait selon les sites d'échantillonnage et qui étaient corrélés aux concentrations de BPC dans le foie (négativement pour T_4 et positivement pour T_3 et T_3/T_4) chez deux espèces de poissons, soit *Cymatogaster aggregata* et *Leptocottus armatus* (Brar *et al.*, 2010).

Moens et collègues (2007) ont remarqué qu'un grand nombre des gènes dont l'expression avait été modifiée suite à l'exposition en laboratoire à un effluent industriel (eaux traitées en trois étapes par une station d'épuration privée) étaient impliqués dans le métabolisme énergétique, et plus précisément dans le métabolisme des lipides et des glucides, dans le métabolisme énergétique mitochondrial et dans les processus digestifs chez la carpe commune. D'après les auteurs, la sous-expression de la glucokinase et d'une sous-unité de la protéine phosphatase 1 observée avait pour effet d'augmenter la dégradation du glycogène et de diminuer sa synthèse. Plusieurs gènes codant pour des protéines de transport de la famille des apolipoprotéines étaient aussi régulés à la baisse alors que les gènes impliqués dans les processus digestifs étaient régulés à la hausse (i.e., carboxyl ester lipase, amylase alpha 2a, carboxypeptidase A, précurseur de la chymotrypsin A [clone], précurseur de l'elastase 1 [clone], protéine Ela2 protein, trypsine, syncolline [clone]).

De plus, des études menées en laboratoire et sur le terrain ont montré que de nombreux contaminants environnementaux (HAP, esters de phtalates, BPC, pesticides, alkylphénols et estrogènes notamment) pouvaient également induire une augmentation du nombre et de la taille des peroxysomes (prolifération peroxysomale) chez les poissons, et que cette réponse est régulée par les PPAR (Cajaraville *et. al.* 2003). Ces auteurs recommandent l'utilisation de la prolifération peroxysomale comme marqueur d'exposition dans l'optique d'évaluer une contamination environnementale dans les milieux aquatiques par le biais de la mesure de l'activité de l'ACOX. En effet, la prolifération peroxysomale va de pair avec l'induction de 3 enzymes clé liées à la ß-oxydation peroxysomale: l'ACOX, l'hydratase-déshydrogénase-isomérase peroxysomale et la thiolase. La mesure de l'activité de ces enzymes est généralement indicatrice d'une prolifération peroxysomale qui implique

l'expression de gènes spécifiques. Cette transcription des gènes requiert l'activation des PPAR (Fig.1.4) par des ligands qui peuvent être des composés endogènes tels que les acides gras ou les eicosanoïdes, mais aussi des xénobiotiques (Cajaraville *et. al.* 2003; Holth *et al.*, 2011).



Figure 1.4. PPAR γ : structure et mode de régulation de la transcription des gènes chez les vertébrés. a) La structure de PPAR γ comprend un domaine de liaison à l'ADN, un domaine de liaison au ligand C-terminal et deux domaines d'activation, AF-1 étant ligand indépendant et AF-2 ligand dépendant. b) PPAR γ forme un hétérodimère avec RXR et se lie à l'élément de réponse de PPAR situé en amont des gènes ciblés. La liaison des ligands (endogènes ou xénobiotiques) induit le recrutement de coactivateurs et le déplacement de co-répresseurs ainsi que la transcription des gènes (d'après Savage, 2005)

Dans une étude génomique de Houde et collaborateurs (2014a), il a été démontré que les perchaudes pêchées en aval de l'émissaire de Montréal sur-exprimaient le gène codant pour l'ACOX ainsi que des gènes codant pour des enzymes liées à la voie des pentoses-phosphates (glucose-6-phosphate déshydrogénase), au cycle de Krebs (acylcoenzyme A synthétase) et à la phosphorylation oxydative (ATP synthase et cytochrome-c oxydase). En revanche, les gènes codant pour le récepteur activé par les proliférateurs de peroxysomes gamma (PPARγ) et pour l'acyl-coenzyme A déshydrogénase (ACADVL), une enzyme qui catalyse la première étape de la βoxydation dans les mitochondries, étaient sous-exprimés. Le niveau de transcription de l'ACOX était positivement corrélé avec les concentrations tissulaires de plusieurs congénères de PBDE. De plus, l'exposition à cet effluent a été associée à une diminution de l'activité de l'ACOX, de la cytochrome-c oxydase (dernière enzyme de la chaîne de transport des électrons dans les mitochondries) et de la nucléoside diphosphate kinase (production d'adénosine disphosphate et de guanosine triphosphate) dans les muscles des perchaudes.

Une étude menée sur l'éperlan du delta (Hypomesus transpacificus) exposé en laboratoire à l'effluent de Sacramento (CA) a rapporté une régulation à la baisse des gènes impliqués dans le processus de phosphorylation oxydative (ATPeV54kD), du métabolisme de l'acide arachidonique (PTGES), des sphingolipides (ASAH1) et des glycérophospholipides (PCYT2), et une régulation à la hausse de la fatty acid binding-protein 2 intestinale (FABP2), en plus d'impacts sur les mécanismes de réparation de l'ADN et de traitement de l'ARN (Hasenbein et al., 2014). De plus, l'analyse par micropuce des gènes gonadiques du dard arc-en-ciel a révélé que l'exposition à effluent de Kitchener (ON) était associé à la sur-régulation d'une centaine de gènes impliqués dans le transport et la dégradation des lipides (dont fabp1), autant chez les mâles que chez les femelles, comparativement à un site de référence situé en amont (Bahamonde et al., 2015). Une analyse moléculaire similaire (par micropuce toujours) a été effectuée en Californie sur les tissus hépatiques du méné à grosse tête et du turbot (Pleuronichthys verticalis) exposé en laboratoire à un effluent primaire avancé et à un effluent secondaire (Vidal-Dorsch et al., 2013a, 2013b). Les auteurs ont constaté une altération des niveaux de transcription hépatique de nombreux gènes impliqués dans le métabolisme et le transport des lipides (dont *ppara*) et des glucides.

L'impact des effluents se traduit également au niveau des réserves énergétiques et sur leur utilisation par les poissons. Driedger et collaborateurs (2009) ont comparé les concentrations de triacylglycérols (carcasse complète) chez les juvéniles de 3 espèces (méné à grosse tête, meunier noir et mulet à cornes [Semotilus atromaculatus]) capturés dans une rivière recevant un apport d'effluent minier et municipal dans la région de Sudbury (ON) et à un site de référence. Ils ont constaté que les ménés à grosse tête exposés à ces effluents étaient plus gros et présentaient des niveaux de triacylglycérols plus élevés que ceux mesurés au site de référence. Ils ont suggéré que ces observations pouvaient être une conséquence indirecte de la consommation d'invertébrés de meilleure qualité nutritive en raison de l'apport en azote et en phosphore imputable aux effluents. En Belgique, après 28 jours d'exposition en laboratoire de poissons zèbres à différentes dilutions d'un effluent industriel (processus de traitement en 3 étapes d'une capacité équivalente à 43 000 habitants), une diminution des budgets lipidique et glycogénique et une augmentation du budget protéinique ont été mesurées (Smolders et al., 2003). À 50 et 75% de l'effluent, les auteurs se sont aperçus que les poissons utilisaient davantage leur énergie pour la maintenance (synthèse de protéines) que pour le stockage (sous forme de glycogène), sans pour autant que le budget énergétique total ne change. En revanche, à 100% de l'effluent le budget énergétique total était affecté. L'explication suggérée par les auteurs est celle d'un changement dans l'allocation des ressources visant à combattre le stress causé par l'exposition à l'effluent, qui pourrait avoir des répercussions indirectes sur d'autres processus physiologiques tels que le maintien de l'homéostasie énergétique.

L'exposition des poissons à un effluent urbain peut donc provoquer une cascade d'évènements en débutant par une altération au niveau de la transcription de gènes impliqués dans le métabolisme énergétique, ce qui peut avoir des répercussions sur les activités enzymatiques qui y sont associées et provoquer un changement au niveau du profil des acides gras et des réserves disponibles pour l'animal. Ultimement, de tels changements peuvent avoir des conséquences négatives sur la condition générale du poisson. Pour l'estimer, c'est habituellement l'indice de Fulton qui est utilisé. Cet indice qui correspond au ratio entre le poids et la taille de l'animal (Chellappa *et al.*, 1995) est couramment utilisé comme indicateur de l'accumulation de réserves énergétiques (Gauthier *et al.*, 2008; 2011). Il s'agit d'un indicateur sensible qui permet de détecter la détérioration de la condition générale des poissons.

1.4 Objectifs de l'étude

Cette étude a eu pour objectif global d'évaluer les effets de l'effluent de la ville de Montréal sur le métabolisme énergétique lipidique du grand brochet du fleuve Saint-Laurent. De nombreux RFH ont été quantifiés dans cet effluent et sont accumulés dans les tissus de plusieurs espèces de poissons habitant ces eaux. Une attention toute particulière a donc été accordée à cette classe de contaminants. Le but de ce projet était d'étudier les réponses biologiques du brochet exposé à l'effluent de Montréal en utilisant une série de biomarqueurs allant de la transcription des gènes à la condition physique. L'approche adoptée a consisté à comparer les concentrations hépatiques de RFH et les réponses des marqueurs du métabolisme des acides gras chez des brochets échantillonnés en amont et en aval du point de déversement de l'effluent de Montréal dans le fleuve Saint-Laurent.

Plus spécifiquement, cette étude visait à :

 Évaluer l'effet de l'exposition à l'effluent sur la transcription des gènes acox1, fapb, fasn et ppary, qui sont impliqués dans le métabolisme des acides gras, ainsi que sur l'activité de l'enzyme lipolytique ACOX dans le foie. En effet, la modulation de l'expression des gènes est un des premiers éléments de réponse chez les organismes exposés à des stresseurs environnementaux. Ainsi, le niveau de transcription des gènes impliqués dans la synthèse, la dégradation et le transport des lipides acides gras devrait être différent chez les poissons vivant en amont et en aval de la station d'épuration. D'autre part, puisque le niveau de transcription des gènes peut moduler la synthèse des protéines, une variation de la transcription du gène qui code pour l'ACOX pourrait également se traduire par une variation de l'activité de cette enzyme dans le foie.

Hypothèse : Comme de nombreuses catégories de polluants induisent une prolifération peroxysomale et que cette réponse est régulée par les PPAR, il était attendu que les gènes *ppary* et *acox1* soient surexprimés en aval de la station d'épuration et que l'activité de l'ACOX soit plus importante en aval comparativement au site en amont. Une surexpression du gène codant pour la FABP intestinale a été associée avec l'exposition à un effluent municipal chez l'éperlan du delta (Hasenbein *et al.*, 2014), c'est pourquoi il était également attendu que le gène *fabpl* soit surexprimé chez les brochets exposé à l'effluent de Montréal. Enfin, si le catabolisme des acides gras devrait être augmenté, leur synthèse devrait être diminuée et le gène *fasn* sous-exprimé dans le foie des brochets de l'effluent. Le niveau de transcription de ces gènes et le niveau d'activité de l'ACOX devraient pouvoir être mis en relation avec les concentrations hépatiques de RFH.

2) Évaluer l'effet de l'exposition à l'effluent sur les niveaux de T₃ dans le plasma. Les hormones thyroïdiennes exercent un rôle important dans la production d'énergie, la thermorégulation et la régulation du métabolisme énergétique, ce qui peut avoir des conséquences sur les réserves énergétiques des organismes. Il s'agissait donc de déterminer si les niveaux de T₃ circulantes variaient selon un gradient amont/aval.

Hypothèse : De nombreux polluants organiques tels que les PBDE ont un effet sur la régulation thyroïdienne. C'est pourquoi il était attendu que les concentrations d'hormones thyroïdiennes soient plus faibles en aval qu'en amont du point de déversement de l'effluent, et que ces variations puissent être associées d'une part avec les concentrations hépatiques de RFH, et d'autre part avec le niveau de transcription des gènes *acox1*, *fapbl*, *fasn* et *ppary* et avec l'activité de l'ACOX.

 Déterminer si l'exposition à l'effluent a un impact au niveau des réserves énergétiques hépatiques des brochets (pourcentage de lipides totaux et indice de Fulton).

Hypothèse : Si l'effluent a un impact négatif sur le métabolisme lipidique des brochets, alors l'indice de Fulton et le pourcentage de lipides totaux dans le foie devraient être plus faibles en aval qu'en amont, et être négativement corrélés avec les concentrations hépatiques de RFH

CHAPITRE II

ENVIRONMENTAL EXPOSURE TO A MAJOR URBAN WASTEWATER EFFLUENT: EFFECTS ON THE ENERGY METABOLISM OF NORTHERN PIKE

Julie Reinling^a, Magali Houde^{b*}, Jonathan Verreault^a

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

^b Environment and Climate Change Canada, 105 McGill Street, Montreal, QC, H2Y 2E7, Canada

2.1 Abstract

Municipal wastewater effluents (MWWEs) consist of dynamic and complex mixtures of chemical and biological compounds that can alter the health of exposed aquatic organisms. Disturbance of energy metabolism has been reported in exposed fish, however there is a lack of knowledge on the physiological events leading to perturbation of energy metabolism and related lipid and thyroid hormone homeostasis. The objective of the present study was to use a set of biomarkers, from gene transcription to body condition, to investigate the effects of a chronic environmental exposure to a major primary MWWE on fatty acid metabolism and thyroid hormone levels in northern pike (Esox lucius) collected from the St. Lawrence River near Montreal (QC, Canada). The exposure of pike to MWWE was examined through determination of a suite of persistent and bioaccumulative halogenated flame retardants in liver as this effluent is a known regional source for these chemicals. Greater hepatic concentrations of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs, range: 29.6-465 ng/g ww and 88.8-823 ng/g ww in females and males, respectively) and other halogenated flame retardants (e.g., dechlorane-related compounds) were determined in fish collected downstream of the MWWE's point of discharge relative to the upstream site. This exposure in male pike was associated with decreased acylcoA oxidase (acox1) and fatty acid synthase (fasn) mRNA levels as well as a decreased acyl-coA oxidase activity in liver. In female pike, MWWE exposure was associated with lower circulating free and total triiodothyronine (T_3) levels and a tendency for greater total lipid percentages in liver. Present findings provide evidence that chronic exposure of a top predator fish to MWWE can be related to genderspecific effects on fatty acid metabolism as well as perturbation of thyroid hormone homeostasis, and highlight the need for further investigation.

