



# **Perturbation du transport plasmatique des hormones thyroïdiennes par les contaminants environnementaux chez les femmes Inuit en âge de procréer du Nunavik**

**Mémoire**

**Yannick Audet Delage**

**Maîtrise en médecine expérimentale**  
Maîtrise ès sciences (M.Sc.)

Québec, Canada

© Yannick Audet Delage, 2013



## Résumé

La population inuite du Nunavik est exposée aux polluants organiques persistants (POP) par son alimentation traditionnelle. Certains POP (métabolites des BPC, pentachlorophénol et perfluorooctane sulfonate) peuvent interférer avec la liaison de la thyroxine (T4) à la transthyréine (TTR), une protéine de transport des hormones thyroïdiennes. Pour vérifier s'il y avait perturbation du transport, la T4 liée à la TTR a été mesurée dans le plasma de 120 femmes inuites âgées entre 18 et 39 ans, recrutées lors de l'Étude sur la santé des Inuit 2004 – *Qanuippitaa? How are we?*. Les niveaux de TTR, TBG (*thyroxin-binding globulin*) et T4 total sont associés ( $p < 0,002$ ) aux concentrations de T4 liée à la TTR, alors que les POP ne le sont pas (R-carré ajusté du modèle = 0,27,  $p < 0,0001$ ). Ces résultats suggèrent des concentrations circulantes de POP trop faibles pour compromettre le transport de la T4 par la TTR.



## Abstract

The Inuit population of Nunavik is exposed to persistent organic pollutants (POPs) through its traditional diet. Some POPs (i.e. hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls, pentachlorophenol and perfluorooctane sulfonate) compete with thyroxin (T4) for binding sites on transthyretin (TTR), a transport protein of thyroid hormones. We tested the hypothesis that POPs decrease circulating concentrations of T4 bound to TTR (T4-TTR) in Inuit women of reproductive age, who were previously enrolled in the 2004 Inuit health study *Qanuippitaa? How are we?*. We measured the concentration of T4-TTR in plasma samples obtained from 120 Inuit women (18-39 years old). Linear regression analyses revealed that TTR, TBG and total T4 concentrations were significant predictors ( $p < 0.002$ ) of T4-TTR levels but not POPs levels (model adjusted R-square = 0.27,  $p < 0.0001$ ). Our results suggest that circulating levels of POPs in these women are not high enough to affect TTR-mediated thyroid hormone transport.



# Table des matières

Résumé.....	iii
Abstract.....	v
Table des matières.....	vii
Liste des tableaux.....	ix
Liste des figures.....	xi
Abréviations.....	xiii
Avant-Propos.....	xvii
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.1 Les polluants organiques persistants.....	2
1.1.1 Les organochlorés.....	2
1.1.2 Les diphenyléthers polybromés.....	3
1.1.3 Les composés poly- et perfluorés.....	4
1.1.4 Les métabolites hydroxylés des hydrocarbures polyhalogénés.....	5
1.2 Transport planétaire des POP et biomagnification dans les chaînes trophiques.....	6
1.3 Exposition pré- et périnatale aux contaminants environnementaux et problèmes développementaux.....	8
1.4 Le système thyroïdien.....	10
1.4.1 L'axe hypothalamo-hypophysaire-thyroïdien.....	10
1.4.2 Le transport des hormones thyroïdiennes.....	12
1.4.3 Les hormones thyroïdiennes et l'impact de leurs perturbations sur le développement du cerveau.....	17
1.4.4 Effets des contaminants environnementaux sur le système thyroïdien.....	17
1.5 Population à l'étude.....	22
1.5.1 Population cible.....	22
1.5.2 Devis de l'étude et recrutement.....	22
1.6 Hypothèses et objectifs.....	24
1.7 Démarche expérimentale.....	25
1.7.1 Analyses en laboratoire.....	25
1.7.2 Analyses statistiques.....	28
Chapitre 2 : Persistent Organic Pollutants and Transthyretin-bound Thyroxin in Plasma of Inuit Women of Childbearing Age.....	31
Abstract.....	31
Introduction.....	32
Materials and methods.....	33
Results and Discussion.....	38
Figures.....	42
Tables.....	44
Author Contributions.....	48
Funding Sources.....	48
Acknowledgment.....	48
Abbreviations.....	48
Supplemental Material.....	50
Chapitre 3 : Conclusion.....	51



## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.4.1.</b> Concentrations circulantes et demi-vies des hormones thyroïdiennes dans la population caucasienne. ....	<b>13</b>
<b>Tableau 1.4.2.</b> Tableau comparatif des protéines de transport des hormones thyroïdiennes chez l'humain. ....	<b>16</b>
<b>Tableau 1.4.3</b> Potentiels relatifs de liaison des POP sur la TTR, par rapport à la T4. ....	<b>20</b>
<b>Table 2.1.</b> Characteristics of Inuit women of childbearing age. ....	<b>44</b>
<b>Table 2.2.</b> Thyroid parameters of 120 Inuit women of reproductive age. ....	<b>45</b>
<b>Table 2.3.</b> Plasma concentrations of organohalogen contaminants (ng/L) in 120 Inuit women of reproductive age. ....	<b>46</b>
<b>Table 2.4.</b> Multiple linear regression model of plasma TTR-bound T4 levels in 120 Inuit women of reproductive age. ....	<b>47</b>
<b>Table S1.</b> Multiple linear regression model of plasma TTR-bound T4 levels in 120 Inuit women of reproductive age (sum of chlorophenols as the exposure variable). ....	<b>50</b>
<b>Table S2.</b> Multiple linear regression model of plasma TTR-bound T4 levels in 120 Inuit women of reproductive age (PFOS as the exposure variable). ....	<b>50</b>



## Liste des figures

<b>Figure 1.1.1.</b> Structure générale des BPC.....	<b>2</b>
<b>Figure 1.1.2.</b> Structure générale des PBDE. ....	<b>4</b>
<b>Figure 1.1.3.</b> Structure moléculaire du PFOA. ....	<b>5</b>
<b>Figure 1.1.4.</b> Structure d'un métabolite hydroxylé, le 4-OH-CB 107 (4-OH-2,3,3',4',5-pentachlorobiphényle). ....	<b>6</b>
<b>Figure 1.4.1.</b> Boucle de rétroaction négative de l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien. ....	<b>12</b>
<b>Figure 2.1.</b> Distribution of T4 among plasma transport proteins determined by a combination of native-PAGE and LC-MS/MS.....	<b>42</b>
<b>Figure 2.2.</b> Competition assay resulting in displacement of T4 from TTR in human plasma by 4-OH-CB 107. ....	<b>43</b>



## Abréviations

BPC	Biphényles polychlorés
HT	Hormones thyroïdiennes
LC-MS	Spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide
OH-BPC	Biphényles polychlorés hydroxylés
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBDE	<i>Polybrominated diphenylethers</i>
PCP	Pentachlorophénol
PFOS	<i>Polyfluorooctane sulfonate</i>
POP	Polluants organiques persistants
RHT	Récepteurs aux hormones thyroïdiennes
T3	Triiodothyronine
T4	Thyroxine
T4-TTR	Thyroxine liée à la transthyréline
Tg	Thyroglobuline
TBG	<i>Thyroxine-binding globulin</i>
TSH	Thyrotropine
TTR	Transthyréline



*À ceux qui m'ont soutenu  
À mon père, à ma mère  
Sans vous, rien de cela ne serait*



## **Avant-Propos**

Ce mémoire contient un article scientifique. L'ébauche de cet article a été rédigée par le candidat avec la participation des coauteurs. L'article sera soumis dans la revue *Environmental Science & Technology*. Les Drs Dallaire, Dewailly et Ayotte ont élaboré le projet de recherche et ont obtenu le financement nécessaire à sa réalisation. Mme Ouellet a quant à elle grandement contribué au développement des différentes méthodes d'analyse et à la collecte des données.



# Chapitre 1 : Introduction

Au cours des dernières décennies, des milliers de composés chimiques issus de l'activité humaine ont été relâchés dans l'environnement sans que leur innocuité ne soit vérifiée. Parmi ceux-ci se trouvent les polluants organiques persistants (POP), regroupement de produits ayant des propriétés physico-chimiques particulières : hautement lipophiles, difficilement dégradés et sujets à bioamplification. Nombre de ces composés, tels les organochlorés et les organobromés, sont maintenant connus pour avoir des conséquences néfastes sur la santé des organismes. Or, en raison de leur alimentation traditionnelle, les communautés Inuit du nord du Québec sont exposées à des doses relativement élevées de ces contaminants environnementaux, comparativement aux populations habitant le sud du Québec. Pourtant, les répercussions d'une telle exposition ne sont pas totalement élucidées.

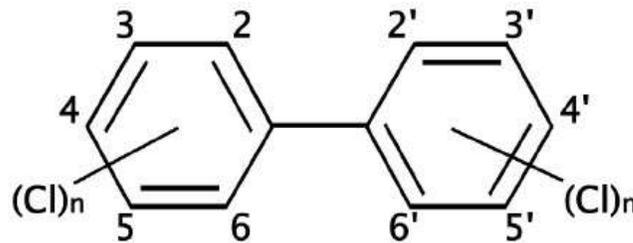
Plusieurs pistes indiquent qu'une perturbation du système endocrinien, plus particulièrement des hormones thyroïdiennes (HT), pourrait être la source de problèmes de développement neurocognitifs chez les nouveau-nés de ces communautés. Lors de la grossesse, les hormones thyroïdiennes sécrétées par la mère sont impliquées dans le développement du cerveau de l'enfant. Cependant, les POP, par leur structure moléculaire ressemblant aux hormones thyroïdiennes, viendraient perturber le transport de ces hormones vers le fœtus.

Nous avons étudié le transport des hormones thyroïdiennes chez 120 femmes inuites, âgées entre 18 et 39 ans, préalablement recrutées lors de l'Étude sur la santé des Inuit 2004 – *Qanuippitaa? How are we?*. Pour ce faire, une méthode de dosage des hormones thyroïdiennes a été créée pour chaque fraction (libre, liée et totale), et l'association entre les POP et les hormones thyroïdiennes liées à la protéine de transport TTR a été vérifiée par la création de modèles de régressions linéaires multiples.

## 1.1 Les polluants organiques persistants

### 1.1.1 Les organochlorés

Les biphényles polychlorés (BPC) sont sans contredit les plus étudiés des organochlorés. Utilisés comme pesticides, fongicides ou encore comme isolants électriques, ces produits ont fait l'objet d'une production massive pendant près de 50 ans. Même s'ils sont interdits depuis les années 1970 dans plusieurs pays, de fortes concentrations de ces composés sont encore retrouvées dans l'environnement et chez presque tous les organismes, incluant l'humain [1]. Il existe 209 congénères de BPC, selon les substitutions des atomes de chlore sur les deux anneaux benzène. Les propriétés chimiques et toxicologiques de ces molécules varient en fonction du nombre de substitution et de la conformation de la molécule. Par exemple, les congénères ne portant pas d'atome de chlore en position *ortho* (non-ortho BPC), tels les BPC 126 et 169, sont les plus toxiques car leur structure est semblable à celle de la 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine. Ces produits sont hautement liposolubles, se dégradent lentement dans l'environnement, s'accumulent dans les différents organismes et s'amplifient le long de la chaîne alimentaire.



**Figure 1.1.1.** Structure générale des BPC. Leur niveau de substitution peut varier entre 1 et 10 atomes de chlore.

Chez les animaux, une exposition à ces composés peut engendrer des effets néfastes sur le système reproducteur, notamment une diminution des concentrations de récepteurs aux œstrogènes [2] et une augmentation de la mortalité embryonnaire et fœtale [3]. Certaines

études, quant à elles, suggèrent une dépression de la fonction immunitaire, par le biais d'une diminution du volume du thymus et de l'activité des cellules NK [4], ou encore par une diminution des niveaux d'immunoglobulines IgM et IgG [5] et de la résistance aux infections [6, 7]. Plusieurs études chez l'animal ont mis en évidence le potentiel cancérigène des BPC, notamment une augmentation de l'incidence d'adénocarcinomes gastriques et de tumeurs dans le foie et la glande thyroïde [8-11].