Keywords: St. Lawrence River; Fish; Halogenated flame retardant; Dechloranes; Gene transcription; Thyroid hormone; Lipid metabolism.

2.2 Introduction

Municipal wastewater effluents (MWWEs) are one of the largest inputs of contaminants into surface waters (Heberer, 2002; Luo et al., 2014; Racz and Goel, 2010). Despite improvements in collection and treatment of wastewaters, the continuous discharge of treated effluents still raises concern with respect to their impact on receiving ecosystems and aquatic organisms (Holeton et al. 2011). MWWEs are complex mixtures of biological and chemical compounds, and exposure to these treated waters in fish have been linked to perturbation of reproductive (Vajda et al., 2008) and immune functions (Arstikaitis et al., 2014; Houde et al., 2014a; Ings et al., 2011). Perturbation of energy metabolism in fish exposed to MWWEs has also been documented. Specifically, chronic exposure of rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) to MWWE resulted in decreased liver glycogen content and altered activity of enzymes involved in gluconeogenesis and glycolysis, suggesting changes in the metabolic capacity and energy demand in this species (Ings et al., 2012). Houde et al. (2014a) further observed effects on the gene transcription and enzyme activity related to glucose and lipid metabolism in liver of yellow perch (Perca flavescens) environmentally-exposed to a major MWWE.

Lipids, such as fatty acids, are important sources of energy for development, growth, reproduction, and locomotion in fish (Tocher, 2003; Eddy and Handy, 2012). Although fatty acid metabolism has not been studied extensively in fish, there is evidence suggesting that pathways are similar to those of mammals (Tocher, 2003). The catabolism of fatty acids through β-oxidation in mitochondria and peroxisomes results in acetyl-coA formation, which is used to produce adenosine triphosphate (ATP). The acyl-coA oxidase (ACOX) is a rate-limiting enzyme associated with peroxisomes, catalyzing the first step of long-chain fatty acid β-oxidation (Cajaraville et al., 2003). A number of field and laboratory studies have shown that certain environmental contaminants [e.g., polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs),

polychlorinated biphenyls (PCBs), pesticides, xenoestrogens or phthalate esters] can induce peroxisomal proliferation in fish. This process is mediated through the action of peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs), a family of nuclear transcription factors that modulate the activation of target genes, including the gene encoding for ACOX (Cajaraville et al. 2003). Moreover, thyroid hormones [triiodothyronine (T_3) and thyroxine (T_4)] have an important role in lipid metabolism. There is evidence of cross-talk mechanisms between thyroid hormones and metabolism of fatty acids, although there is as yet no consensus about their effects on lipogenesis and lipolysis (Liu and Brent, 2010; Sinha et al., 2014).

The city of Montreal's wastewater treatment plant (WWTP) (QC, Canada) serves around 1.8 million inhabitants and releases from 2.5 to 7.6 million m³ of primary treated water daily in the St. Lawrence River (Marcogliese et al., 2009). Elevated concentrations of legacy and emerging contaminants (e.g., metals, PAHs, PCBs, surfactants, pharmaceuticals, and personal care products) from various sources have been determined in this MWWE (Marcogliese et al., 2015). Moreover, it has been shown that Montreal's MWWE is a major source of halogenated flame retardants (HFRs), including polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) (Pelletier and Rondeau, 2013; Houde et al. 2014a, 2014b). HFRs are industrial chemicals added in a wide range of consumer products (e.g., plastics, textiles, upholstered furniture, and electronics) to delay ignition in order to meet fire safety standards (Alaee et al., 2003). Multiple HFRs are found ubiquitously in the environment (Covaci et al., 2011; Law et al., 2014), including the remote Arctic regions (de Wit, 2010), and several compounds were found to be persistent, bioaccumulative and toxic to wildlife species (Chen and Hale, 2010; Kelly et al., 2008; Law et al., 2014; Shaw and Kannan, 2009). This is the case of several PBDE congeners that share structural similarities with thyroid hormones, and have been associated with thyroid disruption in fish (Noyes and Stapleton, 2014).

Greater HFR concentrations have been reported in yellow perch, northern pike (*Esox lucius*) and muskellunge (*Esox masquinongy*) collected downstream of Montreal's MWWE point of discharge relative to upstream sites (Houde et al., 2014b). It was determined in this study that Montreal's MWWE was an important source of HFRs to the St. Lawrence River, and that tissue concentrations in fish inhabiting the receiving ecosystem could be used as chemical tracers of this exposure. The objective of the present study was to examine the effects of a chronic environmental exposure of northern pike from the St. Lawrence River to the Montreal's MWWE on the body condition and thyroid hormone levels as well as the transcription of genes and activity of enzymes related to the energy metabolism. The northern pike is an abundant sedentary and opportunistic top predator fish in the St. Lawrence River that can live up to 12 years, and thus represents an ideal model species to address this objective. Molecular and cellular markers were selected following previous findings by Houde et al. (2014a) on fish collected from this same area that strongly suggested impact of energy balance in individual exposed to the Montreal's MWWE.

2.3 Materials and methods

2.3.1 Field sampling

Sampling of northern pike was conducted in late May-early June of 2014 and 2015 after spawning to minimize variations of circulating thyroid hormone levels and hepatic lipid content. The two sampling sites were selected based on studies on fish by Houde et al. (2014a, 2014b). Northern pike were collected using a beach seine, 4 km upstream of the point of discharge of the Montreal's primary WWTP in the St. Lawrence River (QC, Canada) (Boucherville Islands, n = 26) and 4 km downstream in the plume of this effluent (Îlet Vert, located within the effluent dispersion plume, n = 24) (Table 2.4 and Figure 2.5). Fish were transferred immediately to a vat

containing water (70 L). Fish were euthanized using a 250 mg/L clove oil solution, measured (total length, ± 1 mm), and weighed (± 1 g). The Fulton's condition index (K), calculated as K = [body mass (g) / total length (cm³)] × 1000, was used as a general proxy of body condition. A blood sample was collected from the dorsal artery immediately after euthanasia, kept on ice in the dark while in the field, and then centrifuged in the laboratory (3000 X g; 7 min). The plasma was kept at -80°C until T₃ analysis (section 2.3.8). An aliquot of liver was transferred into a tube containing 1 mL RNAlater stabilization solution (Life Technologies Inc., Burlington, ON, Canada), kept at 4°C in the dark for 24 h and then at -80°C until RNA extraction (section 2.3.4). The remaining of the liver was kept on dry ice in the dark during fieldwork, and stored at -80°C until chemical analysis (section 2.3.3) and ACOX activity measurement (section 2.3.7). The cleithra were removed for age determination (section 2.3.2) and a gonad sample was conserved in a 10% formalin solution for sex determination (section 2.3.2).

Fish handling and sampling protocol was approved by the animal care committee of Environment and Climate Change Canada according to guidelines of the Canadian Council on Animal Care (Ottawa, ON, Canada).

2.3.2 Age and sex determination

The cleithra of pike were analyzed for age determination at the Ministère des Forêts, de la Faune et des Parcs (Trois-Rivières, QC, Canada) by counting the number of growth annuli. The sex of individuals was determined at the veterinary Faculty of the University of Montreal (Saint-Hyacinthe, QC, Canada) by histological analysis of a gonad sample.

2.3.3 Chemical analysis

Pike liver samples (0.5-1 g) were analyzed at the Université du Québec à Montréal for 34 PBDE congeners and 12 emerging HFRs: pentabromoethylbenzene (PBEB), hexabromobenzene (HBB), octabromo-1,3,3-trimethyl-1-phenylindan (OBIND), decabromodiphenyl ethane (DBDPE), bis(2-ethylhexyl)-tetra-bromophthalate (BEHTBP), dechlorane-related compounds [Dec-602, -603, -604, Dec-604 CB, Chlordene Plus (CP)] as well as Dechlorane Plus isomers (*syn-* and *anti-DP*). Sample extraction and clean-up procedures have been described in details in Houde et al. (2014b), and were applied without modification. Total lipid content in liver was determined gravimetrically. Briefly, a volume corresponding to 10% of the sample extract in hexane was collected, transferred to an aluminium dish, and evaporated to dryness in a fume hood. The total lipid content was expressed as percentage to the original wet mass of the liver aliquot.

Identification and quantification of target analytes were performed using a gas chromatograph (GC) coupled to a single quadrupole mass spectrometer (MS) (Agilent Technologies 5975C Series, Palo Alto, CA) operating in the electron capture negative ionization mode (GC/MS-ECNI) based on methods described by Gentes et al. (2012).

Quality control and assurance procedures included method blanks and standard reference material (SRM 1947; Lake Michigan fish tissue; National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA) injection for each batch of ten samples. Mean (\pm SEM) recoveries of spiked internal standards in pike liver, blank and SRM 1947 samples were as follows: BDE-30 (96 \pm 1.0%), BDE-156 (100 \pm 1.6%), ¹³C-BDE-209 (59 \pm 1.5%), and ¹³C-syn-DP (96 \pm 1.2%). Concentrations of PBDEs and emerging HFRs were quantified using an internal standard (IS) approach, and thus all analyte concentrations were inherently recovery-corrected. Concentrations of the six PBDE congeners in SRM 1947 samples (n = 4) showed

less than 18.5% variation from the certified values. Method limits of detection (MLODs; defined as signal to noise ratio [S/N] = 3) and method limits of quantification (MLOQs; minimum amount of analyte producing a peak with S/N = 10) were based on replicate analyses (n = 8) of matrix samples spiked at a concentration of 3-5 times the estimated detection limit.

2.3.4 RNA extraction and reverse transcription

Total RNA was extracted from liver aliquot using the RNeasy plus mini kit (Qiagen, Toronto, ON, Canada) following the manufacturer's instructions. RNA concentrations were measured using a NanoDrop ND-2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Mississauga, ON, Canada). RNA integrity and purity was evaluated using a Bio-Rad Experion automated electrophoresis system and the RNA StdSens analysis kit as per the manufacturer's protocols (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Reverse transcription was performed using the QuantiTect reverse transcription kit (Qiagen, Canada) following the manufacturer's instructions. A total volume of 20 µL of cDNA was obtained from 1 μ g of extracted RNA. Briefly, 1 μ g of RNA was added to 2 μ L of gDNA wipeout buffer 7X and RNase-free water for a total volume of 14 μ L in thin-wall PCR tube (Bio-Rad, Mississauga, ON, Canada). Samples were incubated at 42°C for 2 min for gDNA elimination, and the tubes were kept on ice. After the gDNA elimination step, 4 µL Quantiscript RT buffer 5X, 1 µL RT Primer Mix and 1 µL Quantiscript reverse transcriptase were added and incubated at 42°C for 15 min, and at 95°C for 3 min. cDNA samples were immediately stored at -20°C until qPCR analysis (section 2.3.6).

2.3.5 Primer design

Expressed gene sequences for *Esox lucius* were selected in the GenBank database (Table 2.1). All primers were designed by the authors using Primer-BLAST from NCBI (Rozen and Skaletsky, 2000). Netprimer (Premier Biosoft, CA, USA) was used to examine the presence of secondary structures. For each gene, two pairs were evaluated except for the reference genes, which have previously been validated by Houde et al. (2013). Primers were manufactured by Integrated DNA Technologies (Coralville, IA, USA).

Table	2.1. Gen	es, symbols	s and prin	ners used	for R7	ſ-qPCR	analysis i	n northern	pike
liver									
11 4 01									

Gene names	Symbols	Species	Accession numbers	Primers	Sequences		
Target genes							
Peroxisome proliferator-	ppary	Esox lucius	XM_010874307	Forward	ATTGAGTGTCGTGTCTGTGGA		
activated receptor gamma				Reverse	GCTCTTCTTGTGGATGCGA		
Acyl-coenzyne A oxidase	acox1	Esox lucius	XM_010889415	Forward	GATGCTCAACTCCGTCCTG		
1, palmitoyl				Reverse	CGGTCTTGTTTAGGGGCGA		
Fatty-acid binding-protein	Cabril	Esox lucius	VNI 010877064	Forward	CAGAAGGGCAAGGACATCAA		
1, liver type	Jabpi		AM_010877904	Reverse	CTTCTCCCAGTCATCGTCTCT		
Fatty-acid symthese	Cana	Esox lucius	XM_010888630	Forward	CAGGGAAAACACATCGGCAAA		
Fairy-acid syninase	Jash			Reverse	AGTGAAAGGGGAGAACCCAC		
Reference genes							
62 migroglobulin prequest	b2mg	Esox lucius	BT079123.1	Forward	TGTTGCCCTTGTTTTCTGCGTGGT		
p2 merogioounn precursor				Reverse	TGGCCGTATTTGCCAGGGTTGC		
Ribosomal protein \$20	rps20	Salmo salar	BT060032.1	Forward	CCCCTGTTGAGGCTGAGGTTGC		
Ribosomai protem 320				Reverse	TTGGTGGGCATACGGACTGGT		
Peptidyl-prolyl cis-trans	nnia	Esox lucius	BT080015.1	Forward	TGCTAAAACTGCTTGGCTGGATGG		
isomerase	ppia			Reverse	TCGCTTTCGTCTTGCCGCTG		
Tubulin a chain	tba	Esox lucius	BT079618.1	Forward	GGTCACTACACCATCGGCAAGGA		
i douini u chain				Reverse	ACAGGCGTTCCATCAGCAGGGA		
I Ibiquitin like protein 4 A	uhlda	From Invation	DT070424 1	Forward	CAGCAGGCGAAAGGAGTGGAGT		
o oldann-uke biotem 4A	uvi40	ESOX IUCIUS	D10/9424.1	Reverse	TGCCAGGACGGTGGACAAAGT		

2.3.6 Real-time quantitative PCR analysis

All RT-qPCR analyses were performed using iQ SYBR green supermix (Bio-Rad) and the CFX96 TouchTM Real-Time PCR detection system (Bio-Rad). Briefly, each reaction was run in duplicate and consisted of 10 ng cDNA, iQ SYBR green supermix (50 mM KCl, 20 nM Tris-HCl, pH 8.4, 0.2 mM of each dNTP, 25 units/mL iTag DNA polymerase, 3 mM MgCl₂, SYBR Green I, and 10 nM fluorescein) with a final concentration of 300 nM for each primer, for a total reaction volume of 13 µL. Cycling parameters were previously optimized (Houde et al., 2013) and were 95°C for 2 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 15 s and 68°C for 15 s. A calibration curve was performed for each primer pair (starting cDNA concentration: 2 ng; 8 serial dilutions; 2 or 3-fold) to estimate PCR efficiency (values were between 90 and 110%) and limits of detection. Amplification specificity was verified with a melting curve: 95°C for 15 s, heating steps for 10 min from 57°C to 95°C. Notemplate control (NTC) was included on each plate to ensure the absence of contamination and false positives. Data acquisition and analysis were performed by CFX ManagerTM software (Bio-Rad). Quantification cycle (Cq) values were imported into GenEx 5.31 Enterprise software (MultiD Analyses AB, Santa Clara, CA, USA) and efficiency correction was applied for Cq values. The relative gene expression was calculated using *ubl4a*, *ppia* and *rps20* as reference genes (analyzed by geNorm and Normfinder) and normalized with average Cq value in order to determine the fold-change values of gene transcription for each gene.

2.3.7 ACOX activity determination

ACOX activity was measured in pike liver as described by Houde et al. (2014a). Briefly, liver samples (15-60 mg) were homogenized in 20 mM HEPES-NaOH pH 7.5 buffer containing 1 mM EDTA, 140 mM NaCl, and 0.1% Triton X-100. Liver homogenates were centrifuged at 500 X g for 15 min at 4°C, and 190 μ L of reaction buffer containing 12 U/mL horseradish peroxidase (Sigma-Aldrich, USA), 50 μ M dichlorofluorescein (Invitrogen, CA, USA), 40 mM sodium azide (Sigma-Aldrich, USA) and 0.02% Triton X-100 in 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.4 were added to 10 μ L of liver homogenates in a 96-wells plate. Each reaction was performed in duplicate. After a 5 min incubation at 25°C, 20 μ L of 30 μ M palmitoyl-CoA (Sigma-Aldrich, USA) was added. Absorbance was monitored at 502 nm every 40 s for 20 min (microplate reader EON, Biotek Instruments Inc., Winooski, VT, USA). ACOX activity was calculated using molar extinction coefficient 91,000 M/cm (Köchli and von Wartburg, 1978) and expressed as IU/mg of proteins. The amount of proteins was measured using the Bradford assay.

2.3.8 T₃ analysis

Levels of total (T) and free (F) T_3 in pike plasma were measured using labeled (¹²⁵I) T_3 solid phase radioimmunoassay (RIA) human kits (MP Biomedicals, New York, NY, USA) following the manufacturer's instructions. Radioactivity levels were determined using a Cobra II gamma counter (Canberra Packard, Nepean, ON, Canada). Each sample was analyzed in triplicate. The detection limits of the TT₃ and FT₃ kits were 0.8 nmol/L and 1.43 pmol/L, respectively.

2.3.9 Statistical analysis

HFR concentrations, gene mRNA levels, enzyme activity, thyroid hormone levels and physiological variables (age, sex, body length, body mass, total lipid percentage in liver, and Fulton's index) were compared between upstream and downstream sites using T-tests. Σ_{34} PBDE and Σ_7 Dec concentrations, mRNA levels of *acox1* and *ppary*,

40

ACOX activity and FT_3/TT_3 level ratios were log_{10} -transformed to achieve normality. When data did not follow the normal distribution following the Shapiro-Wilk test or homoscedasticity using the Levene's test, the non-parametric Wilcoxon test was performed. Spearman's rank correlation coefficient was used to test the strength of the relationships between HFR concentrations, gene mRNA levels, enzyme activity, thyroid hormone levels and physiological variables. Statistical analyses were performed using R version 3.2.1 (R Core Team, 2015, Vienna, Austria) with a significance threshold of 0.05; *p*-values between 0.05 and 0.1 were reported as tendencies.

2.4 Results

2.4.1 Differences between sexes

Data from 2014 and 2015 were combined within each site as pike collection was conducted at the same time of the year and age of individuals was similar between years (W = 300.5; p = 0.94). However, males and females were analyzed separately as sex-specific differences were found for liver HFR concentrations (e.g., Σ_{34} PBDE: t(48) = -2.29; p = 0.03), thyroid hormone levels (FT₃: t(44) = 3.13; p = 0.003; TT₃: t(47) = 2.09; p = 0.04), and Fulton's index (W = 375; p = 0.02). In contrast, age (W = 288.5; p = 0.58) and morphological variables (body mass: W = 321; p = 0.22; body length: W = 306; p = 0.36) were similar between males and females (Table 2.2). Pike age (females: W = 153.5; p = 1; males: W = 41; p = 0.10) and body mass (females: W = 200; p = 0.13; males: W = 38; p = 0.22) did not differ between sites, although both females (W = 205; p = 0.09) and males (W = 42; p = 0.09) tended to be larger downstream relative to the upstream site (Table 2.2).

2.4.2 HFR concentrations in liver

The congeners BDE-47, -99, -100, -154/BB-153, and -153 were most abundant in pike liver, and contributed to 42.6%, 23.4%, 16.3%, 5.3%, and 4.5% of Σ_{34} PBDE concentrations, respectively. The congeners BDE-15, -71, -171, -180, -191, -205, and -206 were not detected in any sample. Liver Σ_{34} PBDE concentrations were approximately 2-fold greater in males compared to females at both sites (upstream: t(24) = -3.16; p = 0.004; downstream: t(22) = -2.25; p = 0.03). Concentrations of Σ_{34} PBDE in liver were approximately 4-fold greater downstream relative to the upstream site for both sexes (females: t(33) = 5.43; p < 0.0001; males: t(13) = 3.69; p= 0.003) (Table 2.3). Syn-DP co-eluted with BEHTBP, however, this co-eluting peak was nearly entirely associated with syn-DP as the peak corresponding to BEHTBP was qualitatively negligible. OBIND and DBDPE were detected in none of the samples. Σ_7 Dec concentrations in pike liver were similar between sexes at both sites (upstream: t(24) = -1.45; p = 0.16; downstream: t(22) = -1.61; p = 0.12), and were approximately 2-fold greater in fish at the downstream site compared to upstream (females: t(33) = 2.55; p = 0.02; males: t(13) = 2.16; p = 0.05) (Table 2.3). Dec-604 CB contributed to approximately 50% of Σ_7 Dec concentrations, followed by Dec-603 (16.5%) and ΣDP (15%). HBB concentrations in liver were similar between males and females (upstream: W = 57; p = 0.31 downstream: W = 45; p = 0.57), and did not differ between sites (females: W = 175; p = 0.48; males: W = 30; p = 0.76).

Table 2.2. Mean (\pm SEM) and range (in parenthesis) of age, morphological variables, ACOX activity and circulating T₃ levels in northern pike collected upstream and downstream of the Montreal's WWTP in the St. Lawrence River (QC, Canada).

Variables	Fer	nales	Males			
v aria dies	Upstream	Downstream	Upstream	Downstream		
N	17	18	9	6		
Age (year)	4.5 ± 0.5 (2-8)	4.6 ± 0.5 (2-9)	3.6 ± 0.4 (2-6)	4.7 ± 0.5 (3-6)		
Length (mm)	555 ± 28 (342-770)	638 ± 32 (433-875)	528 ± 14 (465-575)	624 ± 49 (465-575)		
Body mass (g)	991 ± 121 (346-1,866)	1,570 ± 251 (409-3,930)	749 ± 63 (518-1,006)	1,237 ± 271 (414-2,190)		
Fulton's index	0.54 ± 0.02 (0.40-0.86)	0.53 ± 0.01 (0.44-0.68)	0.50 ± 0.01 (0.44-0.57)	0.47 ± 0.02 (0.41-0.53)		
ACOX activity (nU/mg)	0.61 ± 0.05 (0.32-0.96)	0.56 ± 0.04 (0.29-0.97)	0.58 ± 0.04 (0.39-0.78)	0.47 ± 0.03 (0.36-0.56)		
FT ₃ (pmol/L)	$16.8 \pm 1.9 (0.26-26.8)^{1}$	$23.4 \pm 1.7 (12.2-40.1)^{1}$	$9.9 \pm 2.2 (3.5 - 20.9)^2$	15.8 ± 3.5 (4.5-30.6)		
TT ₃ (nmol/L)	8.9 ± 0.8 (0.18-14.1)	11.1 ± 0.6 (6.4-16.1)	$6.8 \pm 1.4 (2.8-13.7)^2$	9.0 ± 1.5 (4.0-15.2)		

 1 FT₃ analysis was performed in 15 females from the upstream site and 17 females from the downstream site due to insufficient plasma volume.

 2 FT₃ and TT₃ analyses were performed in 8 males from the upstream site due to insufficient plasma volume.

Table 2.3. Concentrations [mean \pm SEM (range); ng/g wet weight] of halogenated flame retardants in liver of northern pike collected upstream and downstream of the Montreal's WWTP in the St. Lawrence River. Means were provided if at least 50% of the samples had concentrations of the compound greater than the method limits of quantification (MLOQ)

		Females				Males				
	MOO	Upstream $(n = 17)$		Downstream $(n = 18)$		Upstream $(n = 9)$		Downstream $(n = 6)$		
	MLOQ	% sample > MLOQ	Mean ± SEM	% sample > MLOQ	Mean ± SEM	% sample > MLOQ	Mean ± SEM	% sample > MLOQ	Mean ± SEM	
Lipid content			5.0 ± 0.5		6.9 ± 0.9		4.2 ± 0.4		5.9 ± 1.5	
(%)			(3.2 - 9.5)		(3.2 - 14.6)		(2.5 - 6.7)		(3.4 - 13.1)	
PBEB	0.01	6	< MLOQ - 0.04	11	< MLOQ - 0.05	0	< MLOQ	33	< MLOQ - 0.06	
HBB	0.01	88	0.12 ± 0.02 (< MLOQ - 0.23)	100	0.33 ± 0.07 (0.14 - 1.23)	89	0.14 ± 0.03 (< MLOQ - 0.31)	100	0.46 ± 0.06 (0.25 - 0.61)	
OBIND	0.19	0	< MLOQ	17	< MLOQ - 0.57	0	< MLOQ	17	< MLOQ - 0.35	
DBDPE	1.21	0	< MLOQ	0	< MLOQ	0	< MLOQ	0	< MLOQ	
Dec-602	0.08	0	<mloq< td=""><td>0</td><td>< MLOQ</td><td>0</td><td>< MLOQ</td><td>17</td><td>< MLOQ - 1.85</td></mloq<>	0	< MLOQ	0	< MLOQ	17	< MLOQ - 1.85	
Dec-603	0.47	0	< MLOQ	17	< MLOQ - 1.09	0	< MLOQ	33	< MLOQ - 0.99	
BDE- 183/Dec-604	0.03	76	0.07 ± 0.01 (< MLOQ - 0.17)	89	0.24 ± 0.09 (< MLOQ - 1.61)	89	0.10 ± 0.02 (< MLOQ - 0.22)	100	0.45 ± 0.24 (0.12 - 0.61)	
Dec-604CB	0.01	53	0.26 ± 0.08 (< MLOQ - 1.36)	56	0.75 ± 0.25 (< MLOQ - 4.37)	67	0.60 ± 0.20 (< MLOQ - 1.25)	67	1.18 ± 0.54 (< MLOQ - 3.40)	
Cplus	0.05	18	<mloq -="" 0.17<="" td=""><td>28</td><td>< MLOQ - 0.74</td><td>11</td><td>< MLOQ - 0.18</td><td>50</td><td>0.16±0.08 (<mloq-0.45)< td=""></mloq-0.45)<></td></mloq>	28	< MLOQ - 0.74	11	< MLOQ - 0.18	50	0.16±0.08 (<mloq-0.45)< td=""></mloq-0.45)<>	
syn- DP/BEHTBP	0.12	24	<mloq -="" 0.30<="" td=""><td>28</td><td>< MLOQ - 0.34</td><td>22</td><td>< MLOQ - 0.32</td><td>17</td><td>< MLOQ - 0.15</td></mloq>	28	< MLOQ - 0.34	22	< MLOQ - 0.32	17	< MLOQ - 0.15	
anti-DP	0.05	65	0.13 ± 0.04 (< MLOQ - 0.64)	83	0.11 ± 0.02 (< MLOQ - 0.37)	56	0.18 ± 0.11 (< MLOQ - 1.03)	33	< MLOQ - 0.26	
ΣDP^1			0.19 ± 0.05 (< MLOQ - 0.94)		0.19 ± 0.04 (< MLOQ - 0.62)		0.27 ± 0.14 (<mloq -="" 1.35)<="" td=""><td></td><td>0.14 ± 0.06 (<mloq -="" 0.42)<="" td=""></mloq></td></mloq>		0.14 ± 0.06 (<mloq -="" 0.42)<="" td=""></mloq>	
$\Sigma_7 \text{Dec}^2$			0.68 ± 0.11 (0.07 - 1.91)		1.56 ± 0.35 (0.28 - 6.42)		$\frac{1.12 \pm 0.27}{(0.25 - 2.63)}$		2.59 ± 0.83 (0.82 - 6.38)	
$\Sigma_{34}PBDE^3$			37.5 ± 6.8 (8.66 - 117)		167 ± 29.3 (29.6 - 465)		87.3 ± 18.0 (30.6 - 197)		393 ± 110 (88.8 - 823)	

Pentabromoethylbenzene (PBEB); hexabromobenzene (HBB); octabromo-1,3,3trimethyl-1-phenylindan (OBIND); decabromodiphenylethane (DBDPE); Dechlorane 602, 603, 604 (Dec-602, -603, -604); Dechlorane 604 Component B (Dec-604CB); Chlordene Plus (Cplus); *syn*-Dechlorane Plus (*syn*-DP)/bis(2-ethylhexyl)tetrabromophthalate (BEHTBP); *anti*-Dechlorane Plus (*anti*-DP).

¹ Σ DP: sum of *syn*-DP/BEHTBP and *anti*-DP.