Chez l'humain, les conséquences d'une exposition aux BPC sont plus difficiles à cerner en raison des nombreuses variables inhérentes. Pourtant, une tendance semble ressortir chez des travailleurs exposés à ces composés : augmentation de la fréquence de décès par cancer gastro-intestinal [12], du foie, de la vésicule biliaire, du tractus biliaire [13] ou encore par mélanomes malins [14]. Le système thyroïdien peut aussi être affecté par une exposition à ces produits, résultant en une perturbation des récepteurs aux hormones thyroïdiennes (RHT), des concentrations des hormones circulantes et du transport de celles-ci. (**Sections 1.4.3 et 1.4.4**)

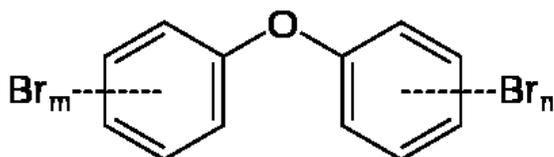
Outre les BPC, d'autres types d'organochlorés présentent un risque pour la santé humaine, notamment le dichlorodiphényltrichloroéthane (DDT), le pentachlorophénol (PCP), l'hexachlorobenzène (HCB), les polychlorodibenzo-*p*-dioxines et les polychlorodibenzofuranes. Une exposition à ces molécules peut mener à divers effets toxiques. Ainsi peuvent se développer des troubles dermatologiques (chloracné, hyperpigmentation, hirsutisme), digestifs ou de la porphyrie [15, 16] ; une augmentation des risques de cancer [17, 18] et d'effets délétères au niveau reproducteur sont aussi répertoriés [18].

### **1.1.2 Les diphényléthers polybromés**

Les diphényléthers polybromés (PBDE; *polybrominated diphenylethers*) sont des composés formés de deux noyaux aromatiques reliés par un lien éther. En fonction des substitutions des atomes de brome, un total de 209 congénères peut être formé. Ces composés sont surtout utilisés pour leurs propriétés ignifuges et sont présents dans nombre de produits électroniques, ainsi que dans les mousses et rembourrures de mobilier [19]. Tout comme les

BPC, les PBDE sont très liposolubles, peu enclins à la dégradation et ils s'accumulent dans les chaînes trophiques [20]. Ceux-ci sont considérés depuis la fin des années 1990 comme des contaminants émergents et font l'objet d'une attention particulière depuis leur détection chez les humains [21, 22] et dans le lait de femmes suédoises [23]. En Amérique du Nord, ils ont été détectés en 2001 dans des échantillons de sang collectés chez des adultes d'origine américaine en 1988 [24]. D'ailleurs, l'utilisation de mélanges commerciaux contenant des penta- et octa-BDE a été bannie dès 2004 dans cette même région, et celle du déca-BDE l'est depuis 2012. Cependant, les concentrations de ces composés bromés ne sont pas encore significativement à la baisse dans les Grands Lacs, région contaminée par l'activité industrielle adjacente [25].

Des travaux réalisés chez les animaux ont montré que certains congénères de PBDE pouvaient amener une diminution de la fonction immunitaire ou encore une modification de la physiologie du foie, du système reproducteur femelle et de la glande thyroïde chez le rat [26-28]. D'autres études suggèrent qu'une exposition à ces composés puisse mener à une altération du développement neurologique et à des troubles neurocomportementaux chez les animaux et l'humain [29].



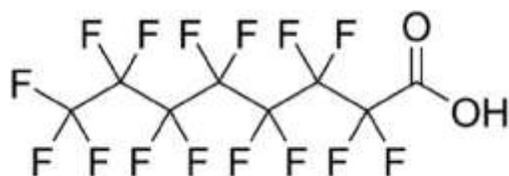
**Figure 1.1.2.** Structure générale des PBDE.

### 1.1.3 Les composés poly- et perfluorés

Les composés poly- et perfluorés sont issus de la fabrication de surfactants et de revêtements antiadhésifs de type Teflon. Les congénères les plus étudiés chez les humains sont le perfluorooctane sulfonate (PFOS) et l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) [30]. En combinaison avec la force des liens carbone-fluore, la structure de ces produits, semblable à

une chaîne d'acide gras (**Figure 1.1.3**), leur confère une grande stabilité et une forte résistance à la dégradation [31].

Les répercussions d'une exposition à ces produits chez l'humain ne sont pas encore bien comprises, puisque leur dosage dans les matrices biologiques était très difficile jusqu'à tout récemment. Cependant, les concentrations mesurées dans certaines études récentes indiquent une très forte exposition de la population occidentale, comparativement aux autres POP [32, 33]. De plus, une certaine association entre ces composés et les paramètres thyroïdiens semble ressortir dans la littérature [34, 35] (**Section 1.4.4**).



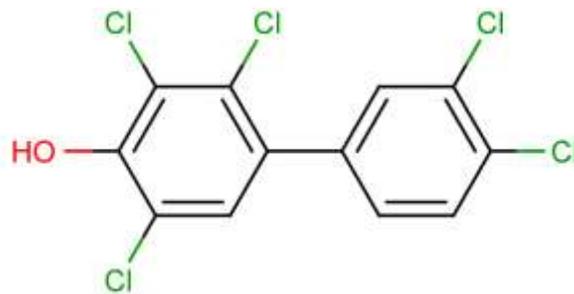
**Figure 1.1.3.** Structure moléculaire du PFOA.

Noter la queue hydrophobe et la tête polaire.

### 1.1.4 Les métabolites hydroxylés des hydrocarbures polyhalogénés

Ce n'est que tout récemment que les métabolites des hydrocarbures polyhalogénés ont commencé à être étudiés. Ceux-ci découlent de la biotransformation de POP « parents » par les différents organismes de la chaîne trophique sous l'action d'enzymes de biotransformation des xénobiotiques. Ces composés, une fois modifiés, acquièrent de nouvelles propriétés chimiques et potentiellement toxiques. En effet, la déshalogénéation partielle et l'ajout de groupement hydroxyle (-OH) sur les noyaux aromatiques permettent aux produits « filles » de mimer l'action de certaines molécules endogènes et ainsi de se lier à différents récepteurs, enzymes ou protéines [36-42]. Selon Kitamura et coll. [43], un groupement -OH en position 3 ou 4 serait nécessaire aux PBDE pour interagir avec les récepteurs œstrogéniques et thyroïdiens. En s'appuyant sur leurs travaux, ils ajoutent aussi que les substitutions adjacentes à ces groupements vont significativement modifier les propriétés hormonales des métabolites, en favorisant la liaison aux récepteurs thyroïdiens

en présence d'atomes de brome, ou aux récepteurs œstrogéniques en leur absence. Différentes voies hormonales peuvent donc être la cible de ces métabolites hydroxylés. Sans compter qu'un même composé parent produit plusieurs métabolites hydroxylés différents, tel le BDE-47 qui, lorsque soumis à l'action de microsomes hépatiques de rats, est transformé en 6 métabolites différents [44]. Il est donc nécessaire de considérer les effets des métabolites hydroxylés dans l'évaluation de l'impact des POP sur la santé, en raison des nouveaux effets physiologiques que ceux-ci peuvent avoir sur le métabolisme.



**Figure 1.1.4.** Structure d'un métabolite hydroxylé, le 4-OH-CB 107 (4-OH-2,3,3',4',5-pentachlorobiphényle).

## 1.2 Transport planétaire des POP et biomagnification dans les chaînes trophiques

Les POP sont des composés ubiquistes en raison de leurs différents modes de dissémination. Ces composés étant relativement volatiles et très hydrophobes, ils se trouvent en équilibre dynamique entre les phases aquatiques, aériennes et organiques (tels les composés carbonés et les lipides) [45, 46]. De cette façon, ils sont transportés par les grands courants marins et aériens, et se condensent dans les environnements nordiques [47-51].

Pourtant, les niveaux globaux de POP retrouvés dans le milieu arctique ne sont pas si élevés : généralement en dessous de 5 ng BPC/g de sol sec, et autour de 58 ng BPC/mL dans la mer de Baffin. Cependant, ils atteignent des niveaux alarmants chez les grands

prédateurs : jusqu'à 28 100 ng BPC/g de lipide en moyenne chez l'ours polaire et jusqu'à 5580 ng BPC/g de poids humide chez le béluga [1]. Ces fortes concentrations retrouvées chez les grands prédateurs sont dues à la bioaccumulation et à la biomagnification des POP tout au long de la chaîne alimentaire.

En effet, les POP sont hautement lipophiles : une fois ingérés par l'organisme, ils se distribuent majoritairement dans les graisses. Et puisque ces contaminants sont difficilement dégradés, ils s'accumulent dans les réserves lipidiques. Or, les graisses sont essentielles à la survie des animaux en région polaire en raison de leurs propriétés thermiques et calorifiques. Par ailleurs, lorsque les ours polaires se nourrissent, ils sont connus pour dévorer préférentiellement les graisses sous-cutanées des phoques plutôt que d'autres types de tissus [52]. De cette manière, les POP contenus dans le gras de phoque sont directement transférés à l'ours polaire par son alimentation et s'accumulent par le fait même dans son organisme. On estime ainsi que la biomagnification fait augmenter d'un facteur 10 les concentrations de BPC à chaque niveau trophique (voir *figure 6.41* dans [1]).

Cependant, l'ingestion d'animaux contaminés n'est pas l'unique source d'exposition aux POP chez les mammifères. Effectivement, ces composés peuvent traverser la barrière placentaire durant la gestation, ceux-ci ayant été mesurés à plusieurs reprises dans le sang du cordon ombilical, les tissus adipeux fœtaux, le placenta et dans le sang des nouveau-nés humains [53-58]. De plus, le transfert se fait plus ou moins facilement selon le niveau de substitution du congénère. Cela a été montré, entre autre, par un essai *ex vivo* sur des placentas : en seulement 4 heures de perfusion, les niveaux de BDE-47 (2, 2', 4, 4'-tétrabromodiphényléther) dans le placenta pouvaient atteindre 47% de la concentration maternelle, alors que les niveaux de BDE-99 (2, 2', 4, 4', 5-pentabromodiphényléther), qui compte un atome de brome de plus, n'étaient que de 25% de la concentration maternelle [59].

La consommation de lait maternel est aussi une voie majeure d'exposition. En effet, sa haute teneur en lipide permet le transfert des POP vers le nourrisson lors de la lactation [60-62]. Selon Espeland et coll. [63] les niveaux de POP observés chez les rejetons, notamment chez le phoque du Groenland (*Phoca groenlandica*) et le phoque à capuchon (*Cystophora cristata*), peuvent égaler les concentrations maternelles après seulement deux semaines

d'allaitement. Il devient donc clair que les organismes habitant les régions nordiques sont hautement contaminés et ce, dès leur plus jeune âge. Au vu de la fragilité des organismes lors du développement, et compte tenu de l'exposition élevée dont ils sont la cible, il importe de faire une revue des effets d'une telle exposition pré- et périnatale sur la santé.

### **1.3 Exposition pré- et périnatale aux contaminants environnementaux et problèmes développementaux**

Il est généralement admis que le développement fœtal est une phase particulièrement sensible dans la vie d'un être vivant. Durant cette période, de petites modifications des messagers chimiques peuvent avoir de très grandes répercussions, souvent irréversibles, sur l'organisme. Puisque les POP sont transférés de la mère au fœtus lors de la grossesse et qu'ils sont réputés pour être des perturbateurs endocriniens, leurs répercussions sur la santé sont potentiellement élevées. Or, quelques événements impliquant des intoxications aux BPC ont permis de déterminer les conséquences d'une exposition aiguë à ces composés durant la grossesse ou en très jeune âge.

Ces incidents ont eu lieu, notamment, au Japon (maladie de Yusho) et à Taïwan (maladie de Yu-Cheng). Les deux cas sont dus à une contamination d'huile de riz par des BPC et des polychlorodibenzofuranes (PCDF). Des études épidémiologiques ont été menées chez les enfants de femmes hautement exposées durant la grossesse. Ces enfants présentaient des troubles neurocomportementaux : comparativement à des témoins, ils avaient un quotient intellectuel inférieur et avaient davantage de problèmes de comportement [64, 65]. De plus, ceux-ci étaient affectés par un retard de croissance intra-utérin et de développement, un poids plus faible à la naissance, des lésions cutanées et une plus forte mortalité infantile [66]. Au fil des années, d'autres études ont révélé des problèmes sur le système reproducteur des garçons issus de ces populations. Parmi les effets remarquables, notons une réduction de la longueur pénienne, une augmentation de la proportion de spermatozoïdes avec morphologie anormale et une diminution de leur motilité et de leur capacité à pénétrer un ovocyte [67].

À partir de ces résultats, d'autres études ont été menées afin de déterminer si des effets sur le développement neurologique sont observables dans les populations ayant une exposition aux POP inférieure à celles touchées par ces incidents. Korrick et coll. [68] recensent onze cohortes étudiant la fonction neuropsychologique de nouveau-nés en relation avec leur exposition aux organochlorés. Brièvement, les contaminants ont été dosés dans plus d'une matrice (sang du cordon, sang maternel, sang de l'enfant, lait maternel ou placenta) pour chacun des participants, puis une série de tests psychométriques et neurologiques ont été menés à plusieurs moments lors du développement de l'enfant. La plupart des études ont pu mettre en évidence une relation négative entre l'exposition prénatale aux organochlorés, particulièrement les BPC, et les mesures reliées à la fonction cognitive. Il semblerait aussi que l'exposition prénatale à ces composés soit plus délétère que l'exposition périnatale : davantage d'études ayant trouvé une association significative entre le développement psychomoteur et l'exposition intra-utérine, qu'avec l'exposition durant l'allaitement.