² Σ₇Dec: sum of Dec-602, -603, -604, -604 CB, Cplus, *syn*-DP/BEHTBP and *anti*-DP. ³ Σ₃₄PBDE: sum of BDE-7, -10, -15, -17, -28/PBT, -47, -49, -66, -71, -77, -85, -99, -100, -119, -126, -138, -139, -140, -153, -154/BB-153, -171, -180, -183/Dec-604, -191, -196, -197/-204, -201, -203, -205, -206, -207, -208, and -209.

2.4.3 Gene mRNA levels in liver

Results showed up-regulation (fold-change > 1) for *fapl, fasn* and *ppary* compared to the mean transcription level of all samples at both sites. *Acox1* was up-regulated in females at both sites as well as in males at the upstream site, but down-regulated (fold-change < 1) in males at the downstream site (Table 2.5). In females, no difference was found in mRNA levels of *acox1* (t(32) = -1.64; *p* = 0.11), *ppary* (t(32) = 1.71; *p* = 0.10), *fabp1* (W = 141; *p* = 0.92), and *fasn* (W = 145; *p* = 1) between sites. In males, *acox1* was significantly down-regulated downstream compared to upstream (t(13) = -4.55; *p* = 0.0005), whereas *fasn* was up-regulated at both sites (fold-change > 20 upstream), although exhibited lower mRNA levels (approximately 9-fold) downstream relative to the upstream site (t(13) = -2.29; *p* = 0.04) (Fig. 2.1).



Figure 2.1. Relative abundance (fold-change; mean \pm SEM) of A) *acox1* and B) *fasn* in liver of female (n = 33) and male (n = 15) northern pike collected 4 km upstream and 4 km downstream of the Montreal's WWTP in the St. Lawrence River (QC, Canada). T-tests were performed on log₁₀-transformed data. Fold-change value < 1 indicates a down-regulation, while fold-change value > 1 indicates an up-regulation. * $p \le 0.05$. ** $p \le 0.001$.

In females, mRNA levels of *ppary* positively correlated with *acox1* (rho = 0.39; p = 0.03) and *fasn* (rho = 0.60; p = 0.0003). Moreover, mRNA levels of *acox1* and *fasn* were positively correlated (rho = 0.51; p = 0.003). In males, mRNA levels of *acox1* and *fasn* were positively associated with each other (rho = 0.58; p = 0.03), and both were negatively correlated with Σ_{34} PBDE concentrations in liver (*acox1*: rho = -0.57; p = 0.03; *fasn*: rho = -0.56; p = 0.03) (Fig.2.2).



Figure 2.2. Relationship between hepatic concentrations of Σ_{34} PBDE (ng/g ww) and fold-change values of the transcription of *acox1* in liver of male (n = 15) northern pike collected 4 km upstream (triangle) and 4 km downstream (dot) of the Montreal's WWTP in the St. Lawrence River (QC, Canada). [rho = -0.57; p = 0.03].

2.4.4 Hepatic ACOX activity

ACOX activity (Table 2.2) tended to be lower in males collected downstream compared to upstream site (t(13) = -1.84; p = 0.09), and was inversely correlated with Σ_{34} PBDE concentrations in liver (rho = -0.53; p = 0.05) (Fig. 2.3). No correlation was found between *acox1* mRNA levels and ACOX activity in liver for both sexes.



Figure 2.3. Relationship between hepatic concentrations of Σ_{34} PBDE (ng/g ww) and ACOX activity (nU/mg) in liver of male (n = 15) northern pike collected 4 km upstream (triangle) and 4 km downstream (dot) of the Montreal's WWTP in the St. Lawrence River (QC, Canada). [rho = -0.53; p = 0.05].

2.4.5 Circulating T₃ levels

FT₃ and TT₃ levels in plasma were 1.4- and 1.3-fold greater in females collected downstream compared to those upstream, respectively (FT₃: t(30) = 2.56; p = 0.02; TT₃: t(33) = 2.15; p = 0.04) (Table 2.2). A slight increase in FT₃ (1.6-fold) and TT₃ (1.3-fold) concentrations in plasma was also observed for males at the downstream site, although this was not significant (FT₃: t(12) = 1.50; p = 0.16; TT₃: t(12) = 1.05; p = 0.32). In females, circulating FT₃ levels positively correlated with Σ_{34} PBDE concentrations in liver (rho = 0.36; p = 0.04) (Fig. 2.4). Moreover, *ppary* mRNA levels in liver of females tended to be positively correlated with circulating FT₃ (rho = 0.32; p = 0.09) and TT₃ levels (rho = 0.32; p = 0.07). FT₃/TT₃ level ratios in plasma did not differ between sites, neither in females nor in males, although showed significant positive associations with Σ_{34} PBDE concentrations in liver (females: rho = 0.39; p = 0.03; males: rho = 0.62; p = 0.02). In females, FT₃/TT₃ level ratios in plasma also positively correlated with Σ_7 Dec concentrations in liver (rho = 0.36; p =0.05).



Figure 2.4. Relationship between hepatic concentrations of Σ_{34} PBDE (ng/g ww) and plasma FT₃ levels (pmol/L) in females (n = 32) northern pike collected 4 km upstream (triangle) and 4 km downstream (dot) of the Montreal's WWTP in the St. Lawrence River (QC, Canada). [rho = 0.36; p = 0.04].

2.4.6 Total hepatic lipid content and body condition

50

Total liver lipid percentages tended to be greater in females collected from the downstream site (W = 207; p = 0.08), but were not different between sites in males. In females, a positive relationship was found between total lipid percentages and *ppary* mRNA levels in liver (rho = 0.40; p = 0.02) and FT₃ concentrations in plasma (rho = 0.39; p = 0.03). Similar tendencies were observed in males between total lipid percentages and FT₃ concentrations in plasma (rho = 0.52; p = 0.06). The Fulton's body condition index was similar between sites for both sexes.

2.5 Discussion

2.5.1 HFR concentrations in liver

Greater hepatic concentrations of PBDEs and other HFRs (e.g., dechlorane-related compounds) in pike collected from the downstream site compared to the upstream site confirmed effluent exposure and high site fidelity of individuals within this area of the St. Lawrence River near the city of Montreal. The elevated contributions of BDE-47, -99 and -100 to Σ_{34} PBDE concentrations in liver were consistent with previous observations in pike and other species from this region (Houde et al., 2014a, 2014b), an effluent-dominated river in Southern California, USA (Maruya et al., 2012) and a lake receiving effluent discharge near Beijing, China (Wang et al., 2007). Moreover, a pan-Canadian study on PBDE levels in wastewaters showed that the sum of BDE-47 and -99 contributed to 40% of Σ_{46} PBDE in WWTP effluents (Kim et al., 2013). This study revealed that those congeners are still released into this aquatic ecosystem despite their usage restrictions and removal efficiency in sludge (approximately 70%) reported for primary treatment facilities.

Male pike accumulated PBDEs in liver to a significantly greater extent than females. This observation was also reported in hornyhead turbot (*Pleuronichthys verticalis*) collected near a MWWE discharge in Southern California, USA (Maruya et al., 2012). This sex-specific bioaccumulation of PBDEs could be the result of differences in effluent exposure (e.g., habitat use strategy) and/or could reflect differences in the diet and use of energy reserves between male and female pike. Madenjian et al. (2016) observed that whole-body PCB concentrations in eight fish species were 17-43% greater in males than in females, and concluded that this was attributable to greater resting metabolic rate and swimming activity, thus leading to higher energy expenditure and food consumption. According to these authors, metabolic differences between sexes could explain greater contaminant exposure in males. Lipid

mobilization during egg production and maternal transfer could also explain a lesser body burden of PBDEs in female fish (Van de Merwe et al., 2011).

Unlike PBDEs, levels of dechlorane-related compounds were similar between male and female pike. DP and Dec-602, -603 and -604 have been used as HFRs since the 1960s as well as substitutes of Mirex, a now banned insecticide (Feo et al., 2012). These emerging HFRs have been reported in a growing number of environmental samples since 2006, including aquatic and terrestrial organisms (Feo et al., 2012; Sverko et al., 2011). In the present study, dechlorane levels were largely dominated by Dec-604 CB, which was also the main Dec-604 analogue determined in muscle of Lake Ontario lake trout (Salvelinus namaycush) and whitefish (Coregonus clupeaformis) (Shen et al., 2014). Using biota-sediment accumulation factors, Shen et al. (2014) showed that Dec-604 CB exhibits greater bioaccumulation potential than Dec-604, Dec-602 and DP. Dec-602 was quantified in only one male pike sample from the downstream site. ΣDP concentrations in pike liver were similar between sites and sexes, while only anti-DP could be quantified in females from both sampling locations and in males from the upstream site. Those results suggested that Montreal's WWTP is not a major source of DP to the St. Lawrence River. Hepatic DP concentrations ($6.3 \pm 3.5 \text{ ng/g}$ lipid weight) in muskellunge collected close to Montreal rather suggested the presence of local sources of DP upstream or in proximity of this area (Houde et al., 2014b).

2.5.2 Transcriptional and ACOX activity responses to effluent exposure

Fatty acid regulation is a balance between lipolysis (i.e., fatty acid catabolism through mitochondrial or peroxisomal β -oxidation) and lipogenesis (i.e., synthesis of fatty acids), two processes that involve *acox1*, *fasn* and *ppary* genes. Changes in transcriptional responses to Montreal's effluent exposure were only found in male pike. Sex-specific responses at the gene transcription level resulting from exposure to

52

organic contaminants have previously been observed in other fish species. Specifically, male marine medakas were found to exhibit stronger gene regulatory responses in liver than females after dietary BDE-47 exposure (290.3 \pm 172.3 ng BDE-47/day and 580.5 ± 344.6 ng BDE-47/day for 5 and 21 days, respectively) (Yu et al., 2013). Moreover, sex-specific differences in the expression of genes related to sexual differentiation in gonads of rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) have also been related to MWWE exposure in individuals collected downstream of the Kitchener's WWTP (ON, Canada) (Bahamonde et al. 2014). In the present study, the gene encoding for ACOX was significantly downregulated in male pike exposed to the effluent and a tendency for lower ACOX activity was observed in these fish. ACOX is a rate-limiting enzyme controlling lipolysis (Poirier et al., 2006) and is associated with peroxisomes (i.e., organelles that are essential for ß-oxidation of very long chain fatty acids). It has been used as a marker of exposure of mussels and fish to exogenous peroxisome proliferators (Cajaraville et al., 2003). The transcription of gene encoding for ACOX is regulated by PPARs, which are key regulators of lipid metabolism and peroxisomal proliferation (Cajaraville et al. 2003; Sinha et al., 2014). The observed decrease in ACOX transcription and activity in pike from the downstream site and the absence of change in *ppary* gene transcription did not support the hypothesis of a contaminant-induced peroxisomal proliferation in pike exposed to MWWE. Those results were partially in line with a study investigating the impact of Montreal's effluent on gene transcription and enzyme activity in female yellow perch (Houde et al., 2014a), in which an increase in acox1 gene transcription and lower ACOX activity were observed in fish collected downstream of the WWTP relative to the upstream site. The differences observed in the transcription of *acox1* between these two studies suggest variability in ACOX response to effluent exposure among fish species, and possibly also in relation to sex.

A decrease in the transcription of *fasn*, a cytosolic multienzyme complex catalyzing lipogenesis (Sargent et al., 1989), was also measured in male pike collected

downstream of the Montreal's WWTP. In fish, the rate of *de novo* fatty acid synthesis is regulated by the diet (Tocher, 2003) and restricted when preformed fatty acids are available from food intake (Henderson, 1996). Sewage particulate organic matter inputs can alter the overall system productivity in aquatic food webs. For instance, De Bruyn et al. (2003) reported that an important uptake of sewage-derived resources by primary and secondary consumers increased primary, secondary and fish production in the plume of Montreal's effluent. Moreover, a study from Argentine showed that a detritivorous fish (*Prochilodus lineatus*) collected at the main sewer outfall of Buenos Aires had stomach contents enriched in sewage-derived lipids, proteins and carbohydrates as well as higher muscle fat content relative to fish from upstream sites (Speranza and Colombo, 2000). The decrease in *fasn* transcription in male pike exposed to this effluent may be related to the consumption of fattier preys, thus reducing the need to produce fatty acids *de novo*.

2.5.3 Disturbance of thyroid hormone homeostasis

A wide range of xenobiotics found in MWWEs, including PCBs, HFRs, pesticides, pharmaceuticals, and personal care products have been found to individually affect the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in many fish species (e.g., Brown et al., 2004; Hontela and Habibi, 2013; Couderc et al., 2016; Jarque and Piña, 2014; Tu et al., 2016). However, the underlying mechanisms of toxicity of those compounds on fish thyroid regulation are not fully understood, and little is known about the effects of contaminant mixtures on thyroid hormone levels in fish (Brown et al., 2004). A significant increase in FT₃ and TT₃ levels in plasma was observed in female pike exposed to Montreal's effluent, which suggested a disturbance of thyroid hormone homeostasis. The same general pattern was observed in males, although results were not significant, which could be explained by the smaller sample size for males (n = 14). Those results were consistent with a study of immature walleye (*Sander vitreus*)

54
collected downstream from the Ottawa and Gatineau (Canada) WWTPs, in which fish exhibited 1.5-fold greater TT₃ levels in plasma compared to a reference site (Picard-Aitken et al., 2007). An increase in the gene transcription of hepatic type II deiodinase, an enzyme involved in T₄ deiodination leading to the formation of T₃, was reported in the same fish. Another study reported decreased TT₃ levels in plasma of juvenile cyprinid fish (*Barbus plebejus*) exposed during seven months to sediments from a polluted river containing HFRs, alkylphenols, PCBs, and to a lesser extent, personal care products and hormones (Viganò et al., 2015).

In teleost fish, T_3 formation and metabolism is under peripheral control (Jarque and Piña, 2014). Most T_3 is synthetized by T_4 outer ring deiodination (i.e., removal of an Γ from the outer phenyl ring) in liver or other extrathyroidal tissues before entering into plasma T_3 pool where it is largely bound to plasma transport proteins (Brown et al. 2004). T_3 is then distributed to target tissues where they exert their actions, or excreted by gills or urine. Thyroid hormone homeostasis is normally maintained by the plasticity of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis that compensates for external disturbances (Jarque and Piña, 2014). Therefore, the observed increase in circulating T_3 levels in female pike exposed to the effluent may indicate a possible perturbation of this axis. However, additional measures including T_4 levels as well as the transcription and activity of deiodinases would be necessary to interpret those changes.

In fish, as in mammals, the thyroid status is related to energy balance and metabolism (Eales and MacLatchy, 1989). Circulating T_3 levels can therefore reflect the nutritional status of fish. For instance, starved fish exhibit lower thyroid hormone levels in plasma (reviewed by MacKenzie et al., 1998), but show a rapid recovery of those levels after refeeding (Gaylord et al., 2001). The composition and quality of diet may also influence thyroid hormone levels as shown in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) fed a low-protein and low-caloric diet that exhibited a lower conversion of T_4 to T_3 than trout fed with equal amounts of high-protein and high-caloric diet

(Higgs et Eales, 1979). Urban outfalls represent a considerable input of nutrients to the local aquatic food web. Therefore, it can be suggested that increased circulating T_3 levels and total hepatic lipid reserves in exposed female pike can be related to a difference in dietary composition compared to the upstream site.

2.5.4 Total hepatic lipid reserves and body condition

Pike exposure to the effluent was associated with changes in gene transcription, enzyme lipolytic activity and circulating T₃ levels without noticeable change in total hepatic lipid reserves or body condition. Hepatic lipid reserves were not significantly different in pike exposed to the effluent, but tended to be greater in females from the downstream site. Nevertheless, careful interpretation is required as this measure only reflects the total amount but not the composition of lipid classes in liver. Hasenbein et al. (2014) reported a downregulation of genes involved in arachidonic acid (prostaglandin E synthase 3), sphingolipid (N-acylsphingosine amidohydrolase) and glycerophospholipid (ethanolamine-phosphate cytidylyltransferase) metabolism in delta smelt (*Hypomesus transpacificus*) exposed to the Sacramento effluent (CA, USA) under controlled conditions. In this regard, investigating relationships between MWWE exposure and fatty acid profiles in liver may give complementary information on the effects of MWWE on lipid metabolism in fish.

Fulton's condition factor is commonly used as a general index of health and accumulation of energy reserves in fish from contaminated environments (Gauthier et al., 2008; 2011). Zebrafish (*Danio rerio*) exposed to different concentrations of an industrial plant effluent under flow-through conditions for 28 days exhibited a significantly lower Fulton's condition factor (Smolders et al., 2002). The authors interpreted this observation as an equivalent of decreased energy reserves in fish. Results from the present study did not support this hypothesis as no change was observed in body condition nor total lipid percentages in liver of pike exposed to the

56

effluent relative to the upstream site. The presence of undigested preys in the stomach of two females collected at the downstream site may represent a bias in the calculation of Fulton's condition factor, for which the interpretations must be done with caution under field conditions.

2.5.5 Association between biological responses and PBDE concentrations

Several associations were found between biological responses and hepatic Σ_{34} PBDE concentrations, suggesting that in addition to be used as proxy of effluent exposure, PBDEs may perturb fatty acid and thyroid hormone metabolism in effluent-exposed pike. However, careful interpretation of those results is required as the effluent contains a wide variety of contaminants that could also have contributed to the observed changes in fish responses. In male pike, the transcription of *acox1* and *fasn* as well as the activity of ACOX were negatively related to Σ_{34} PBDE concentrations in liver, indicating that those compounds may have an impact on the peroxisomal β -oxidation and fatty acid synthesis, both at the gene and enzyme levels. Interestingly, an opposite response was reported in a study of female yellow perch inhabiting the same area in the St. Lawrence River, in which positive correlations between PBDEs and transcription of *acox1* and *fasn* were positively related in both male and female pike, suggesting a possible crosstalk mechanism between the regulation of lipolytic and lipogenic process.

PBDEs have been shown to affect thyroid regulation in fish through several components of the HPT axis (Noyes and Stapleton, 2014; Yu et al., 2015). Several experimental studies have reported decreased circulating thyroid hormone levels in fish exposed to PentaBDE commercial mixtures (e.g., DE-71), BDE-47 and BDE-209 (reviewed by Noyes and Stapleton, 2014). Such results are difficult to compare with environmental responses in fish exposed to multiple compounds in addition to

PBDEs. Furthermore, the concentrations and duration of PBDE exposure may differ widely between experimental and in situ studies. In the present study, greater PBDE concentrations in liver were associated with higher circulating FT_3 levels in females and higher FT₃/TT₃ level ratios in both sexes. In yellow European eel (Anguilla anguilla) from the urbanized Loire's estuary (France), no relationship was found between muscular PBDE concentrations and FT₃ levels (Couderc et al., 2016). In fish, more than 99% of thyroid hormones are bound to transport proteins (Noyes and Stapleton, 2014), including transthyretin (TTR), which has been characterized in some species (Kawakami et al., 2006; Santos and Power, 1999). It has been demonstrated that PBDEs can bind to TTR with even greater affinity than T_3 and affect the transcription and synthesis of TTR in fish (Chen et al., 2012; Morgado et al., 2007; Yu et al., 2010). The elevated FT_3 levels observed in plasma of female pike exposed to the Montreal's MWWE might suggest higher rate of displacement of thyroid hormones to their transport proteins. Furthermore, positive correlations between circulating FT₃ levels and PBDE concentrations in liver support the hypothesis of an interaction between PBDEs and TTR that could have resulted in higher FT₃ levels in female fish.

2.6 Conclusions

The present study provided evidence of sex-specific impacts of a major MWWE on the fatty acid metabolism of northern pike from the St. Lawrence River at the gene, enzyme and hormone levels. These results highlight the importance of considering sex-related differences when studying the effects of complex contaminant mixtures on fish physiological responses. Moreover, associations between hepatic PBDE concentrations and gene transcription and ACOX activity in liver as well as T_3 levels in plasma suggest possible exposure-related impacts of PBDEs that are abundant in this effluent. Further investigation is needed to better understand the modes of action of MWWE on the energetic metabolism (e.g., fatty acid metabolites analysis) of environmentally-exposed fish, and in particular top predators.

2.7 Acknowledgments

This study was funded primarily by Environment and Climate Change Canada and the St. Lawrence Action Plan (to M.H.). Supplemental funding was provided by the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (to J.V.). The authors would like to thank C. Beauvais, G. Cottin, M. Douville, M. Pilote, M. Lépine for assistance with field sampling, L. Wang for assistance with chemical analyses as well as M. Giraudo and R. Técher for assistance with primer design and RT-qPCR analyses. The authors declare they have no conflicts of interest.

2.8 Supporting information



Figure 2.5. Sampling sites in the St. Lawrence River (QC, Canada) in June 2014 and 2015

Table 2.4. Mean ± SEM (range) for age and	d morphological	variables of northern	pike collected	l upstream and d	lownstream
of Montreal's WWTP (QC, Canada).					

Variables		Females			Males			
Upstream		Downstream		Upstream		Downstream		
	2014	2015	2014	2015	2014	2015	2014	2015
N	5	12	8	10	5	4	3	3
Age (years) $\begin{array}{c} 4.6 \pm \\ (2-7) \end{array}$	4.6 ± 0.9	4.5 ± 0.5	4.4 ± 0.8	4.7 ± 0.7	3.2 ± 0.4	4.0 ± 0.7	5.7 ± 0.3	3.7 ± 0.3
	(2-7)	(3-8)	(2-8)	(3-9)	(2-4)	(3-6)	(5-6)	(3-4)
Length (mm) $\begin{array}{c} 615 \pm \\ (474-7) \end{array}$	615 ± 47	530 ± 32	689 ± 39	597 ± 46	549 ± 17	501 ± 18	720 ± 28	528 ± 45
	(474-770)	(342-700)	(540-875)	(433-835)	(483-575)	(465-550)	(664-750)	(438-583)
Weight (g)	1218 ± 199	896 ± 147	1758 ± 351	1421 ± 363	823 ± 74	656 ± 99	1780 ± 229	694 ± 146
	(585-1805)	(346-1866)	(780-3900)	(409-3930)	(560-1006)	(518-942)	(1400-2190)	(414-903)

Table 2.5. Relative abundance (fold-change; mean \pm SEM) of selected genes in liver of female (n = 33) and male (n = 15) northern pike collected 4 km upstream and 4 km downstream of the Montreal's WWTP. Gene transcription is expressed as fold-change of mRNA levels in each site compared to the mean value of all samples. Significant difference in relative abundance between sites is indicated in bold.

	Fen	nales	Males			
Gene	Upstream $(n = 17)$	Downstream $(n = 16)$	Upstream $(n = 9)$	Downstream $(n = 6)$		
acox1	1.86 ± 0.48	1.11 ± 0.23	2.23 ± 0.53	$\textbf{0.41} \pm \textbf{0.10}$		
fasn	41.18 ± 19.81	8.94 ± 6.02	26.57 ± 18.15	2.92 ± 2.49		
fapbl	23.32 ± 12.50	2.79 ± 1.22	12.43 ± 11.25	621.29 ± 620.59		
ppary	1.94 ± 0.75	3.06 ± 1.00	3.71 ± 1.96	3.06 ± 1.73	-	

2.9 References

- Alaee, M. (2003). An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release. *Environment International*, 29(6), 683–689. doi:10.1016/S0160-4120(03)00121-1
- Arstikaitis, J., Gagné, F., Cyr, D.G. (2014). Exposure of fathead minnows to municipal wastewater effluent affects intracellular signaling pathways in the liver. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 164, 1–10. doi:10.1016/j.cbpc.2014.04.002
- Bahamonde, P.A., Tetreault, G.R., McMaster, M.E., Servos, M.R., Martyniuk, C.J., Munkittrick, K.R. (2014). Molecular signatures in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) inhabiting an urbanized river reach receiving wastewater effluents. *Aquatic Toxicology*, 148, 211–220. doi:10.1016/j.aquatox.2014.01.010
- Brown, S.B., Adams, B.A., Cyr, D.G., Eales, J.G. (2004). Contaminant effects on the teleost fish thyroid. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(7), 1680. doi:10.1897/03-242
- Cajaraville, M.P., Cancio, I., Ibabe, A., Orbea, A. (2003). Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microscopy Research and Technique*, *61*(2), 191–202. doi:10.1002/jemt.10329
- Chen, Q., Yu, L., Yang, L., Zhou, B. (2012). Bioconcentration and metabolism of decabromodiphenyl ether (BDE-209) result in thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology*, 110-111, 141–148. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.008
- Chen, D., Hale, R.C. (2010). A global review of polybrominated diphenyl ether flame retardant contamination in birds. *Environment International*, *36*(7), 800–811. doi:10.1016/j.envint.2010.05.013
- Couderc, M., Marchand, J., Zalouk-Vergnoux, A., Kamari, A., Moreau, B., Blanchet-Letrouvé, I., Le Bizec, B., Mouneyrac, C., Poirier, L. (2016). Thyroid endocrine status of wild European eels (*Anguilla anguilla*) in the Loire (France). Relationships with organic contaminant body burdens. *Science of The Total Environment*, 550, 391–405. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.12.136

- Covaci, A., Harrad, S., Abdallah, M.A.-E., Ali, N., Law, R.J., Herzke, D., de Wit, C.A. (2011). Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment International*, 37(2), 532–556. doi:10.1016/j.envint.2010.11.007
- DeBruyn, A.M., Marcogliese, D.J., Rasmussen, J.B. (2003). The role of sewage in a large river food web. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 60(11), 1332–1344. doi:10.1139/f03-114
- De Wit, C.A., Herzke, D., Vorkamp, K. (2010). Brominated flame retardants in the Arctic environment trends and new candidates. *Science of The Total Environment*, 408(15), 2885–2918. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.08.037
- Eales, J.G., MacLatchy, D.L. (1989). The relationship between T₃ production and energy balance in salmonids and other teleosts. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7(1-6), 289–293. doi:10.1007/BF00004719
- Eddy, B., Handy, R.D. (2012). *Ecological and environmental physiology of fishes* (1st ed., p. 45-57). Oxford: Oxford University Press
- Feo, M.L., Barón, E., Eljarrat, E., Barceló, D. (2012). Dechlorane Plus and related compounds in aquatic and terrestrial biota: a review. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 404(9), 2625–2637. doi:10.1007/s00216-012-6161-x
- Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P. (2008). Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 151(4), 526–532. doi:10.1016/j.cbpa.2008.07.010
- Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P. (2011). Enzymatic correlates of energy status in wild yellow perch inhabiting clean and contaminated environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(9), 2148–2156. doi:10.1002/etc.609
- Gaylord, T.G., MacKenzie, D.S., Gatlin, D.M. (2001). Growth performance, body composition and plasma thyroid hormone status of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) in response to short-term feed deprivation and refeeding. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24(1), 73–79. doi:10.1023/A:1011199518135
- Hasenbein, M., Werner, I., Deanovic, L.A., Geist, J., Fritsch, E.B., Javidmehr, A., Foe, C., Fangue, N.A., Connon, R.E. (2014). Transcriptomic profiling permits the identification of pollutant sources and effects in ambient water samples. Science of The Total Environment, 468-469, 688-698. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.081