Outre les BPC eux-mêmes, leurs métabolites hydroxylés semblent aussi en mesure d'altérer le développement neurocognitif lors de la grossesse. En effet, Park et coll. [69] ont analysé le sang de 202 femmes sur le point d'accoucher provenant de l'est de la Slovaquie, ainsi que le sang de 92 nouveau-nés prélevé du cordon ombilical. Une relation négative entre les niveaux de 4-OH-CB 107 mesurés dans le sang du cordon et le score obtenu pour les index de développement mental (MDI; *Mental Development Index*) et de développement psychomoteur (PDI; *Psychomotor Development Index*) s'est avérée significative. Une relation semblable entre les niveaux de 4-OH-CB 107 dans le sang maternel et le score au MDI a aussi été détectée.

Au vu de ces résultats, il importe de déterminer quel est le mode d'action des POP. Kodavanti [70] propose 3 voies par lesquelles ces contaminants organohalogénés pourraient agir : 1) par une perturbation des neurotransmetteurs, telle la dopamine, 2) une modification de la messagerie intracellulaire, notamment via une modification des potentiels calciques et 3) un déséquilibre du système hormonal, particulièrement de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien. Cette troisième option semble la plus probable en raison du rôle joué par les hormones thyroïdiennes lors du développement de l'enfant et de la maturation du cerveau (**Section 1.4.3**). De plus, plusieurs études indiquent que les POP

auraient une forte propension à perturber l'équilibre thyroïdien [34, 71, 72]. Il importe donc de faire une revue du système thyroïdien et des possibles mécanismes d'interférence.

## **1.4 Le système thyroïdien**

### **1.4.1 L'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien**

La glande thyroïde et ses hormones influencent l'organisme en son entier en régulant la température corporelle, la vitesse du métabolisme et son fonctionnement général [73]. De nombreux facteurs vont donc pouvoir modifier son fonctionnement : le climat, le rythme circadien, le rythme circannuel, l'alimentation, etc. Concrètement, c'est l'hypophyse et l'hypothalamus qui moduleront l'activité de la glande thyroïde : on parle de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien.

Tout d'abord, la glande thyroïde se situe dans la partie ventrale du cou, à la hauteur du larynx, et se compose de deux lobes, placés de part et d'autre de la gorge et reliés par un isthme. Irriguée par les artères thyroïdiennes supérieure et inférieure, son débit sanguin est élevé, soit près du double de celui d'un rein; de 4 à 6 mL/min/g par rapport à 3 mL/min/g pour les reins [73].

L'intérieur de la glande thyroïde est formé de nombreux follicules, constituant majeur du volume thyroïdien. Dans la lumière des follicules se trouve un colloïde très riche en thyroglobuline (Tg). Ce polypeptide est le précurseur des hormones thyroïdiennes; c'est un homodimère de 660 kDa. Typiquement, la Tg est constituée de 134 résidus tyrosyl, dont 25 à 30 de ceux-ci seront liés de façon covalente à de l'iode durant le processus de synthèse des hormones thyroïdiennes. L'iode libre étant un élément normalement détecté en faible concentration dans le corps, de grandes quantités doivent être stockées dans la glande thyroïde. Grâce à l'effet concerté de plusieurs pompes ioniques, son accumulation y est possible. D'abord, une pompe  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase crée un gradient sodique du côté capillaire des thyrocytes. Cette différence de concentration sodique va entraîner l'internalisation de l'iode par les thyrocytes, via un symporteur  $\text{Na}^+/\text{I}^-$ . Les ions iodure sont ensuite transférés

dans le colloïde, où ils sont greffés aux résidus tyrosyl de la Tg, sous l'action de la thyropéroxydase (TPO).

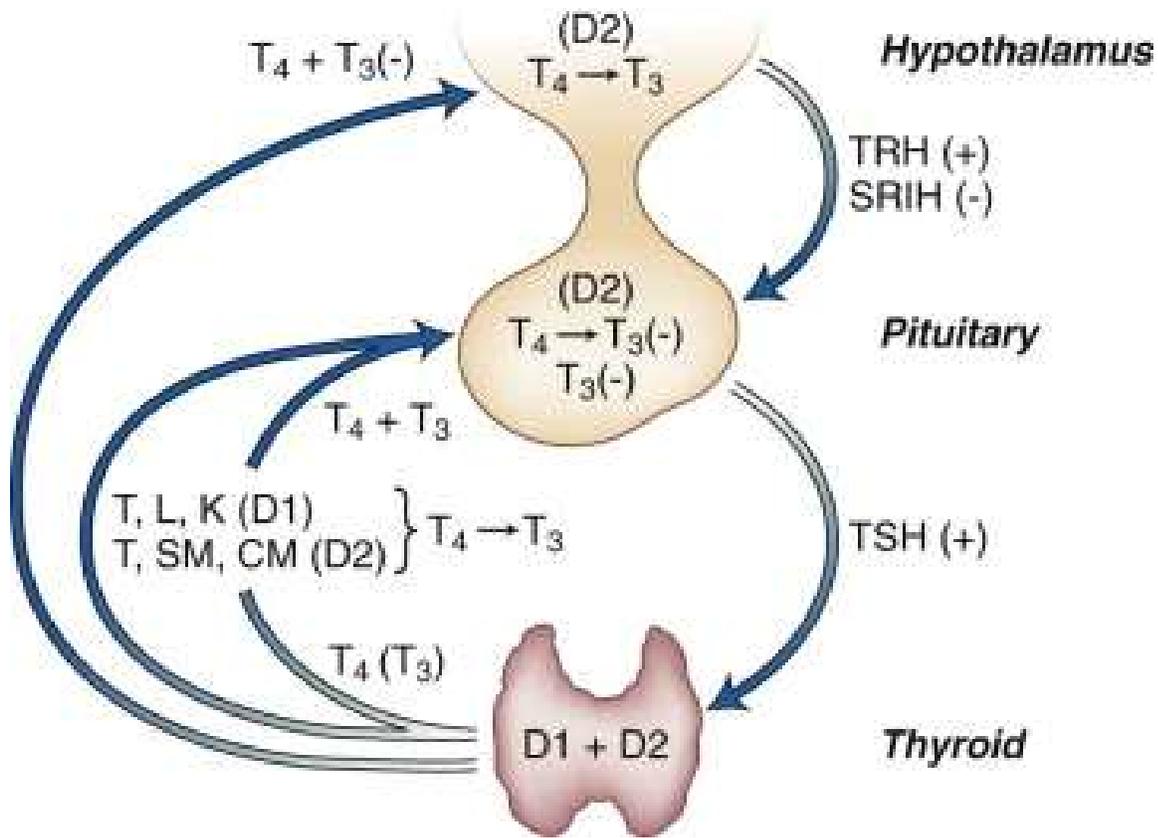
Une fois la Tg iodée, celle-ci est internalisée à l'apex des thyrocytes. Durant son transit dans la cellule vers le côté basal, la Tg subit plusieurs transformations, notamment par clivage enzymatique. Ces modifications mèneront principalement à la formation de thyroxine (T4; 3,3',5,5'-tetraiodothyronine), ainsi qu'une petite quantité de triiodothyronine (T3; 3,3',5-triiodothyronine). Finalement, les deux HT sont sécrétées dans le sang puis distribuées dans tout le corps.

Malgré le fait que ce soit principalement de la T4 qui soit sécrétée par la glande thyroïde, ce n'est pas cette forme qui est la plus active dans l'organisme. En effet, la T4 a une affinité pour les RHT environ 15 fois inférieure à la T3, ce qui fait donc de cette dernière la forme active des HT.

Afin de garder un niveau stable d'HT en circulation, l'axe hypothalamo-hypophysio-thyroïdien est régulé par une boucle de rétroaction négative. L'hypothalamus est le premier jalon de cette chaîne de contrôle. Celui-ci est en mesure de stimuler ou d'inhiber l'activité de l'hypophyse. Par la sécrétion d'hormone thyroïdienne (TRH; *thyrotropin-releasing hormone*), l'hypothalamus incite l'hypophyse à relâcher de la thyrotropine (TSH; *thyroid-stimulating hormone*). Cette dernière favorise l'internalisation de l'iode par la glande thyroïde ainsi que la synthèse des HT. D'un autre côté, la sécrétion de somatostatine (SRIH; *somatotropin release-inhibiting hormone*) par l'hypothalamus va entraîner une diminution du relargage de TSH dans le sang par l'hypophyse et donc, une fonction thyroïdienne diminuée.

Les hormones thyroïdiennes elles-mêmes ont une influence sur l'hypothalamus et l'hypophyse. En effet, par le biais de la désiodase 2 (D2) et des récepteurs aux hormones thyroïdiennes  $\beta$  (TR $\beta$ ; *Thyroid hormone receptor  $\beta$* ), les HT sont en mesure de diminuer la synthèse de TRH par l'hypothalamus et d'empêcher sa sécrétion vers l'hypophyse (**Figure 1.4.1**). De plus, il existe un lien très fort entre les HT et TSH, sécrétée par l'hypophyse. Ainsi, une augmentation des niveaux de T4 ou de T3 sanguins se traduit rapidement en une diminution de TSH sanguin; une relation claire de type logarithme-

linéaire inverse est observée entre le T4 sérique libre et la TSH [74]. Ce faisant, ces deux paramètres se révèlent un excellent indicateur de la fonction thyroïdienne.



**Figure 1.4.1.** Boucle de rétroaction négative de l'axe hypothalamo-hypophyso-thyroïdien. Abréviations : *T*, glande thyroïde; *L*, foie; *K*, rein; *SM*, muscle squelettique; *CM*, muscle cardiaque; *D*, désiodase; *TRH*, hormone thyroïdienne; *SRIH*, somatostatine; *TSH*, thyrotropine. Tiré de *Williams Textbook of Endocrinology* [73].

## 1.4.2 Le transport des hormones thyroïdiennes

Une fois les hormones thyroïdiennes synthétisées par la glande thyroïde et sécrétées dans le sang, celles-ci vont devoir se lier à des protéines de transport afin de se rendre jusqu'aux sites d'action. Tel que modélisé par Mendel et coll. [75], sans protéine de transport, les HT ne pourraient être distribuées de façon efficace dans l'organisme : elles sont trop lipophiles.

Ainsi, les tissus situés près de la glande thyroïde se retrouveraient hautement perfusés par les HT, alors que les tissus en périphérie ne le seraient pratiquement pas. Il existe donc quatre fractions contenant les HT : la fraction libre, et celles liées par la *thyroxin-binding globulin* (TBG), la transthyrétine (TTR) et l'albumine, les principales protéines de transport des hormones thyroïdiennes.

La fraction libre est la plus petite de toutes : seulement 0,02% du T4 total et 0,3% du T3 total n'est pas lié à une ou l'autre des protéines de transport (**Tableau 1.4.1**). On considère cette fraction en équilibre constant avec les quantités d'hormones liées, suivant la loi d'action de masse.

**Tableau 1.4.1.** Concentrations circulantes et demi-vies des hormones thyroïdiennes dans la population caucasienne

Hormone	Total nmol/L	Libre		Demi-vie jours
		pmol/L	%	
T4	64 - 142	9 - 30	0,02	6,7
T3	1,1 - 2,9	3 - 8	0,30	0,75

Valeurs tirées de *Williams Textbook of Endocrinology* [73].

La TBG (54 kDa) est la principale protéine de transport des hormones thyroïdiennes : elle lie près de 75% de la T4 dans le sang, même si c'est la protéine de transport la moins concentrée dans le plasma (0,3  $\mu\text{mol/L}$ ). C'est donc la protéine avec la plus grande affinité à la fois pour T4 et pour T3. Bien que la TBG n'ait pas d'action inhibitrice de protéase, sa structure en fait un membre de la famille des serpinines (SERPIN, *serin protease inhibitor family*), regroupant, par exemple, l' $\alpha$ -antitrypsin et l' $\alpha$ -antichymotrypsin. Quelques études ont mis en évidence la capacité de la TBG à être clivée par l'élastase. En effet, cette dernière amène le clivage d'un segment de 5-6 kDa de la globuline, se traduisant en une diminution de l'affinité de TBG pour les HT. Cette activité est interprétée comme un largage spécifique de la T4 dans certains sites. Cette affirmation est soutenue par la diminution des concentrations de T4 total et de TBG non-clivée observées à proximité de sites d'inflammation [76], ou encore dans le sang de personnes affectées de septicémie [77]. Une activité semblable a aussi été détectée chez les nouveau-nés, chez qui

de fortes quantités d'élastases sont mesurées dans le sang du cordon ombilical immédiatement après la naissance, et où d'importantes quantités de TBG clivées sont détectées [78]. Ainsi, le plus grand réservoir de T4 en circulation dans l'organisme se situe sur la TBG et un largage spécifique des hormones transportées est possible grâce à cette protéine.