- Heberer, T. (2002). Occurrence, fate, and removal of pharmaceutical residues in the aquatic environment: a review of recent research data. *Toxicology Letters*, 131(1-2), 5–17. doi:10.1016/S0378-4274(02)00041-3
- Henderson, R.J. (1996). Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. *Archiv für Tierernaehrung*, 49(1), 5–22. doi:10.1080/17450399609381859
- Higgs, D.A., Eales, J.G. (1979). Influence of diet composition on radiothyroxine kinetics in brook trout, *Salvelinus fontinalis* (Mitchill). *Canadian Journal of Zoology*, 57(2), 396–402. doi:10.1139/z79-046
- Holeton, C., Chambers, P.A., Grace, L., Kidd, K. (2011). Wastewater release and its impacts on Canadian waters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68(10), 1836–1859. doi:10.1139/f2011-096
- Hontela, A., Habibi, H.R. (2013). Personal care products in the aquatic anvironment: a case study on the effects of triclosan in fish. In K. Tierney, A. Farrell, C. Brauner (Ed.), *Fish Physiology: Organic chemical toxicology of fishes* (p. 411-437). Amsterdam; Boston, MA: Elsevier Academic Press
- Houde, M., Douville, M., Despatie, S.-P., De Silva, A.O., Spencer, C. (2013). Induction of gene responses in St. Lawrence River northern pike (*Esox lucius*) environmentally exposed to perfluorinated compounds. *Chemosphere*, 92(9), 1195–1200. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.099
- Houde, M., Berryman, D., de Lafontaine, Y., Verreault, J. (2014a). A multi-level biological approach to evaluate impacts of a major municipal effluent in wild St. Lawrence River yellow perch (*Perca flavescens*). Science of The Total Environment, 497-498, 307–318. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.059
- Houde, M., Giraudo, M., Douville, M., Bougas, B., Couture, P., De Silva, A.O., Spencer, C., Lair, S., Verreault, J., Bernatchez, L., Gagnon, C. (2014b). Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence River, Canada. *Science of The Total Environment*, 479-480, 48–56. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.105
- Ings, J.S., Servos, M.R., Vijayan, M.M. (2011). Hepatic Transcriptomics and Protein Expression in Rainbow Trout Exposed to Municipal Wastewater Effluent. *Environmental Science & Technology*, 45(6), 2368–2376. doi:10.1021/es103122g
- Ings, J.S., Oakes, K.D., Vijayan, M.M., Servos, M.R. (2012). Temporal changes in stress and tissue-specific metabolic responses to municipal wastewater

effluent exposure in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156(2), 67–74. doi:10.1016/j.cbpc.2012.04.002

- Jarque, S., Piña, B. (2014). Deiodinases and thyroid metabolism disruption in teleost fish. *Environmental Research*, 135, 361–375. doi:10.1016/j.envres.2014.09.022
- Kawakami, Y., Seoka, M., Miyashita, S., Kumai, H., Ohta, H. (2006). Characterization of Transthyretin in the Pacific Bluefin Tuna, Thunnus orientalis. *Zoological Science*, 23(5), 443–448. doi:10.2108/zsj.23.443
- Kelly, B.C., Ikonomou, M.G., Blair, J.D., Gobas, F.A.P.C. (2008). Bioaccumulation behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in a Canadian Arctic marine food web. *Science of The Total Environment*, 401(1-3), 60–72. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.03.045
- Kim, M., Guerra, P., Theocharides, M., Barclay, K., Smyth, S.A., Alaee, M. (2013). Parameters affecting the occurrence and removal of polybrominated diphenyl ethers in twenty Canadian wastewater treatment plants. *Water Research*, 47(7), 2213–2221. doi:10.1016/j.watres.2013.01.031
- Law, R.J., Covaci, A., Harrad, S., Herzke, D., Abdallah, M.A.-E., Fernie, K., Toms, L.-M.L., Takigami, H. (2014). Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: Status at the end of 2012. *Environment International*, 65, 147–158. doi:10.1016/j.envint.2014.01.006
- Liu, Y.-Y., Brent, G.A. (2010). Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(3), 166–173. doi:10.1016/j.tem.2009.11.004
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science* of The Total Environment, 473-474, 619–641. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.065
- MacKenzie, D.S., VanPutte, C.M., Leiner, K.A. (1998). Nutrient regulation of endocrine function in fish. *Aquaculture*, 161(1-4), 3–25. doi:10.1016/S0044-8486(97)00253-6
- Madenjian, C.P., Rediske, R.R., Krabbenhoft, D.P., Stapanian, M.A., Chernyak, S.M., O'Keefe, J.P. (2016). Sex differences in contaminant concentrations of

fish: a synthesis. *Biology of Sex Differences*, 7(1). doi:10.1186/s13293-016-0090-x

- Marcogliese, D.J., Blaise, C., Cyr, D., de Lafontaine, Y., Fournier, M., Gagné, F., Gagnon, C., Hudon, C. (2015). Effects of a major municipal effluent on the St. Lawrence River: A case study. *AMBIO*, 44(4), 257–274. doi:10.1007/s13280-014-0577-9
- Marcogliese, D.J., Gendron, A.D., Cone, D.K. (2009). Impact of municipal effluents and hydrological regime on myxozoan parasite communities of fish. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1345–1351. doi:10.1016/j.ijpara.2009.04.007
- Maruya, K.A., Vidal-Dorsch, D.E., Bay, S.M., Kwon, J.W., Xia, K., Armbrust, K.L. (2012). Organic contaminants of emerging concern in sediments and flatfish collected near outfalls discharging treated wastewater effluent to the Southern California Bight. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31(12), 2683– 2688. doi:10.1002/etc.2003
- Morgado, I., Hamers, T., Van der Ven, L., Power, D.M. (2007). Disruption of thyroid hormone binding to sea bream recombinant transthyretin by ioxinyl and polybrominated diphenyl ethers. *Chemosphere*, 69(1), 155–163. doi:10.1016/j.chemosphere.2007.04.010
- Noyes, P.D., Stapleton, H.M. (2014). PBDE flame retardants: Toxicokinetics and thyroid hormone endocrine disruption in fish. *Endocrine Disruptors*, 2(1), e29430. doi:10.4161/endo.29430
- Pelletier, M., Rondeau, M. (2013). Polybrominated diphenyl ethers in the suspended matter and sediments of the St. Lawrence River. [Report]. Canada: Ministry of the Environment; Québec : Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs
- Picard-Aitken, M., Fournier, H., Pariseau, R., Marcogliese, D.J., Cyr, D.G., 2007. Thyroid disruption in walleye (*Sander vitreus*) exposed to environmental contaminants: Cloning and use of iodothyronine deiodinases as molecular biomarkers. *Aquatic Toxicology*, 83(3), 200–211. doi:10.1016/j.aquatox.2007.04.004
- Poirier, Y., Antonenkov, V.D., Glumoff, T., Hiltunen, J.K. (2006). Peroxisomal βoxidation—A metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1413–1426. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.034

- Racz, L., Goel, R.K. (2010). Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. Journal of Environmental Monitoring, 12(1), 58–70. doi:10.1039/B917298J
- Rozen, S., Skaletsky, H. (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods in Molecular Biology*, 132, 365–386
- Santos, C.R., Power, D.M. (1999). Identification of transthyretin in fish (*Sparus aurata*): cDNA cloning and characterisation. *Endocrinology*, 140(5), 2430–2433. doi:10.1210/endo.140.5.6898
- Sargent, J. R. (1989). Ether-linked glycerides in marine animals. In R. Ackman (Ed.), Marine biogenic lipids, fats and oils (p. 175–198). Boca Raton, FA: CRC Press
- Shaw, S.D., Kannan, K. (2009). Polybrominated diphenyl ethers in marine ecosystems of the American continents: foresight from current knowledge. *Reviews on Environmental Health*, 24(3), 157–229
- Shen, L., Jobst, K.J., Reiner, E.J., Helm, P.A., McCrindle, R., Taguchi, V.Y., Marvin, C.H., Backus, S., MacPherson, K.A., Brindle, I.D. (2014). Identification and Occurrence of Analogues of Dechlorane 604 in Lake Ontario Sediment and their Accumulation in Fish. *Environmental Science & Technology*, 48(19), 11170–11177. doi:10.1021/es503089c
- Sinha, R.A., Singh, B.K., Yen, P.M. (2014). Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(10), 538–545. doi:10.1016/j.tem.2014.07.001
- Smolders, R., Bervoets, L., De, B.G., Blust, R. (2002). Integrated condition indices as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 21(1), 87–93
- Speranza, E.D., Colombo, J.C. (2009). Biochemical composition of a dominant detritivorous fish Prochilodus lineatus along pollution gradients in the Paraná-Río de la Plata Basin. *Journal of Fish Biology*, 74(6), 1226–1244. doi:10.1111/j.1095-8649.2009.02191.x
- Sverko, E., Tomy, G.T., Reiner, E.J., Li, Y.-F., McCarry, B.E., Arnot, J.A., Law, R.J., Hites, R.A. (2011). Dechlorane Plus and Related Compounds in the Environment: A Review. *Environmental Science & Technology*, 45(12), 5088–5098. doi:10.1021/es2003028
- Tocher, D.R. (2003). Metabolism and Functions of Lipids and Fatty Acids in Teleost Fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(2), 107–184. doi:10.1080/713610925

- Tu, W., Xu, C., Lu, B., Lin, C., Wu, Y., Liu, W. (2016). Acute exposure to synthetic pyrethroids causes bioconcentration and disruption of the hypothalamus– pituitary–thyroid axis in zebrafish embryos. *Science of The Total Environment*, 542, 876–885. doi:10.1016/j.scitotenv.2015.10.131
- Vajda, A.M., Barber, L.B., Gray, J.L., Lopez, E.M., Woodling, J.D., Norris, D.O., 2008. Reproductive Disruption in Fish Downstream from an Estrogenic Wastewater Effluent. *Environmental Science & Technology*, 42(9), 3407– 3414. doi:10.1021/es0720661
- Van de Merwe, J.P., Chan, A.K.Y., Lei, E.N.Y., Yau, M.S., Lam, M.H.W., Wu, R.S.S. (2011). Bioaccumulation and maternal transfer of PBDE 47 in the marine medaka (*Oryzias melastigma*) following dietary exposure. *Aquatic Toxicology*, 103(3-4), 199–204. doi:10.1016/j.aquatox.2011.02.021
- Viganò, L., De Flora, S., Gobbi, M., Guiso, G., Izzotti, A., Mandich, A., Mascolo, G., Roscioli, C. (2015). Exposing native cyprinid (*Barbus plebejus*) juveniles to river sediments leads to gonadal alterations, genotoxic effects and thyroid disruption. *Aquatic Toxicology*, 169, 223–239. doi:10.1016/j.aquatox.2015.10.022
- Wang, Y., Li, X., Li, A., Wang, T., Zhang, Q., Wang, P., Fu, J., Jiang, G. (2007). Effect of Municipal Sewage Treatment Plant Effluent on Bioaccumulation of Polychlorinated Biphenyls and Polybrominated Diphenyl Ethers in the Recipient Water. *Environmental Science & Technology*, 41(17), 6026–6032. doi:10.1021/es070913u
- Yu, L., Deng, J., Shi, X., Liu, C., Yu, K., Zhou, B. (2010). Exposure to DE-71 alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic-pituitarythyroid axis of zebrafish larvae. *Aquatic Toxicology*, 97(3), 226–233. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.022
- Yu, L., Han, Z., Liu, C. (2015). A review on the effects of PBDEs on thyroid and reproduction systems in fish. *General and Comparative Endocrinology*, 219, 64–73. doi:10.1016/j.ygcen.2014.12.010
- Yu, W.K., Shi, Y.F., Fong, C.C., Chen, Y., van de Merwe, J.P., Chan, A.K.Y., Wei, F., Bo, J., Ye, R., Au, D.W.T., Wu, R.S.S., Yang, M.S., 2013. Gender-specific transcriptional profiling of marine medaka (*Oryzias melastigma*) liver upon BDE-47 exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 8(3), 255–262. doi:10.1016/j.cbd.2013.06.004

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

Ce projet de maîtrise avait pour objectif de déterminer si l'exposition chronique à l'effluent de Montréal pouvait être associée à une perturbation du métabolisme énergétique lipidique chez le grand brochet du fleuve Saint-Laurent. Grâce à l'utilisation d'un ensemble de biomarqueurs, il a été possible de comparer les réponses biologiques des brochets entre un site en amont et un site en aval du point de déversement de l'effluent dans le fleuve. Les résultats de cette étude suggèrent que le métabolisme des acides gras est affecté au niveau génique, enzymatique et hormonal chez les brochets exposés aux rejets urbains. En outre, il a été observé que les niveaux de transcription de gènes liés au catabolisme et à la synthèse des acides gras, ainsi que l'activité d'une enzyme lipolytique et les niveaux de T₃ circulantes sont corrélés aux concentrations de PBDE dans le foie. Ceci suggère que les PBDE contenus dans l'effluent pourraient avoir un impact sur le métabolisme des acides gras d'une espèce située au sommet de la chaîne alimentaire aquatique.

Contrairement à ce qui était attendu, aucun effet n'a pu être observé au niveau du transport des acides gras dans le foie. De plus, l'exposition à l'effluent ne semble pas être associée à une prolifération peroxisomale, mais plutôt à une réduction de la β-oxydation dans les peroxysomes chez le brochet, ce qui est suggéré par la diminution de la transcription et de l'activité de l'ACOX. Il serait intéressant d'évaluer si un effet similaire pourrait s'observer au niveau de la β-oxydation mitochondriale, en ciblant des enzymes telles que la carnitine acyltransférase.

Cette étude a permis de corroborer l'hypothèse d'une possible perturbation de l'axe thyroïdien chez les brochets exposés à l'effluent, bien que celle-ci se manifestait par une augmentation plutôt que par une diminution des niveaux de T_3 circulante. La mesure des concentrations de thyroxine dans le plasma, des niveaux de transcription

des déiodinases ainsi que de leur activité dans le foie serait nécessaire pour interpréter adéquatement cette observation. L'effluent de Montréal consitue une source de contamination environnementale, mais aussi un apport important de matière organique qui est incorporée dans la chaîne alimentaire aquatique. Il est donc possible que l'augmentation des niveaux de T₃ circulante chez les brochets de l'effluent ne soit pas due (ou du moins pas uniquement) aux contaminants contenus dans ces eaux, mais qu'elle soit liée au statut nutritionnel des individus.

Les résultats de cette étude soulignent également l'importance de considérer les différences liées au sexe dans un contexte d'évaluation de la toxicité d'un mélange de contaminants sur les réponses biologiques des organismes exposés. En effet, les changements au niveau génique et enzymatique associés à l'exposition à l'effluent n'ont été observés que chez les mâles, tandis que les réponses des femelles se situaient uniquement au niveau hormonal.

L'exposition à l'effluent de Montréal a donc des effets sur le métabolisme lipidique des brochets du Saint-Laurent, et ce à plusieurs niveaux de leur organisation biologique, sans que cela se répercute sur la teneur en lipides totaux dans le foie ni sur leur condition. On sait cependant que l'exposition à certains contaminants tels que les HAP et les alkylphénols est associée à une altération de la composition des acides gras dans le foie chez la morue atlantique (Gadus morhua) et l'aiglefin (Melanogrammus aeglefinus) (Balk et al., 2011; Meier et al., 2007). La caractérisation du profil des acides gras et de leurs métabolites dans le foie des brochets exposés à l'effluent de Montréal constituerait une perspective intéressante à ce projet. Enfin, les informations fournies par cette étude pourraient servir d'appui aux décideurs en vue d'améliorer les politiques municipales de gestion des eaux usées protection pour une meilleure de l'écosystème du Saint-Laurent.