La deuxième protéine avec une forte affinité pour la T4 est la TTR, un homotétramère de 55 kDa synthétisé par le foie et les plexus choroïdes. Celle-ci est normalement en mesure de transporter de 10 à 20% de la T4 totale sanguine, bien que sa concentration soit 15 fois plus élevée que la TBG (autour de 4,5  $\mu\text{mol/L}$ ). La TTR transporte la thyroxine et la RBP (*retinol-binding protein*), qui elle-même transporte du rétinol, d'où le nom de transthyrétine (*transport of thyroxine and retinol-binding protein*).

La TTR possède deux sites de liaison pour les HT. Bien que ces deux sites aient une affinité identique pour la T4, il semble y avoir une coopération négative pour la 2e liaison. En effet, quand les sites de la TTR sont tous deux inoccupés, la thyroxine peut se lier à n'importe lequel d'entre eux, mais lorsqu'une molécule de T4 occupe l'un des sites, le deuxième exhibe une affinité moindre. Cette coopérativité négative semble être dépendante du ligand, comme l'ont démontré McCammon et coll. [79]. D'ailleurs, les sites de liaison de la TTR montrent une assez faible sélectivité envers ses ligands. En effet, une grande quantité de composés sont connus pour s'y lier, notamment les composés organohalogénés hydroxylés, tels les OH-BPC et OH-PBDE, et les composés poly- et perfluorés [31, 44, 79-81] (**Section 1.4.4**).

En plus du sang, on trouve la TTR dans le liquide céphalo-rachidien, où elle transporte 80% de la T4 présente dans le cerveau [82]. Pourtant, sa présence dans le cerveau ne semble pas vitale. En effet, chez des souris n'exprimant pas la TTR, les concentrations globales de T4 dans le cerveau étaient inférieures à celles de témoins normaux, mais les souris ne présentaient pas d'anomalies apparentes. La présence de TTR dans ce tissu suggère donc une fonction de réservoir d'hormones thyroïdiennes, plutôt que de transporteur essentiel [83, 84]. Il est à noter, cependant, que la fonction thyroïdienne chez la souris est très différente de l'humain. Effectivement, il n'y a pas de TBG chez ces animaux, et les principales protéines de transport des hormones thyroïdiennes sont la TTR et l'albumine.

De plus, la TTR est d'une grande importance dans le transport des HT de la mère vers le fœtus lors de la grossesse. La TTR est synthétisée dans le placenta dès le début du développement embryonnaire et participe activement au transfert des HT vers l'enfant [85]. La TTR serait ainsi internalisée et transloquée par les trophoblastes, tel qu'indiqué par des essais sur explants de placenta, ou encore sur des cellules de type JEG-3 (lignée cellulaire de chariocarcinome placentaire humain) [86-88]. Bien que la glande thyroïde soit la première glande endocrine formée lors du développement embryonnaire, celle-ci est dans l'incapacité de synthétiser les HT avant 14 à 16 semaines de gestation [73]. Ainsi, le fœtus est complètement tributaire des hormones thyroïdiennes maternelles durant la première moitié de la gestation, bien que la glande thyroïde de la mère soit stimulée par le biais de l'hormone chorionique gonadotrope (hCG) sécrétée par le placenta. Cette hormone, morphologiquement similaire à la TSH, possède une affinité 4000 fois moindre pour les récepteurs de l'hypophyse, mais sa grande concentration plasmatique permet une augmentation de la synthèse d'HT [89]. Jusqu'à la naissance, plus de la moitié des HT en circulation dans le fœtus sont issus de la mère. Une perturbation du transport des HT à ce stade pourrait avoir de grandes répercussions sur le développement du cerveau de l'enfant, puisque celui-ci est hautement dépendant des hormones thyroïdiennes (**Section 1.4.3**).

Pour terminer, la troisième protéine de transport des hormones thyroïdiennes est l'albumine (67 kDa; HSA, *Human serum albumin*). Celle-ci est la plus concentrée des protéines dans le sang : elle représente plus de 50% du contenu protéique, entre 0,5 et 0,8 mmol/L. L'albumine ne transporte pas plus de 10 à 20% du T4 total, même si elle est 150 fois plus abondante que la TTR et 2000 fois plus abondante que la TBG [90]. Cette protéine est donc celle avec la plus faible affinité pour les HT. On croit que l'albumine serait le réservoir de première ligne des HT, tamponnant les fluctuations de la T4 libre circulante, notamment lors du passage dans les capillaires sanguins [91]. Outre cette particularité, son implication dans le transport des HT semble relativement faible, et son rôle exact reste à déterminer [90].

**Tableau 1.4.2.** Tableau comparatif des protéines de transport des hormones thyroïdiennes chez l'humain.

Protéine de transport	Poids moléculaire	Concentration plasmatique	Nb site de liaison	Constante association T4	Constante association T3	Proportion de T4 lié	Proportion de T3 lié
	Da	µmol/L		L/mol	L/mol	%	%
TBG	54000	0,27	1	$1 \times 10^{10}$	$5 \times 10^8$	68	80
TTR	55000	4,6	2	$7 \times 10^7$	$1,4 \times 10^7$	11	9
Albumine	66000	640	*6	$7 \times 10^5$	$1 \times 10^5$	20	11

\*Seulement un site a une affinité élevée pour les HT

Valeurs tirées de *Williams Textbook of Endocrinology* [73] et de Schussler [90].

### **1.4.3 Les hormones thyroïdiennes et l'impact de leurs perturbations sur le développement du cerveau**

Les hormones thyroïdiennes sont d'une importance primordiale pour le développement du cerveau tôt durant la grossesse et jusqu'en période postnatale. Par exemple, les enfants issus d'une mère ayant une hypothyroïdie non traitée ont de fortes chances d'être atteints de crétinisme (retard de développement mental et de croissance), de diplégie spastique (forme de paralysie cérébrale caractérisée par une importante spasticité des membres inférieurs), de surdité-mutisme ou encore de dysarthrie (trouble d'élocution d'origine centrale), qui sont toutes des atteintes neurologiques irréversibles [92, 93]. De la même façon, un enfant en déficit d'HT après la naissance, bien qu'exposé à des concentrations adéquates durant la grossesse, risque de développer les symptômes du crétinisme, bien que réversibles si traités dans les plus brefs délais [73].

Les HT sont impliquées dans le développement et la maturation du cerveau, notamment dans les processus de migration et de survie des cellules granulaires du cervelet et dans l'arborisation dendritique des cellules de Purkinje [94-97]. Ces processus étant très sensibles, des répercussions néfastes chez le rejeton peuvent être observées après un léger déficit en HT. En effet, après l'administration temporaire d'un goitrig ne (1-méthyl-2-mercaptoimidazole) chez des rates en gestation, résultant en une diminution faible et transitoire de T4 sérique chez la mère, ces processus s'en trouvaient compromis dans le cerveau des ratons [98]. Aussi modérées soient-elles, les diminutions des niveaux d'HT dans l'organisme lors du développement sont donc en mesure de modifier de façon permanente la structure du cerveau.

### **1.4.4 Effets des contaminants environnementaux sur le système thyroïdien**

Tel que mentionné auparavant, plusieurs contaminants environnementaux possèdent une structure chimique semblable à celle des HT. Cette similitude structurale leur permettrait de mimer ou de bloquer l'action des HT en se liant aux sites de liaison des protéines de transport et aux RHT. Les mécanismes de régulation, les quantités circulantes d'hormones

et les tissus cibles peuvent tous voir leur équilibre menacé par la présence de POP dans l'organisme.

Plusieurs études épidémiologiques ont tenté de déterminer les modifications qu'une telle exposition peut apporter sur les paramètres thyroïdiens. Langer [99] a fait une revue des études ayant porté sur le sujet. Brièvement, chez l'adulte, les niveaux de T4 total ne semblent pas influencés par ceux des BPC : de nombreuses équipes n'ayant pas observé de corrélation significative entre ces variables [100-105]. Il est à noter que la concentration totale de thyroxine dépend des niveaux de protéines de transport, notamment de la TBG [106, 107]. Ainsi, la concentration totale de T4 ne semble pas être un bon indicateur de l'exposition aux POP.

Par contre, certains paramètres thyroïdiens semblent davantage influencés par l'exposition aux contaminants : une association négative a été détectée entre les concentrations de T3 total et celles de BPC [71, 108-110] et de PBDE [111, 112]. Il en est de même pour la TSH, qui semble elle aussi être associée de façon négative lorsque mise en relation avec les concentrations des BPC [108] et des PBDE [111, 113]. Dans la même optique, Leijts et coll. [112] ont observé que les PBDE étaient négativement reliés à la T4 libre. Quant à eux, Schell et coll. [114] ont détecté une relation positive entre les BPC et la TSH, et une relation négative entre ces mêmes composés et la T4 libre. De plus, Stapleton et coll. [115] ont trouvé une association positive entre la T4 libre et les concentrations de BDE 47 et BDE 153, chez des femmes enceintes durant le 3<sup>e</sup> trimestre de la grossesse (> 34 semaines). Bien que certains résultats soient observés plus souvent que d'autres, il n'existe actuellement aucun consensus concernant les effets des POP sur la fonction thyroïdienne. Ce manque de consistance entre les études pourrait s'expliquer par des différences quantitatives et qualitatives quant à l'exposition des populations à l'étude, par des différences génétiques, nutritionnelles ou des habitudes de vie ou encore par les méthodes statistiques employées par les chercheurs pour étudier les associations.

Certaines études ont considéré les effets d'une exposition à plusieurs POP, dont les BPC, les PBDE et le PFOS, sur la fonction thyroïdienne, tenant ainsi compte de la complexité de l'exposition aux POP de ces populations : c'est l'approche retenue par Dallaire et coll. [34] lors d'une étude chez des adultes appartenant aux communautés inuites du Nunavik (Nord-

du-Québec). Ces derniers ont mis en évidence une relation négative entre T3 total et a) une somme de mono-ortho-BPC ( $\Sigma$ mono-ortho-BPC; BPC 74, 105, 118 et 156), b) une somme de dix OH-BPC ( $\Sigma$ OH-BPC; 3-OH-BPC 138 et 153, 4-OH-BPC 107, 146, 163, 172, 187, 199, 202 et 208), c) une somme de trois méthylsulfonyl-BPC ( $\Sigma$ MeSO<sub>2</sub>-BPC; MeSO<sub>2</sub>-BPC 49, 87 et 101), d) le PFOS et e) le BDE 47. De plus, une relation semblable a été trouvée entre les concentrations de TBG et les mêmes contaminants, à l'exception de  $\Sigma$ MeSO<sub>2</sub>-BPC et BDE 47, c'est-à-dire avec  $\Sigma$ mono-ortho-BPC,  $\Sigma$ OH-BPC et PFOS. Finalement, la TSH était associée négativement avec cinq congénères de BPC (BPC 180, 194, 201, 203, 206), deux congénères OH-BPC (OH-BPC 199 et 208) et le PFOS. Somme toute, les évidences supportent l'existence d'une relation entre la fonction thyroïdienne et l'exposition aux POP. Cependant, les mécanismes inhérents à ces perturbations ne sont toujours pas connus.

Certaines études suggèrent que les POP modifieraient le système thyroïdien par le biais d'une perturbation du transport des hormones thyroïdiennes. Plusieurs équipes ont ainsi tenté d'identifier les contaminants possédant une affinité élevée pour les protéines de transport plasmatique. Les contaminants ayant la plus forte affinité pour la TTR ont, la plupart du temps, un groupement hydroxyle en position 3-, 4- ou 5- sur un des noyaux aromatiques, tel le 3-OH-BDE 47, 4-OH-CB 14, 4-OH-BDE 49 et le 5-OH-BDE 47. Ces composés ont tous une puissance relative – par rapport à la T4 – au-dessus de 3,0 [44, 116]. Une liste des composés liant la TTR se trouve dans le **Tableau 1.4.3**.

Lors d'une étude chez l'ours polaire, Gutleb et coll. [117] ont mis en évidence la capacité des contaminants environnementaux à perturber le transport des hormones thyroïdiennes. Les résultats obtenus par ces chercheurs suggèrent que les sites de liaison de la TTR sont complètement saturés par des contaminants environnementaux, dont l'identité n'a pas été précisée. En effet, du plasma provenant d'ours polaires capturés à Svalbard en Norvège a été incubé avec de la T4 marquée par un isotope d'iode radioactif. Cependant, cette incubation n'a pas permis le marquage radioactif de la TTR plasmatique, alors qu'une incubation de ce même plasma avec un ligand possédant une affinité pour la TTR supérieure à celle de la T4 – le 4-OH-CB 107 marqué au <sup>14</sup>C – a permis le marquage radioactif de la TTR. Puisque les concentrations plasmatiques de POP chez ces ours polaires sont très élevées, et que plusieurs POP ont une forte affinité pour la TTR, les

chercheurs concluent que les sites de liaison de la TTR sont probablement occupés par des POP. Les répercussions de cette saturation des sites de liaison de la T4 sur la TTR chez ces ours sont inconnues, puisqu'il existe bien peu d'information sur les mécanismes de transport des HT chez les ours polaires. Cette étude nous amène toutefois à nous questionner sur l'impact possible d'une telle perturbation du transport de la T4 chez la population inuite, cette dernière étant aussi exposée aux POP présents dans la chaîne alimentaire, bien qu'à des niveaux inférieurs.

**Tableau 1.4.3** Potentiels relatifs de liaison des POP sur la TTR, par rapport à la T4.

<b>Composé</b>	<b>RP (potentiel relatif)</b>	<b>Référence</b>
<i>Composés phénoliques halogénés</i>		
2,4,6-triBP (2,4,6-tribromophénol)	1,2	Meerts [39]
	2	Legler [117]
	0,9	Marchesini [81]
2,4-diBP (2,4-dibromophénol)	0,1	Marchesini [81]
PBP (Pentabromophénol)	7,14	Meerts [39]
	10,2	Hamers [118]
	0,7	Marchesini [81]
PCP (Pentachlorophénol)	1,7	van den Berg [41]
	2,5	den Besten [119]
	0,6	Marchesini [81]
TCBPA (Tétrachlorobisphénol A)	0,76	Meerts [39]
	0,6	Marchesini [81]
<i>Métabolites hydroxylés des PBDE (Diphényléther polybromés)</i>		
2-OH BDE 42	0,93	Montaño [120]
2-OH BDE 66	0,93	Montaño [120]
3-OH BDE 47	0,4	Hamers [44]
	0,8	Marchesini [81]
4-OH BDE 42	4	Hamers [44]
	3,5	Hamers [44]
4-OH BDE 49	3,5	Hamers [44]
	0,2	Marchesini [81]
4-OH BDE 50	2,2	Ucan-Marin [121]
	2,05	Ucan-Marin [122]
4-OH BDE 104	1,22	Meerts [39]
5-OH BDE 47	1,42	Meerts [39]
	3	Hamers [44]
	3	Hamers [44]
	0,4	Marchesini [81]

6-OH BDE 47	0,2	Marchesini [81]
	1,32	Ucan-Marin [121]
	1,32	Ucan-Marin [122]
6-OH BDE 49	0,3	Marchesini [81]
6-OH BDE 99	0,2	Marchesini [81]
<i>Métabolites hydroxylés des BPC (Biphényles polychlorés)</i>		
3-OH CB 61	1,9	Cheek [123]
4-OH CB 14	8,5	Rickenbacher [124]
	3,9	Cheek [123]
	3,04	Marchesini [116]
	1,1	Marchesini [81]
4-OH CB 69	0,6	Marchesini [81]
4-OH CB 72	2,5	Marchesini [81]
4-OH CB 79	0,52	Montaño [120]
4-OH CB 106	0,4	Marchesini [81]
4-OH CB 121	1,6	Cheek [123]
	0,8	Marchesini [81]
4-OH CB 187	1,19	Ucan-Marin [121]
	1,19	Ucan-Marin [122]
<i>Composé poly- et perfluorés</i>		
4-OH FB 208	1,4	Marchesini [81]
PFHxS (Perfluorohexane sulfonate)	0,085	Weiss [31]
PFOA (Perfluorooctanoic acid)	0,064	Weiss [31]
PFOS (Perfluorooctane sulfonate)	0,065	Weiss [31]
TBBPA (Tetrabromobisphenol A)	10,6	Meerts [39]
	2,3	Legler [117]
	1,6	Hamers [118]
	1,06	Marchesini [116]
<i>Autres</i>		
Genestein	0,4	Marchesini [81]

Abréviations : diBP, dibromophénol; triBP, tribromophénol; PBP, pentabromophénol; PCP, pentachlorophénol; PFHxS, perfluorohexane sulfonate; PFOA, *perfluorooctanoic acid*; PFOS, perfluorooctane sulfonate; TBBPA, tétrabromobisphénol A; TCBPA, tétrachlorobisphénol A.

## 1.5 Population à l'étude

### 1.5.1 Population cible

Par leur alimentation traditionnelle et leur situation géographique particulière, les communautés inuites du Nunavik (Nord-du-Québec) sont particulièrement exposées aux contaminants environnementaux [1]. Tel que discuté dans la **section 1.2**, les POP atteignent les régions nordiques par transport atmosphérique et océanique sur de longues distances et sont biomagnifiés dans les espèces composant la chaîne alimentaire marine. Puisque l'alimentation traditionnelle des Inuit comprend des quantités importantes de poissons et de mammifères marins, cette population est fortement exposée à ces composés, ce que confirment les études de biosurveillance réalisées au Nunavik [34, 53].

Tel que mentionné précédemment, Dallaire et coll. [34] ont mis en évidence des associations entre les concentrations circulantes de POP et des changements de paramètres thyroïdiens chez les Inuit du Nunavik (voir **section 1.4.4**). Dans la présente étude, nous portons notre attention sur les femmes inuites en âge de procréer, un groupe à risque en regard de la perturbation de la fonction thyroïdienne, étant donnée l'importance d'un apport adéquat en HT durant le développement fœtal.

### 1.5.2 Devis de l'étude et recrutement

Notre étude se situe en marge de l'*Enquête de santé auprès des Inuits du Nunavik 2004 - Qanuippitaa? How are we?* Les objectifs primaires de cette étude de population étaient de vérifier l'évolution de l'état de santé et des facteurs de risque dans la population inuite du Nunavik. Tel que décrit dans le *Rapport méthodologique* [125], l'enquête s'est déroulée entre le 27 août et le 1<sup>er</sup> octobre 2004 dans les 14 communautés inuites habitant le Nunavik – Kuujjuarapik, Umiujaq, Inukjuak, Puvirnituk, Akulivik, Ivujivik et Salluit situées sur les côtes de la Baie d'Hudson, et Kangiqsujuaq, Quaqtuk, Kangirsuk, Aupaluk, Tasiujaq, Kuujuaq et Kangiqsualujuaq sur les côtes de l'Ungava. Selon le recensement de 2001, il y avait 9 632 personnes vivant dans ces communautés, dont 91% s'identifiaient comme Inuit.

Tous les Inuit vivant dans ces communautés ou y retournant périodiquement étaient inclus dans la population à l'étude. Par contre, ceux qui étaient absents en raison d'une incarcération, d'une internalisation psychiatrique, ou encore qui ne vivait pas de façon permanente dans ces communautés étaient exclus (pour une liste exhaustive des critères d'inclusion et d'exclusion de l'étude de population, voir le rapport méthodologique [125]).

Pour cette étude, l'Institut de la Statistique du Québec (ISQ) a mis au point une méthode d'échantillonnage aléatoire stratifiée divisée en 2 étapes. La première étape visait la sélection des participants. Afin d'augmenter l'efficacité de l'échantillonnage et de s'assurer une plus grande participation de la population cible, cette sélection était basée sur les ménages, plutôt que sur les individus. Les maisons où habitaient des Inuit étaient donc échantillonnées de façon aléatoire dans chacune des communautés. Aussi, dans le but d'obtenir une représentation uniforme de chaque village, le nombre de ménage sélectionné était pondéré par la taille de chacun des villages. Durant la deuxième phase, l'accord des personnes éligibles était demandé, suivant les étapes du protocole de l'étude. Les formulaires de consentement utilisés à cette fin étaient préalablement approuvés par le Comité d'éthique de la recherche de l'Université Laval (CERUL) ainsi que par le Comité d'éthique de santé publique du Québec (CESP). De plus, pour s'assurer que les modalités de l'étude soient bien comprises par les participants, un enregistrement vidéo contenant une description du formulaire de consentement ainsi que des simulations des différentes étapes de l'étude était visionné par les participants. Cet enregistrement était disponible dans les 3 langues parlées au Nunavik : l'anglais, le français et l'inuktitut.

L'acquisition des données s'est fait à l'aide de formulaires, lesquels étaient administrés par des intervieweurs d'origine inuite. Afin d'éviter au maximum les biais de mesures, ces personnes provenaient d'autres villages, limitant par le fait même la probabilité que l'intervieweur connaisse personnellement la personne interviewée. Un total de sept questionnaires était administré aux participants :

- 1) charte d'identification ;
- 2) questionnaire sur le ménage, portant sur les problèmes de santé des habitants de la maisonnée ;

- 3) questionnaire individuel, abordant l'état de santé de la personne interviewée ;
- 4) questionnaire confidentiel, concernant par exemple le bien-être de la personne, la consommation de tabac, drogue et alcool ;
- 5) questionnaire de rappel alimentaire de 24 heures ;
- 6) questionnaire de fréquence alimentaire ;
- 7) questionnaire de visite clinique, concernant l'historique de santé, tels les grossesses, le diabète et l'hypertension artérielle.

Par la suite, tous les individus âgés entre 18 et 74 ans étaient invités à participer à une session clinique, où des échantillons et des données biométriques étaient recueillies. De cette façon, ont été collectés pression sanguine, pouls, température corporelle et mesures anthropométriques (poids, taille, circonférence abdominale, etc.), ainsi que des échantillons sanguins et d'ongles d'orteil. Pour cette session clinique, le taux de participation était de 67,3%. Une description détaillée des procédures est disponible à la section 5 du *Rapport méthodologique* [125].

Les échantillons sanguins utilisés lors de notre étude provenaient de cette session clinique. Nous avons ciblés les femmes âgées entre 18 et 39 ans, ne présentant pas de maladie de la thyroïde, n'étant pas enceinte, ou n'ayant pas consommé de médicaments pouvant altérer la fonction thyroïdienne.

## **1.6 Hypothèses et objectifs**

Notre étude fait suite à celle de Dallaire et coll. [34] et vise donc à approfondir les connaissances sur les répercussions d'une exposition aux POP sur la fonction thyroïdienne, spécifiquement sur le transport plasmatique des hormones thyroïdiennes chez les femmes en âge de procréer du Nunavik. Cette étude a été possible grâce au soutien du *Programme de lutte contre les contaminants dans le Nord*, dirigé par le ministère des *Affaires autochtones et Développement du Nord Canada*; ainsi qu'au soutien matériel et humain de l'*Institut national de santé publique du Québec* (INSPQ).

Notre hypothèse principale est que les contaminants environnementaux réduisent la concentration de thyroxine liée à la transthyréline dans le plasma de femmes inuites en âge de procréer du Nunavik. Afin de vérifier cette hypothèse, nous devons rencontrer ces deux objectifs spécifiques :

1. Mettre au point une méthode de dosage des hormones thyroïdiennes (libres, liées aux protéines de transport et totales), par spectrométrie de masse couplée à la chromatographie en phase liquide.
2. Créer un modèle de régression linéaire multiple, afin d'examiner la variance de la T4 liée à la TTR en relation avec les concentrations plasmatiques des contaminants environnementaux d'intérêt (ceux ayant une affinité élevée pour la TTR), certains paramètres thyroïdiens, ainsi que les caractéristiques des participantes.

## **1.7 Démarche expérimentale**

### **1.7.1 Analyses en laboratoire**

Tout d'abord, afin de quantifier la thyroxine liée à la TTR, nous avons utilisé une combinaison de deux techniques : l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition native (*native-PAGE*) et la spectrométrie de masse en tandem couplée à la chromatographie en phase liquide (LC-MS/MS). Le *native-PAGE* est très semblable au *SDS-PAGE* (*sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis*), à l'exception qu'il n'y a pas de SDS dans le gel ni dans le tampon d'électrophorèse. Il est constitué de deux gels superposés, où le gel inférieur (gel de séparation) a un pH de 6,8 et une concentration de 10%, et où le gel supérieur (gel d'empilement) a un pH de 8,8 et une concentration de 4%. Ces pH, se situant près du pH physiologique, permettent de conserver les propriétés natives des protéines, dont leur capacité de liaison. Tel que démontré par Gutleb et coll. [117], l'utilisation d'un *native-PAGE* permet de conserver les liaisons entre les protéines de transport des hormones thyroïdiennes et leurs ligands. Cependant, la technique de mesure utilisée par cette équipe ne permet pas de quantifier directement la concentration d'HT liée aux protéines de transport. En effet, ceux-ci ajoutent une substance marquée de façon radioactive au plasma

(soit [ $^{125}\text{I}$ ]-T4 ou [ $^{14}\text{C}$ ]-4-OH-CB-107), puis, après une incubation de 24 heures, la radioactivité est mesurée. Techniquement, cette méthode consiste en un essai de compétition. Or, une grande partie de la variation observée dans les essais de compétition est due à la variabilité inter-individu des niveaux de protéines de transport [126, 127].