70

BIBLIOGRAPHIE

- Aravindakshan, J. (2004). Consequences of xenoestrogen exposure on male reproductive function in spottail shiners (*Notropis hudsonius*). *Toxicological Sciences*, 78(1), 156–165. doi:10.1093/toxsci/kfh042
- Arstikaitis, J., Gagné, F., Cyr, D.G. (2014). Exposure of fathead minnows to municipal wastewater effluent affects intracellular signaling pathways in the liver. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 164, 1–10. doi:10.1016/j.cbpc.2014.04.002
- Bahamonde, P.A., McMaster, M.E., Servos, M.R., Martyniuk, C.J., Munkittrick, K.R. (2015). Molecular pathways associated with the intersex condition in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) following exposures to municipal wastewater in the Grand River basin, ON, Canada. Part B. *Aquatic Toxicology*, 159, 302– 316. doi:10.1016/j.aquatox.2014.11.022
- Bahamonde, P.A., Tetreault, G.R., McMaster, M.E., Servos, M.R., Martyniuk, C.J., Munkittrick, K.R. (2014). Molecular signatures in rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*) inhabiting an urbanized river reach receiving wastewater effluents. *Aquatic Toxicology*, 148, 211–220. doi:10.1016/j.aquatox.2014.01.010
- Balk, L., Hylland, K., Hansson, T., Berntssen, M.H.G., Beyer, J., Jonsson, G., Melbye, A., Grung, M., Torstensen, B.E., Børseth, J.F., Skarphedinsdottir, H., Klungsøyr, J. (2011). Biomarkers in natural fish populations indicate adverse biological effects of offshore oil production. *PLoS ONE*, 6(5), e19735. doi:10.1371/journal.pone.0019735
- Barrington, E.J.W., Barron, N., Piggins, D.J. (1961). The influence of thyroid powder and thyroxine upon the growth of rainbow trout (*Salmo gairdnerii*). *General and Comparative Endocrinology*, 1(2), 170–178. doi:10.1016/0016-6480(61)90045-4
- Behera, S.K., Kim, H.W., Oh, J.-E., Park, H.-S. (2011). Occurrence and removal of antibiotics, hormones and several other pharmaceuticals in wastewater

treatment plants of the largest industrial city of Korea. Science of The Total Environment, 409(20), 4351–4360. doi:10.1016/j.scitotenv.2011.07.015

- Bernatchez, L., Giroux, M. (2012). Les poissons d'eau douce du Québec et leur répartition dans l'est du Canada, (nouvelle édition mise à jour, p. 120-122). Saint-Constant : Éditions Broquet
- Bizarro, C., Eide, M., Hitchcock, D.J., Goksøyr, A., Ortiz-Zarragoitia, M. (2016). Single and mixture effects of aquatic micropollutants studied in precision-cut liver slices of Atlantic cod (*Gadus morhua*). Aquatic Toxicology, 177, 395– 404. doi:10.1016/j.aquatox.2016.06.013
- Blaise, C., Trottier, S., Gagné, F., Lallement, C., Hansen, P.-D. (2002). Immunocompetence of bivalve hemocytes as evaluated by a miniaturized phagocytosis assay: Immunocompetence Assay for bivalve hemocyte. *Environmental Toxicology*, 17(3), 160–169. doi:10.1002/tox.10047
- Boeymans, J., Panneels, V., van Sande, J., Braekman, J. (1995). Un rôle physiologique des plasmalogènes: la protection contre le stress oxydatif et l'excès d'iode. *Médecine/sciences*, 11(2), 254-259. doi:10.4267/10608/2193
- Boulay, J., Cejka, P. et Levesque, R. (1999). La réforme de la gestion de l'eau à la communauté urbaine de Montréal "Une œuvre en cours". Montréal : Communauté urbaine de Montréal, Service de l'environnement
- Brar, N.K., Waggoner, C., Reyes, J.A., Fairey, R., Kelley, K.M. (2010). Evidence for thyroid endocrine disruption in wild fish in San Francisco Bay, California, USA. Relationships to contaminant exposures. *Aquatic Toxicology*, 96(3), 203–215. doi:10.1016/j.aquatox.2009.10.023
- Brown, S.B., Adams, B.A., Cyr, D.G., Eales, J.G. (2004). Contaminant effects on the teleost fish thyroid. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23(7), 1680-1701. doi:10.1897/03-242
- Bruslé, J., Quignard, J.-P. (2005). Les poissons et leur environnement: écophysiologie et comportements adaptatifs (p. 247-265). Paris : Éditions Tec & Doc.
- Cajaraville, M.P., Cancio, I., Ibabe, A., Orbea, A. (2003). Peroxisome proliferation as a biomarker in environmental pollution assessment. *Microscopy Research and Technique*, *61*(2), 191–202. doi:10.1002/jemt.10329
- Carballa, M., Omil, F., Lema, J.M., Llompart, M., García-Jares, C., Rodríguez, I., Gómez, M., Ternes, T. (2004). Behavior of pharmaceuticals, cosmetics and

hormones in a sewage treatment plant. Water Research, 38(12), 2918–2926. doi:10.1016/j.watres.2004.03.029

- Celander, M.C. (2011). Cocktail effects on biomarker responses in fish. Aquatic Toxicology, 105(3-4), 72-77. doi:10.1016/j.aquatox.2011.06.002
- Chellappa, S., Huntingford, F.A., Strang, R.H.C., Thomson, R.Y. (1995). Condition factor and hepatosomatic index as estimates of energy status in male three-spined stickleback. *Journal of Fish Biology*, 47(5), 775–787. doi:10.1111/j.1095-8649.1995.tb06002.x
- Communauté métropolitaine de Montréal. [s.d.]. *Observatoire Grand Montréal*. Récupéré le 15 mars 2017 de http://cmm.gc.ca/donnees-et-territoire/observatoire-grand-montreal
- Corcoran, J., Winter, M.J., Tyler, C.R. (2010). Pharmaceuticals in the aquatic environment: A critical review of the evidence for health effects in fish. *Critical Reviews in Toxicology*, 40(4), 287–304. doi:10.3109/10408440903373590
- Covaci, A., Harrad, S., Abdallah, M.A.-E., Ali, N., Law, R.J., Herzke, D., de Wit, C.A. (2011). Novel brominated flame retardants: A review of their analysis, environmental fate and behaviour. *Environment International*, 37(2), 532–556. doi:10.1016/j.envint.2010.11.007
- De Wit, C.A., Herzke, D., Vorkamp, K. (2010). Brominated flame retardants in the Arctic environment trends and new candidates. *Science of The Total Environment*, 408(15), 2885–2918. doi:10.1016/j.scitotenv.2009.08.037
- Driedger, K., Weber, L.P., Rickwood, C.J., Dubé, M.G., Janz, D.M. (2009). Overwinter alterations in energy stores and growth in juvenile fishes inhabiting areas receiving metal mining and municipal wastewater effluents. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 28(2), 296-304. doi:10.1897/08-028.1
- Eddy, B., Handy, R.D. (2012). *Ecological and environmental physiology of fishes* (1ère éd., p. 45-57). Oxford: Oxford University Press
- Fuzzen, M.L.M., Bennett, C.J., Tetreault, G.R., McMaster, M.E., Servos, M.R. (2015). Severe intersex is predictive of poor fertilization success in populations of rainbow darter (*Etheostoma caeruleum*). Aquatic Toxicology, 160, 106–116. doi:10.1016/j.aquatox.2015.01.009

- Gagné, F., Blaise, C., Hellou, J. (2004). Endocrine disruption and health effects of caged mussels, *Elliptio complanata*, placed downstream from a primarytreated municipal effluent plume for 1 year. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 138(1), 33–44. doi:10.1016/j.cca.2004.04.006
- Gagné, F., Blaise C. (1995). Fluorescent in situ hybridization En Suspension (FISHES) procedure using biotin-labelled DNA probes for measuring genetic expression of metallothionein and cytochrome P-450 IA1 in rainbow trout hepatocytes exposed to wastewaters. Dans M. Richardson (dir.), *Environmental toxicology assessment* (p. 41–54). London: Taylor & Francis
- Gagnon, C., Saulnier, I. (2003). Distribution and fate of metals in the dispersion plume of a major municipal effluent. *Environmental Pollution*, 124(1), 47–55. doi:10.1016/S0269-7491(02)00433-5
- Garcia-Reyero, N., Lavelle, C.M., Escalon, B.L., Martinović, D., Kroll, K.J., Sorensen, P.W., Denslow, N.D. (2011). Behavioral and genomic impacts of a wastewater effluent on the fathead minnow. *Aquatic Toxicology*, 101(1), 38– 48. doi:10.1016/j.aquatox.2010.08.014
- Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P. (2011). Enzymatic correlates of energy status in wild yellow perch inhabiting clean and contaminated environments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(9), 2148–2156. doi:10.1002/etc.609
- Gauthier, C., Campbell, P.G.C., Couture, P. (2008). Physiological correlates of growth and condition in the yellow perch (*Perca flavescens*). Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology, 151(4), 526–532. doi:10.1016/j.cbpa.2008.07.010
- Gobeil, C., Rondeau, B., Beaudin, L. (2005). Contribution of municipal effluents to metal fluxes in the St. Lawrence River. *Environmental Science & Technology*, 39(2), 456–464. doi:10.1021/es049335x
- Hasenbein, M., Werner, I., Deanovic, L.A., Geist, J., Fritsch, E.B., Javidmehr, A., Foe, C., Fangue, N.A., Connon, R.E. (2014). Transcriptomic profiling permits the identification of pollutant sources and effects in ambient water samples. Science of The Total Environment, 468-469, 688-698. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.08.081
- Hashimoto, K., Ishida, E., Matsumoto, S., Okada, S., Yamada, M., Satoh, T., Monden, T., Mori, M., 2009. Carbohydrate response element binding protein

gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology*, 150(7), 3417–3424. doi:10.1210/en.2009-0059

- Hashimoto, K., Matsumoto, S., Yamada, M., Satoh, T., Mori, M. (2007). Liver X receptor-α gene expression is positively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology*, 148(10), 4667–4675. doi:10.1210/en.2007-0150
- Hashimoto, K., Yamada, M., Matsumoto, S., Monden, T., Satoh, T., Mori, M. (2006). Mouse sterol response element binding protein-1c gene expression is negatively regulated by thyroid hormone. *Endocrinology*, 147(9), 4292–4302. doi:10.1210/en.2006-0116
- Hébert, N., Gagné, F., Cejka, P., Cyr, D., Marcogliese, D.J., Blaise, C., Pellerin, J., Fournier, M. (2008). The effects of a primary-treated municipal effluent on the immune system of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Exposure duration and contribution of suspended particles. *Comparative Biochemistry* and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 148(3), 258–264. doi:10.1016/j.cbpc.2008.06.007
- Henderson, R.J. (1996). Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids. Archiv für Tierernaehrung, 49(1), 5– 22. doi:10.1080/17450399609381859
- Holeton, C., Chambers, P.A., Grace, L., Kidd, K. (2011). Wastewater release and its impacts on Canadian waters. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 68(10), 1836–1859. doi:10.1139/f2011-096
- Holth, T.F., Beckius, J., Zorita, I., Cajaraville, M.P., Hylland, K. (2011). Assessment of lysosomal membrane stability and peroxisome proliferation in the head kidney of Atlantic cod (*Gadus morhua*) following long-term exposure to produced water components. *Marine Environmental Research*, 72(3), 127– 134. doi:10.1016/j.marenvres.2011.07.001
- Hontela, A., Dumont, P., Duclos, D., Fortin, R. (1995). Endocrine and metabolic dysfunction in yellow perch, *Perca flavescens*, exposed to organic contaminants and heavy metals in the St. Lawrence River. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 14(4), 725–731. doi:10.1002/etc.5620140421
- Houde, M., Douville, M., Despatie, S.-P., De Silva, A.O., Spencer, C. (2013). Induction of gene responses in St. Lawrence River northern pike (*Esox lucius*) environmentally exposed to perfluorinated compounds. *Chemosphere*, 92(9), 1195–1200. doi:10.1016/j.chemosphere.2013.01.099

- Houde, M., Berryman, D., de Lafontaine, Y., Verreault, J. (2014a). Novel brominated flame retardants and dechloranes in three fish species from the St. Lawrence River, Canada. Science of The Total Environment, 479-480, 48–56. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.01.105
- Houde, M., Giraudo, M., Douville, M., Bougas, B., Couture, P., De Silva, A.O., Spencer, C., Lair, S., Verreault, J., Bernatchez, L., Gagnon, C. (2014b). A multi-level biological approach to evaluate impacts of a major municipal effluent in wild St. Lawrence River yellow perch (*Perca flavescens*). Science of The Total Environment, 497-498, 307-318. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.059
- Ings, J.S., Oakes, K.D., Vijayan, M.M., Servos, M.R. (2012). Temporal changes in stress and tissue-specific metabolic responses to municipal wastewater effluent exposure in rainbow trout. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 156(2), 67–74. doi:10.1016/j.cbpc.2012.04.002
- Ings, J.S., Servos, M.R., Vijayan, M.M. (2011). Hepatic transcriptomics and protein expression in rainbow trout exposed to municipal wastewater effluent. *Environmental Science & Technology*, 45(6), 2368–2376. doi:10.1021/es103122g
- Kelly, B.C., Ikonomou, M.G., Blair, J.D., Gobas, F.A.P.C. (2008). Bioaccumulation behaviour of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in a Canadian Arctic marine food web. *Science of The Total Environment*, 401(1-3), 60–72. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.03.045
- Lajeunesse, A., Gagnon, C. (2007). Determination of acidic pharmaceutical products and carbamazepine in roughly primary-treated wastewater by solid-phase extraction and gas chromatography-tandem mass spectrometry. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 87(8), 565–578. doi:10.1080/03067310701189083
- Lajeunesse, A., Gagnon, C., Sauvé, S. (2008). Determination of basic antidepressants and their *N*-desmethyl metabolites in raw sewage and wastewater using solidphase extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical Chemistry*, 80(14), 5325–5333. doi:10.1021/ac800162q
- Laliberté, D. (2011). Teneurs en polybromodiphényléthers (PBDE) dans les poissons du fleuve Saint-Laurent et des lacs et rivières du Québec (2002-2008). [Rapport]. Québec : ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs, Direction du suivi de l'état de l'environnement