Dans la présente étude, nous avons excisé du *native-PAGE* la bande contenant la TTR. Puisque les propriétés natives des protéines sont conservées, cette bande contient également la T4 liée à la TTR. Nous avons ensuite incubé la bande dans un tampon permettant l'extraction de la T4. La T4 qui était liée à TTR se retrouvent donc dans le tampon et la TTR demeure dans le gel. Suite à l'ajout d'un analogue de la T4 marqué par un isotope, l'échantillon est finalement analysé par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem (LC-MS/MS) pour quantifier la concentration de l'hormone.

La technique LC-MS/MS offre plusieurs avantages pour la mesure de composés tels que la T4. En effet, elle est hautement spécifique et sensible, en plus d'être peu affectée par les interférences analytiques [128]. De fait, le spectromètre de masse utilisé lors de notre étude est de type « triple quadrupole », offrant une « spectrométrie de masse en tandem ». Brièvement, l'échantillon est d'abord introduit sur une colonne chromatographique contenant une phase solide, qui retient les composés par des interactions chimiques, principalement la charge et la polarité. La composition de la phase mobile est ensuite graduellement modifiée, ce qui permet l'élution des analytes d'intérêt à des temps différents. Chaque composé élué possède un temps de rétention qui lui est propre, lequel varie en fonction des conditions chromatographiques utilisées (température, débit et composition de la phase mobile, colonne, etc.). Une fois les molécules éluées de la colonne chromatographique, celles-ci entrent dans la source du spectromètre de masse, où elles sont ionisées. Elles se dirigent ensuite à l'intérieur du MS, vers le premier quadrupole. Ce premier analyseur a pour but de sélectionner les composés en fonction de leur rapport masse sur charge ( $m/z$ ). Puis, une cellule de collision fractionne les ions parents – ceux qui ont traversé le quadrupole – en ions filles, de plus petite masse. Ces ions filles étant spécifiques aux composés mesurés, le second quadrupole pourra les sélectionner de façon précise, toujours selon leur  $m/z$ . Cette deuxième sélection des ions a pour but de diminuer

drastiquement le bruit de fond normalement observé après le fractionnement des ions. L'analyse des résultats est ainsi basée sur la quantité d'ions filles détectée. De cette manière, les ions filles ayant le rapport  $m/z$  le plus élevé servent à quantifier les composés : elles sont les plus spécifiques aux composés d'intérêt et sont souvent les plus abondantes. Les plus petits ions, quant à eux, sont surtout utilisés pour confirmer l'identité de l'ion parent, via un rapport d'intensité entre les ions. Cette technique d'acquisition est nommée *MRM (multiple reaction monitoring)*. De plus, grâce à la rapidité des composantes électroniques de l'appareil, ce processus peut être fait pour plusieurs ions parents à la fois. Afin de rendre le dosage plus précis, la dilution isotopique est utilisée. Un analogue du composé d'intérêt, marqué par des isotopes (carbone 13, deutérium), est ajouté à l'échantillon au tout début de la procédure analytique. Cet analogue, ayant les mêmes propriétés physico-chimiques que le composé d'origine, possède le même temps de rétention, mais pas le même  $m/z$ . Avec une quantité connue de cet analogue et à l'aide d'une courbe-étalon, on peut alors calculer la concentration de notre composé d'intérêt.

En ce qui concerne la mesure des autres paramètres thyroïdiens, différentes techniques ont été utilisées. Ainsi, les fractions libres de la T3 et de la T4 ont été obtenues grâce à une dialyse à l'équilibre suivie d'une extraction sur phase solide et d'une quantification par LC-MS/MS. Cette méthode, comparativement à un ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*), permet une mesure plus exacte des hormones thyroïdiennes libres [74]. En effet, la relation log-linéaire inverse observée avec le TSH y est significativement meilleure, et l'influence des niveaux de protéines de transport sur les résultats y est inférieure. L'extraction sur phase solide est nécessaire pour purifier l'échantillon, notamment en nettoyant les sels du tampon de dialyse, mais aussi pour concentrer l'échantillon, puisque les HT libres sont en très faibles concentration (**Tableau 1.4.1**).

Pour la mesure des concentrations totales de T3 et T4, une précipitation des protéines a d'abord été effectuée sur les échantillons de plasma. Cette précipitation a permis de retirer les protéines et de diluer les sels normalement retrouvés dans le plasma : ceux-ci pourraient influencer l'ionisation, ayant notamment pour conséquence une suppression du signal lors de l'acquisition. Après centrifugation, le surnageant a été récolté, mélangé à l'analogue de

la T4 marquée au carbone 13, puis analysé par LC-MS/MS, tout comme la T4 liée à la TTR.

La TTR a été mesurée par densitométrie sur gel de polyacrylamide. Puisque la TTR se trouve sous deux formes dans le plasma, liée au RBP ou libre, et que la technique d'extraction de la T4 liée à la TTR permettait de mesurer que la fraction libre, nous avons dû quantifier celle-ci de façon spécifique. Or, l'électrophorèse des protéines sur le gel permettait cette spécificité. Brièvement, la moitié du gel où se trouvait la TTR était fixée dans une solution de méthanol et d'acide acétique, puis le gel était incubé dans une solution de *SyproRuby* (Invitrogen, ON, Canada), qui confère aux protéines une coloration en fluorescence. Après quelques lavages du gel, la TTR était quantifiée grâce à une courbe-étalon située sur le même gel et une lampe aux ultraviolets couplée à une caméra. Les analyses ont été réalisées avec le logiciel Fluorchem 8800 (Version 1.3.2, Alpha Innotech).

En ce qui concerne les contaminants environnementaux, ceux-ci avaient déjà été dosés par le passé, l'étude ayant débuté en 2004. Les détails concernant les techniques utilisées sont disponibles dans le matériel supplémentaire de Dallaire et coll. [34] et les annexes du rapport méthodologique [125].

### **1.7.2 Analyses statistiques**

Puisque le but principal de notre étude est de vérifier si les contaminants environnementaux perturbent le transport des hormones thyroïdiennes, une analyse descriptive de tous les paramètres thyroïdiens a été réalisée. Ensuite, les données ont été analysées à l'aide d'un modèle de régression multiple, dans lequel nous avons inclus les concentrations des POP (variable indépendante principale) et les paramètres thyroïdiens pour lesquels une influence significative sur les niveaux de T4 liée à la TTR a été détectée lors des analyses bivariées préliminaires. De la même manière, certaines variables potentiellement confondantes ont été testées, comme l'âge, la concentration totale des lipides plasmatiques (g/L), la consommation d'alcool (jamais ou annuellement ; mensuellement ; hebdomadaire ou journalier), la consommation de tabac (fumeur ; non-fumeur ou occasionnel) et l'IMC (kg/m<sup>2</sup>) ; qui sont des facteurs connus pour influencer le statut thyroïdien [73]. Toute

variable dont la valeur  $p$  était plus petite que le seuil déterminé ( $p < 0,20$ ) a été conservée pour analyse dans les modèles de régression linéaire. Un modèle a été créé pour chaque classe de POP. La force de l'association et sa direction, ajustées pour les variables confondantes, ont été consignées sous forme de  $\beta$ -ajusté. Toute association dont la valeur  $p$  est inférieure à 0,05 est considérée comme significative. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel *SPSS* (v.18.0.0, *IBM Software*, NY, USA).



# **Chapitre 2 : Persistent Organic Pollutants and Transthyretin-bound Thyroxin in Plasma of Inuit Women of Childbearing Age**

Y. Audet-Delage<sup>1</sup>, R. Dallaire<sup>1</sup>, N. Ouellet<sup>1</sup>, É. Dewailly<sup>1</sup>, P. Ayotte<sup>1 2\*</sup>

<sup>1</sup> Axe santé publique et pratiques optimales en santé, Centre de recherche du CHU de Québec, Québec, Canada;

<sup>2</sup> Laboratoire de Toxicologie, Institut national de santé publique du Québec, Québec, Canada.

\*Corresponding author: e-mail: pierre.ayotte@inspq.qc.ca, phone: 418-650-5115 ext.4654, fax: 418-654-2148

**KEYWORDS:** hydroxylated polychlorinated biphenyls, chlorophenols, perfluorooctane sulfonate, Inuit women, thyroid hormone, transthyretin, thyroxin.

## **Abstract**

The Inuit population of Nunavik (Northern Quebec, Canada) is highly exposed to persistent organic pollutants (POPs) through their traditional diet. Some POPs – i.e. hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls (OH-PCBs), pentachlorophenol (PCP) and perfluorooctane sulfonate (PFOS) - compete with thyroxin (T4) for binding sites on transthyretin (TTR), a T4 transport protein found in plasma and cerebrospinal fluid. Displacement of T4 from TTR could result in decreased T4 delivery to the developing fetus, resulting in delayed growth and impaired neurodevelopment in infants. We tested the hypothesis that POPs or their metabolites decrease circulating concentrations of T4 bound to TTR (T4-TTR) in Inuit women of reproductive age. We measured the concentration of T4-TTR in plasma samples obtained from 120 Inuit women (18-39 years old) by combining

native-PAGE and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) techniques. Total T4, TTR and thyroxin-binding globulin (TBG) concentrations were also assessed, while POPs levels had been previously determined. The mean T4-TTR concentration was 8.4 nmol/L (SD = 2.4) with values ranging from 2.9 to 14.4 nmol/L. Linear regression analysis revealed that TTR, TBG and total T4 concentrations were significant predictors ( $p < 0.002$ ) of T4-TTR levels (total adjusted R-square = 0.27,  $p < 0.0001$ ), but not POPs levels. Our results suggest that circulating levels of POPs in Inuit women of childbearing age are not high enough to affect TTR-mediated thyroid hormone transport.

## Introduction

Persistent organic pollutants (POPs) are ubiquitous chemicals in the environment and in human populations. Being highly lipophilic and resistant to degradation, these compounds are subject to bioaccumulation and biomagnification in fatty tissues of organisms [1]. POPs are transported from industrialized regions by atmospheric and oceanic currents to the Arctic where they are biomagnified, especially in the marine food chain. The Inuit communities from Nunavik (Northern Quebec, Canada) are exposed to relatively high doses of several POPs through their traditional diet that includes fish and marine mammal fatty tissues [34, 55, 129].

POPs such as polychlorinated biphenyls (PCBs), their hydroxylated metabolites (OH-PCBs) and perfluorinated chemicals are known endocrine disrupting chemicals [43, 70, 130, 131]. Previous studies have shown that thyroid hormone metabolism is particularly affected by these chemicals [132-134]. Some POPs are able to bind TTR (transthyretin), a major transporter of thyroid hormones (THs) in blood, cerebrospinal fluid and through placenta during pregnancy [86, 87]. Two other blood proteins can bind THs, namely thyroxin-binding globulin (TBG) and human serum albumin (HSA). Based on mathematical models, TBG, TTR and HSA bind approximately 74%, 11% and 15% of total T4, respectively, while the free fraction represents only 0.02% of total T4 concentration [90]. Certain POPs display an affinity for TTR exceeding that of T4, which suggest that POPs exposure could decrease the amount of T4 bound to this protein [81, 121, 135].

Recently, Gutleb *et al* [117] have shown that binding sites of TTR are completely saturated by POPs in polar bears from Svalbard, Norway, resulting in a displacement of THs from that protein. THs, namely thyroxin (T4) and triiodothyronine (T3), play an essential role in metabolism regulation, by controlling body temperature, cardiac rhythm and seasonality [136]. THs are also of crucial importance in fetal growth and neurodevelopment, regulating brain cell migration and arborisation [94, 96, 97]. The mother being the main source of THs during pregnancy, a compromised transport of THs from the mother to the fetus could result in altered neurodevelopment and brain function [96].

In present study, we investigated the hypothesis that circulating levels of POPs in Inuit women of childbearing age from Nunavik could decrease the concentrations of T4 bound to TTR (T4-TTR). A method to measure T4-TTR was developed using a combination of native polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) and liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). Archived blood from Nunavik women of childbearing age was tested using this method and multivariate linear models were created to explain variations of T4-TTR in relation to POPs concentrations and other thyroid parameters.

## **Materials and methods**

**Population.** Our participants were Inuit women from Nunavik who participated in 2004 to a cross-sectional study on Inuit health entitled *Qanuippitaa? How are we?*. Information about this study is available in Rochette and Blanchet [125]. Inclusion criteria for our study were being of Inuit origin and being aged between 18 and 39 years. Exclusion criteria were being pregnant at the time of recruitment and using medication for thyroid diseases. From those who were eligible, 120 women were randomly selected. Blood samples from these women were collected during a clinical session. Tubes were centrifuged within 3 hours of collection and plasma was isolated, aliquoted and stored at -80°C until analysis. In addition, several self-administered and interviewer completed questionnaires were used to obtain information regarding demographics, lifestyle habits, and nutrition.

**Chemicals, proteins, and reagents.** T4 (3,3',5,5'-tetraiodothyronine) and T3 (3,3',5-triiodothyronine) were purchased from Sigma Canada (Oakville, Canada). Isotopically labeled hormones [<sup>13</sup>C]-T4 and [<sup>13</sup>C]-T3 were purchased from Toronto Research Chemicals (Toronto, Canada). 4-OH-CB 107 (4-hydroxy-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl) was synthesized by the Organic Synthesis Service (*Centre de recherche du CHU de Québec*, Québec City, Canada). TTR protein standard was obtained from Biodesign (Meridian Life Science, Memphis, TN, USA).

**POPs analysis.** Concentrations of POPs in plasma samples of participants were previously reported [34]. Analyses were performed by the *Centre de toxicologie du Québec* (Québec City, Canada). Briefly, OH-PCBs and chlorophenols were quantified according to a multiresidue gas chromatography/mass spectrometry (GC-MS) method, and perfluorooctane sulfonate (PFOS) was measured by LC-MS/MS [125].

**Total T4 and total T3.** We measured total THs concentrations in plasma samples following a protein precipitation-isotope dilution-LC-MS/MS method. To a 10- $\mu$ L plasma aliquot was added 252.5  $\mu$ L of 0.1% formic acid in acetonitrile and 37.5  $\mu$ L of a 5 ppb solution of isotopically labeled [<sup>13</sup>C]-T4 and [<sup>13</sup>C]-T3 in 50% acetonitrile, 20 mmol/L ammonium acetate (NH<sub>4</sub>C<sub>2</sub>H<sub>3</sub>O<sub>2</sub>). The sample was then vortexed thoroughly and centrifuged at 21 000 xg during 5 minutes. A 50- $\mu$ L aliquot of the supernatant was collected, diluted with 50  $\mu$ L of 0.1% formic acid in deionised (DI) water and stored in a LC-MS vial at 4°C until analysis by LC-MS/MS. A XEVO TQ-S electrospray ionization-triple quadrupole mass spectrometer coupled with an Acquity UPLC unit (UPLC-ESI-MS/MS, Waters, Manchester, UK) was used for TH quantification. A 10- $\mu$ L aliquot of the sample was injected into an Acquity UPLC HSS T3 column, 100 Å, 2.1 X 50 mm, 1.8  $\mu$ m. The flow rate was set to 0.3 mL/min and the column temperature to 30°C. Initial conditions were 70% mobile phase A (0.1% formic acid in DI-water) and 30% mobile phase B (0.1% formic acid in acetonitrile). The gradient went from 30% phase B to 70% within 2 minutes, followed by a wash of 15 seconds at 100% phase B and a return to initial conditions. THs were monitored by MRM (multiple reaction monitoring). Selected transitions [M+H]<sup>+</sup> were 778.032  $\rightarrow$  731.920 and 778.032  $\rightarrow$  351.082 for T4, and 652.032  $\rightarrow$  606.010, 652.032  $\rightarrow$  225.080 and 652.032  $\rightarrow$  197.190 for T3. Selected transitions [M+H]<sup>+</sup> for

isotopically-labeled THs were 783.968 → 737.922 and 783.968 → 356.986 for [<sup>13</sup>C]-T4, and 658.100 → 485.050 m/z for [<sup>13</sup>C]-T3. Standard curve ranged from 5 ppb to 10 ppt for T4 and T3, and its R-square was above 0.99, as determined by TargetLynx (Version 4.1, Waters, UK). To assess between-day variations, an internal standard – a plasma sample from an individual aliquoted prior to the beginning of the study – was added in each batch (N = 20); coefficients of variation (CV) for total T4 and total T3 measurements were 11.4% and 21.2%, respectively.

**T4-TTR.** We developed a method combining native-polyacrylamide gel electrophoresis (native-PAGE) and LC-MS/MS to quantify the concentration of T4 bound to plasma transport proteins. To achieve T4-TTR measurements, plasma samples and standards were stored on ice and mixed with a sample buffer containing stacking gel buffer (Tris buffer, pH 6.8, 0.5 mol/L), bromophenol blue and 20% glycerol. Samples were then loaded on 2 different gels, each containing a stacking gel at pH 6.8 and a resolving gel at pH 8.8. Electrophoresis buffer contained 25 mmol/L Tris and 192 mmol/L glycine, without SDS. The first gel was used to measure the amount of T4 bound to TTR, and the second one to assess TTR concentration. Migration conditions were 150 V for 2 hours 20 minutes, at 4°C in a Protean II cell (Bio-Rad, Mississauga, On, Canada). Once the electrophoresis completed, gels were placed on ice and a reference lane was cut from the first gel and stained in a Coomassie Brilliant Blue solution for 10 minutes. It was subsequently unstained in a 10% acetic acid/10% methanol solution for 10 minutes to remove excess dye. Using the reference lane to determine TTR location, TTR bands were cut from the gel in 1-mm wide segments using Gel Cutting Tips 6.5 mm x 1 mm (Gel Company, CA, USA). The segments were then incubated in a 50% acetonitrile, 20 mmol/L ammonium acetate solution for 30 minutes at 37°C. Supernatants were separated from gel segments and mixed thoroughly with 10 µL of a THs standard solution at 5 ppb. Samples were stored in LC-MS vials at 4°C until analysis by LC-MS/MS. To assess between-day variations, the internal standard was included in each batch (N = 26); CV for T4-TTR analysis was 19.7%.

In the second gel, a 3 point standard curve of TTR, ranging from 0.1 to 0.5 mg/mL, was used to determine TTR concentration in each lane by spot densitometry. The lower half of the gel was fixed with a 50% methanol, 7% acetic acid solution and then stained overnight

with SyproRuby (Invitrogen, ON, Canada). The gel was subsequently unstained for 2 hours in a 10% methanol, 7% acetic acid solution. Finally, protein concentration in each spot was assessed using its fluorescence intensity at 590 nm, using Fluorchem 8800 software (Version 1.3.2, Alpha Innotech). The between-day CV for TTR (N = 26) was 11.9%.

In preliminary assays, this technique combination was used to measure the amount of T4 present in 1 mm gel segments covering the entire gel lane (see **Figure 2.1**). To achieve a greater sensitivity, segments were paired for T4 extraction. Summing T4 amounts in all segments from the gel lane, the amount of total T4 was similar to that measured in the same plasma sample following protein precipitation. TBG and HSA could not be separated from each other due to their similar migration distance in native gels. However, the TTR peak was well resolved and clearly separated from HSA and TBG peaks.

Moreover, a competition assay was conducted by adding 4-OH-CB 107 to plasma samples, which is a strong TTR ligand [135], in order to test the capacity of our native-PAGE-LC-MS/MS technique to detect T4 displacement from TTR binding sites. Briefly, 50  $\mu$ L from four different human plasma samples were incubated during 24 hours at 37°C with 5  $\mu$ L of a 154.5  $\mu$ mol/L 4-OH-CB 107 solution in 25% acetonitrile (final concentration of 4-OH-CB 107: 14.1  $\mu$ mol/L). Plasma samples were also incubated in the same conditions, either untreated or following the addition of 5  $\mu$ L of 25% acetonitrile (vehicle; final concentration of 2.3% acetonitrile). Concentrations of T4 bound to TTR were determined using the method described above, and results were reported relative to concentrations of T4-TTR measured in control (untreated samples). Incubation of plasma samples with 4-OH-CB 107 reduced the concentration of T4 bound to TTR by 20-fold (**Figure 2.2**), indicating that our method could be used to detect T4 displacement from TTR by POPs.

**Free T4 and free T3 concentrations.** We determined concentrations of free THs by an equilibrium dialysis-solid phase extraction-LC-MS/MS method (ED-SPE-LC-MS/MS). ED was conducted in 96-wells dialysis plates (Harvard Apparatus, MA, USA) at 37°C for 24 hours against an HEPES buffer. Dialysates were then removed from the plate and mixed with methanol and phosphoric acid ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ , 4% v/v) to ensure sample stability. At this point, samples were stored at -30°C until analysis, which occurred in less than 2 months. On the day of quantification, dialysates were brought to room temperature and mixed with

internal standards [ $^{13}\text{C}$ ]-T4 and [ $^{13}\text{C}$ ]-T3. Then, samples were concentrated and purified on a SPE column (SiliaPrepX SCX, Silicycle, Qc, Canada), as well as a THs standard curve, ranging from 1 ppt to 100 ppt for T3, and from 2 ppt to 100 ppt for T4. Briefly, extraction cartridges were washed with high-grade methanol and phosphoric acid. Samples were then placed on the cartridge and washed with DI water and methanol. Purified THs were then eluted from the cartridge with a 95% methanol/5% ammonium hydroxide ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) solution. Eluates were evaporated to dryness using a Turbovap® evaporator (Zymark, USA) at 35°C, reconstituted in a solution of 60% methanol/40% DI water with 0.1% formic acid and analysed by LC-MS/MS. The LC method was slightly different from that used for total THs. Samples were loaded on the same column as previous analyses, but the flow rate was set to 0.5 ml/min. Initial conditions were 60% mobile phase A (0.1% formic acid in DI water) and 40% mobile phase B (0.1% formic acid in methanol). During the first 2 minutes, mobile phase B followed a gradient from 40% to 75% and reached 100% at 2.5 minutes. The column was then equilibrated with initial conditions. Selected transitions for quantification were 777.649  $\rightarrow$  731.700 and 777.649  $\rightarrow$  604.758 for T4, 651.841  $\rightarrow$  605.700 and 651.841  $\rightarrow$  478.846 for T3, 783.586  $\rightarrow$  737.633 and 783.586  $\rightarrow$  356.961 for [ $^{13}\text{C}$ ]-T4, as well as 657.900  $\rightarrow$  611.840 and 657.900  $\rightarrow$  484.900 m/z for [ $^{13}\text{C}$ ]-T3. Standard curve's R-square was above 0.99, accepting a 15% deviation for each point of the curve, as determined by TargetLynx (Version 4.1, Waters, UK). The internal standard's CV (N = 9) for free T4 was of 12.7% and of 33% for free T3.

**TBG and TSH.** Concentrations of TSH and TBG were previously measured using radioimmunoassays, as described by Dallaire *et al* [34]. TSH was measured on the Elecsys 1010/2010 analyzers and the Modular Analytics E170 immunoassay module (Roche Diagnostics), and TBG using the Clinical Assays GammaDab system commercialized by DiaSorin (Stillwater, MN, USA). The inter assay CVs were 2.0% for TSH and 3.6% for TBG.

**Statistical analysis.** The selection of relevant contaminants to be tested in statistical models was based on their known affinity for TTR and previous results from Dallaire *et al* [34]. Missing values resulting from analytical problems were imputed using a predictive linear regression equation for a strongly correlated POP ( $R > 0.95$ ). Concentrations of

contaminants below the LOD were assigned a value equal to LOD/2. POP concentrations were log-transformed to satisfy the normality criteria.

Associations between plasma contaminant levels and concentrations of T4-TTR were tested using multiple linear regression models. A different model was created for each class of compounds. Physiologically relevant thyroid parameters (total T4, TBG, TTR) and total plasma lipids were correlated to T4-TTR levels ( $p < 0.20$ ) and were entered as covariates in the full models. Other factors considered in model are presented in **Table 2.1**. We considered bilateral  $p$ -value  $< 0.05$  as statistically significant. Statistical analyses were performed with SPSS (Version 18.0, IBM software, NY, USA).

## Results and Discussion

Selected participants characteristics are presented in **Table 2.1**. A majority of these Inuit women of childbearing age were smokers (81.6%) and only 17.5% had a college or university level education. Thyroid parameters measured in our population sample are presented in **Table 2.2**. Most of thyroid parameters were within expected ranges, except for levels of TBG and total T4. In our participants, the mean concentration of TBG was 0.46  $\mu\text{mol/L}$ , whereas according to Melmed *et al* [73], the normal range in Caucasian populations is 0.18-0.35  $\mu\text{mol/L}$ . The mean total T4 concentration was 140.0 nmol/L, which is at the upper bound of the typical range (64-142 nmol/L). The mean concentration of T4-TTR in our participants was 8.4 nmol/L (range 2.9 – 14.4 nmol/L), representing on average 6% of total T4 concentration in plasma.