- Laprairie, R.B., Denovan-Wright, E.M., Wright, J.M. (2016). Subfunctionalization of peroxisome proliferator response elements accounts for retention of duplicated fabp1 genes in zebrafish. *BMC Evolutionary Biology*, *16*(1), 147. doi:10.1186/s12862-016-0717-x
- La Roche, G., Johnson, C.L., Woodall, A.N. (1965). Thyroid function in the rainbow trout (Salmo gairdneri, Rich.). General and Comparative Endocrinology, 5(2), 145–159. doi:10.1016/0016-6480(65)90110-3
- Law, K., Halldorson, T., Danell, R., Stern, G., Gewurtz, S., Alaee, M., Marvin, C., Whittle, M., Tomy, G. (2006). Bioaccumulation and trophic transfer of some brominated flame retardants in a Lake Winnipeg (Canada) food web. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25(8), 2177. doi:10.1897/05-500R.1
- Law, R.J., Covaci, A., Harrad, S., Herzke, D., Abdallah, M.A.-E., Fernie, K., Toms, L.-M.L., Takigami, H. (2014). Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: Status at the end of 2012. *Environment International*, 65, 147–158. doi:10.1016/j.envint.2014.01.006
- Leaver, M.J., Boukouvala, E., Antonopoulou, E., Diez, A., Favre-Krey, L., Ezaz, M.T., Bautista, J.M., Tocher, D.R., Krey, G. (2005). Three peroxisome proliferator-activated receptor isotypes from each of two species of marine fish. *Endocrinology*, 146(7), 3150–3162. doi:10.1210/en.2004-1638
- Linares, V., Bellés, M., Domingo, J.L. (2015). Human exposure to PBDE and critical evaluation of health hazards. *Archives of Toxicology*, *89*(3), 335–356. doi:10.1007/s00204-015-1457-1
- Liney, K.E., Hagger, J.A., Tyler, C.R., Depledge, M.H., Galloway, T.S., Jobling, S. (2006). Health effects in fish of long-term exposure to effluents from wastewater treatment works. *Environmental Health Perspectives*, 114, 81–89. doi:10.1289/ehp.8058
- Liu, Y.-Y., Brent, G.A., 2010. Thyroid hormone crosstalk with nuclear receptor signaling in metabolic regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 21(3), 166–173. doi:10.1016/j.tem.2009.11.004
- Luo, Y., Guo, W., Ngo, H.H., Nghiem, L.D., Hai, F.I., Zhang, J., Liang, S., Wang, X.C. (2014). A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. *Science* of The Total Environment, 473-474, 619–641. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.12.065

- Marcogliese, D.J., Blaise, C., Cyr, D., de Lafontaine, Y., Fournier, M., Gagné, F., Gagnon, C., Hudon, C. (2015). Effects of a major municipal effluent on the St. Lawrence River: A case study. *AMBIO*, 44(4), 257–274. doi:10.1007/s13280-014-0577-9
- Marcogliese, D.J., Gendron, A.D., Cone, D.K. (2009). Impact of municipal effluents and hydrological regime on myxozoan parasite communities of fish. *International Journal for Parasitology*, 39(12), 1345–1351. doi:10.1016/j.ijpara.2009.04.007
- McElroy, A.E., Hice, L.A., Frisk, M.G., Purcell, S.L., Phillips, N.C., Fast, M.D. (2015). Spatial patterns in markers of contaminant exposure, glucose and glycogen metabolism, and immunological response in juvenile winter flounder (*Pseudoplueronectes americanus*). Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 14, 53–65. doi:10.1016/j.cbd.2015.01.006
- Medford, B.A., Mackay, W.C. (1978). Protein and lipid content of gonads, liver, and muscle of northern pike (*Esox lucius*) in relation to gonad growth. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 35(2), 213–219. doi:10.1139/f78-035
- Meier, S., Andersen, T.C., Lind-Larsen, K., Svardal, A., Holmsen, H. (2007). Effects of alkylphenols on glycerophospholipids and cholesterol in liver and brain from female Atlantic cod (*Gadus morhua*). Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 145(2), 420–430. doi:10.1016/j.cbpc.2007.01.012
- Ménard, L., Escarné, R., Marcogliese, D.J., Cyr, D., Fournier, M., Gagné, F. (2010). The impacts of urban pollution on the immune system of spottail shiners (*Notropis hudsonius*) in the St. Lawrence River. *Fresenius Environmental* Bulletin, 19(7), 1369–1374
- Moens, L.N., Smolders, R., van der Ven, K., van Remortel, P., Del-Favero, J., De Coen, W.M. (2007). Effluent impact assessment using microarray-based analysis in common carp: A systems toxicology approach. *Chemosphere*, 67(11), 2293–2304. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.09.092
- Moreira, J. (2011) Évaluation de la performance des ouvrages municipaux d'assainissement des eaux pour l'année 2010. Ouvrages de surverse et stations d'épuration. [Rapport]. Québec : Ministère des Affaires Municipales, Régions et occupation du territoire (MAMROT)

- Murat, J. C., Serfaty, A. (1970). Au sujet d'un effet hypoglycémiant de la thyroxine chez la carpe, *Cyprinus carpio* L. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie et de ses filiales*, 164, 1842-1845
- Narayansingh, T., Eales, J.G. (1975). The influence of physiological doses of thyroxine on the lipid reserves of starved and fed brook trout, Salvelinus fontinalis (mitchill). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry, 52(3), 407-412. doi:10.1016/0305-0491(75)90153-4
- Nilsen, E., Zaugg, S., Alvarez, D., Morace, J., Waite, I., Counihan, T., Hardiman, J., Torres, L., Patiño, R., Mesa, M., Grove, R., 2014. Contaminants of legacy and emerging concern in largescale suckers (*Catostomus macrocheilus*) and the foodweb in the lower Columbia River, Oregon and Washington, USA. Science of The Total Environment 484, 344–352. doi:10.1016/j.scitotenv.2013.04.012
- Norris, D.O. (2007). Vertebrate endocrinology (4e éd., p. 170-181, 448-450). Amsterdam; Boston, MA: Elsevier Academic Press
- Noyes, P.D., Stapleton, H.M. (2014). PBDE flame retardants: Toxicokinetics and thyroid hormone endocrine disruption in fish. *Endocrine Disruptors*, 2(1), e29430. doi:10.4161/endo.29430
- Olivares-Rubio, H.F., Vega-López, A. (2016). Fatty acid metabolism in fish species as a biomarker for environmental monitoring. *Environmental Pollution*, 218, 297–312. doi:10.1016/j.envpol.2016.07.005
- Overturf, M.D., Anderson, J.C., Pandelides, Z., Beyger, L., Holdway, D.A. (2015). Pharmaceuticals and personal care products: A critical review of the impacts on fish reproduction. *Critical Reviews in Toxicology*, 45(6), 469–491. doi:10.3109/10408444.2015.1038499
- Pelletier, M., Rondeau, M. (2013). Polybrominated diphenyl ethers in the suspended matter and sediments of the St. Lawrence River. [Rapport]. Canada: Ministère de l'Environnement et Québec : Ministère du Développement durable, de l'Environnement, de la Faune et des Parcs
- Petala, M., Kokokiris, L., Samaras, P., Papadopoulos, A., Zouboulis, A. (2009). Toxicological and ecotoxic impact of secondary and tertiary treated sewage effluents. *Water Research*, 43(20), 5063–5074. doi:10.1016/j.watres.2009.08.043

- Pham, T.-T., Proulx, S. (1997). PCBs and PAHs in the Montreal Urban Community (Quebec, Canada) wastewater treatment plant and in the effluent plume in the St Lawrence River. *Water Research*, 31(8), 1887–1896. doi:10.1016/S0043-1354(97)00025-0
- Pham, T.-T., Proulx, S., Brochu, C., Moore, S. (1999). Composition of PCBs and PAHs in the Montreal Urban Community wastewater and in the surface Water of the St. Lawrence River (Canada). *Water, Air, and Soil Pollution*, 111(1), 251–270. doi:10.1023/A:1005090309906
- Poirier, Y., Antonenkov, V.D., Glumoff, T., Hiltunen, J.K. (2006). Peroxisomal βoxidation - A metabolic pathway with multiple functions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1763(12), 1413–1426. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.08.034
- Racz, L., Goel, R.K. (2010). Fate and removal of estrogens in municipal wastewater. Journal of Environmental Monitoring, 12(1), 58–70. doi:10.1039/B917298J
- Rayne, S., Ikonomou, M.G. (2005). Polybrominated diphenyl ethers in an advanced wastewater treatment plant. Part 1: Concentrations, patterns, and influence of treatment processes. *Journal of Environmental Engineering and Science*, 4(5), 353–367. doi:10.1139/s04-071

Règlement sur certaines substances interdites. DORS/2012-285

- Roberts, S.C., Noyes, P.D., Gallagher, E.P., Stapleton, H.M. (2011). Species-specific differences and structure–activity relationships in the debromination of PBDE congeners in three fish species. *Environmental Science & Technology*, 45(5), 1999–2005. doi:10.1021/es103934x
- Rodrigues, E., Feijó-Oliveira, M., Suda, C.N.K., Vani, G.S., Donatti, L., Rodrigues,
 E., Lavrado, H.P. (2015). Metabolic responses of the Antarctic fishes Notothenia rossii and Notothenia coriiceps to sewage pollution. Fish Physiology and Biochemistry, 41(5), 1205–1220. doi:10.1007/s10695-015-0080-7
- Salo, H., Hebert, N., Dautremepuits, C., Cejka, P., Cyr, D., Fournier, M. (2007). Effects of Montreal municipal sewage effluents on immune responses of juvenile female rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquatic Toxicology, 84(4), 406–414. doi:10.1016/j.aquatox.2007.06.014
- Sargent, J. R. (1989). Ether-linked glycerides in marine animals. In R. Ackman (Ed.), Marine biogenic lipids, fats and oils (p. 175–198). Boca Raton, FA: CRC Press

- Savage, D.B. (2005). PPAR[gamma] as a metabolic regulator: insights from genomics and pharmacology. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 7(1), 1-16. doi:10.1017/S1462399405008793
- Sinha, R.A., Singh, B.K., Yen, P.M. (2014). Thyroid hormone regulation of hepatic lipid and carbohydrate metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 25(10), 538–545. doi:10.1016/j.tem.2014.07.001
- Smolders, R., De Boeck, G., Blust, R. (2003). Changes in cellular energy budget as a measure of whole effluent toxicity in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 22(4), 890–899
- Sprague, M., Dick, J.R., Medina, A., Tocher, D.R., Bell, J.G., Mourente, G. (2012). Lipid and fatty acid composition, and persistent organic pollutant levels in tissues of migrating Atlantic bluefin tuna (*Thunnus thynnus*, L.) broodstock. *Environmental Pollution*, 171, 61–71. doi:10.1016/j.envpol.2012.07.021
- Tetreault, G.R., Bennett, C.J., Cheng, C., Servos, M.R., McMaster, M.E. (2012). Reproductive and histopathological effects in wild fish inhabiting an effluentdominated stream, Wascana Creek, SK, Canada. *Aquatic Toxicology*, 110-111, 149–161. doi:10.1016/j.aquatox.2012.01.004
- Tetreault, G.R., Bennett, C.J., Shires, K., Knight, B., Servos, M.R., McMaster, M.E. (2011). Intersex and reproductive impairment of wild fish exposed to multiple municipal wastewater discharges. *Aquatic Toxicology*, 104(3-4), 278–290. doi:10.1016/j.aquatox.2011.05.008
- Tocher, D.R. (2003). Metabolism and functions of lipids and fatty acids in teleost fish. *Reviews in Fisheries Science*, 11(2), 107–184. doi:10.1080/713610925
- Vajda, A.M., Barber, L.B., Gray, J.L., Lopez, E.M., Bolden, A.M., Schoenfuss, H.L., Norris, D.O. (2011). Demasculinization of male fish by wastewater treatment plant effluent. *Aquatic Toxicology*, 103(3-4), 213–221. doi:10.1016/j.aquatox.2011.02.007
- Vajda, A.M., Barber, L.B., Gray, J.L., Lopez, E.M., Woodling, J.D., Norris, D.O. (2008). Reproductive disruption in fish downstream from an estrogenic wastewater effluent. *Environmental Science & Technology*, 42(9), 3407–3414. doi:10.1021/es0720661
- Varga, T., Czimmerer, Z., Nagy, L. (2011). PPARs are a unique set of fatty acid regulated transcription factors controlling both lipid metabolism and inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, 1812(8), 1007–1022. doi:10.1016/j.bbadis.2011.02.014

- Vidal-Dorsch, D.E., Bay, S.M., Ribecco, C., Sprague, L.J., Angert, M., Ludka, C., Ricciardelli, E., Carnevali, O., Greenstein, D.J., Schlenk, D., Kelley, K.M., Reyes, J.A., Snyder, S., Vanderford, B., Wiborg, L.C., Petschauer, D., Sasik, R., Baker, M., Hardiman, G. (2013a). Genomic and phenotypic response of hornyhead turbot exposed to municipal wastewater effluents. *Aquatic Toxicology*, 140-141, 174–184. doi:10.1016/j.aquatox.2013.05.017
- Vidal-Dorsch, D.E., Colli-Dula, R.C., Bay, S.M., Greenstein, D.J., Wiborg, L., Petschauer, D., Denslow, N.D. (2013b). Gene expression of fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to two types of treated municipal wastewater effluents. *Environmental Science & Technology*, 47(19), 11268–11277. doi:10.1021/es401942n
- Ville de Montréal. [s.d.]. *L'eau de Montréal*. Récupéré le 15 mars 2017 de <u>http://ville.montreal.qc.ca/portal/page?_pageid=6497,141709696&_dad=porta l& schema=PORTAL</u>