Plasma concentrations of environmental contaminants are presented in **Table 2.3** on a wet weight basis (ng/L). For statistical analyses, compounds were grouped according to their molecular structure. Three categories of contaminants were created: OH-PCBs, chlorophenols and PFOS. 4-OH-PCB 107 showed the highest concentration of all OH-PCBs (geometric mean: 109.2 ng/L, range:  $< \text{LOD}$ -840 ng/L), while the mean PCP concentration was greater than that of other chlorophenols (geometric mean: 804.37 ng/L, range: 150-9300 ng/L). Among all contaminants, PFOS exhibited the highest concentration in that population (geometric mean: 10924 ng/L, range 2300-97000 ng/L).

In order to assess perturbations of T4-TTR by environmental contaminants, we constructed multiple linear regression models and included contaminant concentrations as independent variables and thyroid parameters as covariates. One model was created for each category of environmental contaminants. None of these POPs were significant predictors of T4-TTR levels. The model for OH-PCBs is presented in **Table 2.4**. This model explained 26% of the variance of T4-TTR concentrations (multiple R-square = 0.27,  $p < 0.0001$ ). OH-PCBs levels were not associated with T4-TTR concentrations (standardized beta = -0.081;  $p = 0.318$ ). Total T4 ( $p < 0.0001$ ), TTR ( $p = 0.002$ ) and TBG ( $p < 0.0001$ ) concentrations were all significantly associated with TTR-bound T4 concentrations. Similar models were obtained for chlorophenols and PFOS as independent variables (data available in **Supplemental Material**).

In this study, we used a novel method combining native-PAGE and LC-MS/MS to measure circulating T4-TTR concentrations in Inuit women of reproductive age. To our knowledge, this has never been achieved before without the use of radioactive isotopes. According to our multiple linear regression models, no significant association was found between plasma OH-PCBs levels and T4-TTR concentrations. Similarly, chlorophenols and PFOS were not significant predictors of T4 bound to TTR. Our results suggest that concentrations of environmental contaminants in Inuit women of reproductive age are not high enough to compete with T4 for TTR binding sites.

Using a different methodology, Gutleb *et al* [117] reported that TTR binding sites were completely saturated by environmental contaminants in polar bears from Svalbard, Norway. However, POPs levels in plasma samples from these animals were about 100-fold higher than those in Inuit women from Nunavik. For example, mean concentrations of 4-OH-PCB 107 were of 13.6 ng/mL in polar bears and 0.109 ng/mL in Inuit women. Similar differences are present for concentrations of other OH-PCBs, indicating that polar bears are more exposed to strong TTR binders than our participants.

TTR-bound T4 in our population represented about 6% of total T4 concentration, a value lower than those estimated for the general population (10%-20%) using equations in which inhibition constants ( $K_i$ ) of transport proteins, proteins concentrations and free fraction of THs are imputed [90, 137]. One explanation for this discrepancy is that the affinity of TTR

binding sites for T4 could be different in Inuit people compared to other populations. We also observed that TBG and total T4 concentrations were elevated in our participants compared to reference values, suggesting a slightly different set point for thyroid system compared to other populations. Genetic, lifestyle or environmental factors in the Inuit population could explain the differences in thyroid parameters with Caucasian populations.

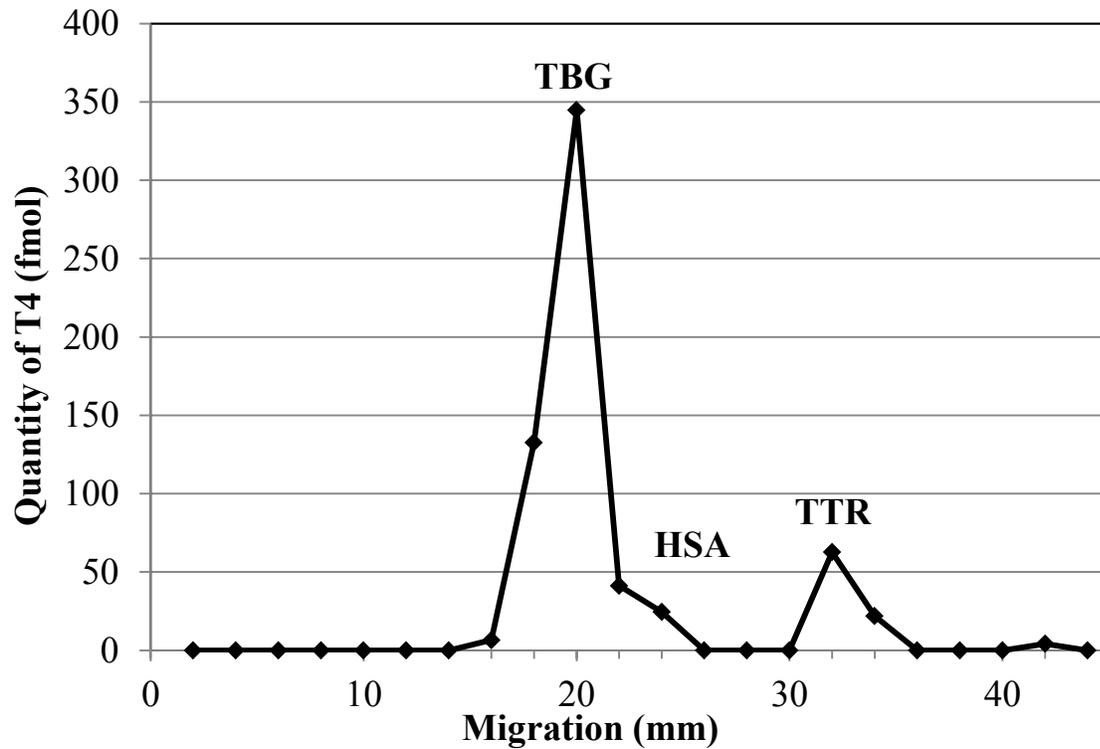
Our multiple linear regression models also showed that total T4, TTR and TBG levels were significant predictors for T4-TTR levels. Total T4 and TTR were positively associated with T4-TTR (standardized-beta of 0.565 and 0.263, respectively), while TBG levels were negatively associated with the dependent variable (standardized-beta of -0.525). Those results are coherent with theoretical models: higher concentrations of total T4 and TTR are likely to increase the concentration of T4-TTR, while higher TBG concentrations would compete with TTR for T4 binding, resulting in decreased levels of T4-TTR.

Even though circulating environmental contaminants do not appear high enough to displace T4 from TTR binding sites, these compounds could still interfere with brain development. Binding of OH-PCBs to plasma TTR increases their transplacental transfer and in turn foetal exposure [135, 138]. Epidemiological studies on children prenatally exposed to PCBs and their metabolites showed impaired neurodevelopment and thyroid status [69, 139]. OH-PCBs can induce both hypothyroidic and hyperthyroidic-like effects on thyroid hormone receptors (TR) [42, 123, 140-142]. Thus, the thyroid hormone system can be affected by OH-PCBs and other POPs through different mechanisms.

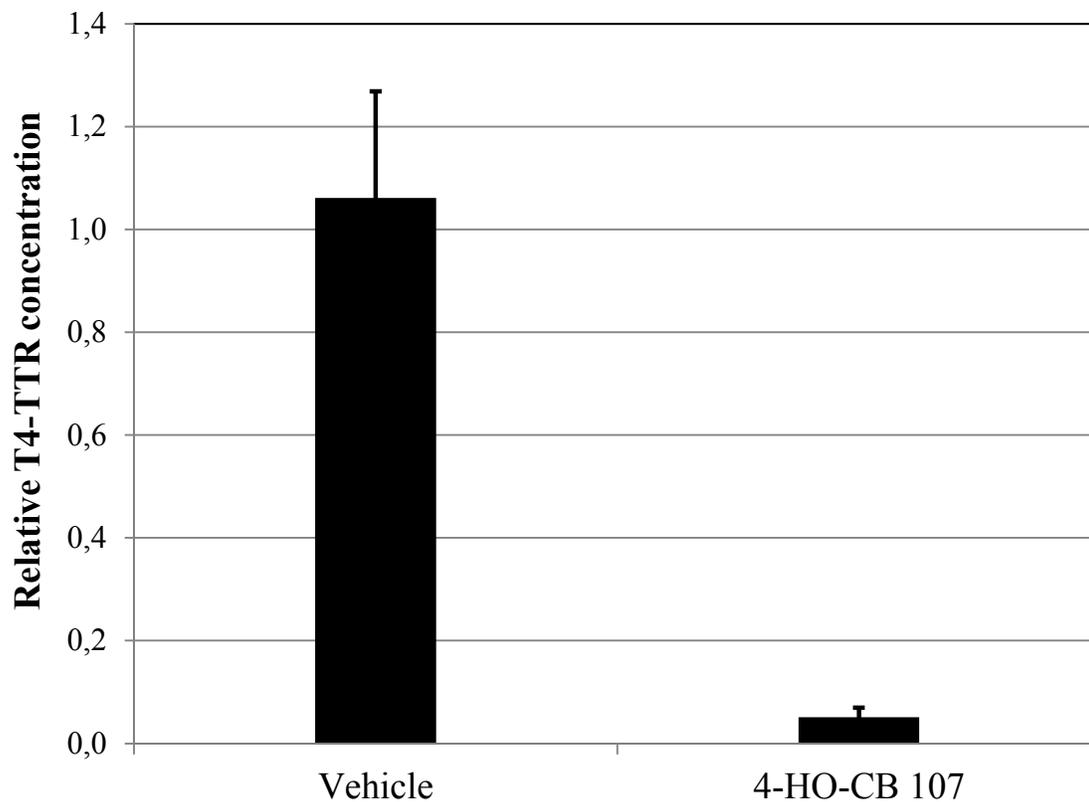
The principal strength of this study is the innovative method used for quantification of protein-bound hormones. To our knowledge, quantification of hormones bound to transport proteins without the use of radioactive isotopes has never been achieved before. It is also worth mentioning that our models permit a better understanding of the thyroid function in Inuit people. However, as POPs quantitation was made prior to the actual study, some compounds – now thought to interfere with T4 binding to TTR – were not quantified, such as 3-OH-PBDEs, 4-OH-PBDEs and some polyphenols (genistein and resveratrol, for example). Also, one limitation of this study is that we could not measure levels of T4 bound to other transport proteins, which could have been relevant in T4-TTR binding models.

In conclusion, we were able to directly quantify protein-bound thyroid hormones using a novel method which combines native-PAGE and LC-MS/MS. Using this method, we found no significant association between OH-PCBs, chlorophenols or PFOS levels and T4-TTR concentrations in Inuit women from Nunavik. Our method could be applied to assess thyroid status of other communities exposed to different POPs mixtures. Also, empirically acquired reference values for T4-TTR concentrations in both Caucasian and Inuit people could be useful in future study on thyroid status assessment.

## Figures



**Figure 2.1.** Distribution of T4 among plasma transport proteins determined by a combination of native-PAGE and LC-MS/MS. Sum of T4 on gel: 638.8 fmol. Total T4 in the same volume of plasma: 637.8 fmol. Abbreviations: TBG, thyroxin-binding globulin; HSA, human serum albumin; TTR, transthyretin.



**Figure 2.2.** Competition assay resulting in displacement of T4 from TTR in human plasma by 4-OH-CB 107. T4-TTR levels were measured using a combination of native-PAGE and LC-MS/MS techniques. T4-TTR concentration for each sample is expressed as the ratio over the level measured in the corresponding untreated plasma. N = 4. Mean  $\pm$  SE.

## Tables

**Table 2.1.** Characteristics of Inuit women of childbearing age.

Characteristic	n	(%)	Mean $\pm$ SD	Range
Age	120		28.1 $\pm$ 6.5	18 - 39
BMI (kg/m <sup>2</sup> )	118		27.4 $\pm$ 6.1	17 - 47
Smoking status				
Yes	93	81.6		
No or occasionally	21	18.4		
Alcohol consumption				
Never or yearly	41	37.0		
Monthly	33	29.7		
Weekly or Daily	37	33.3		
Total marine food consumption (g/day) *	109		69.8 $\pm$ 77.1	0 - 378
Education				
Elementary school	5	4.4		
High school	89	78.1		
College/University	20	17.5		

\*Reported annually

**Table 2.2.** Thyroid parameters of 120 Inuit women of reproductive age.

<b>Parameter</b>	<b>Mean <math>\pm</math> SD</b>	<b>Range</b>	<b>Reference range*</b>
TSH (mIU/L)	1.05 $\pm$ 0.60	0.13 - 3.35	0.4 - 4.2
Free T4 (pmol/L)	16.6 $\pm$ 3.4	10.5 - 27.6	9 - 30
Total T4 (nmol/L)	140 $\pm$ 23	92 - 214	64 - 142
T4-TTR (nmol/L)	8.4 $\pm$ 2.4	2.9 - 14.4	10 – 20 <sup>#</sup>
Free T3 (pmol/L)	5.2 $\pm$ 1.4	1.9 - 8.2	3 – 8
Total T3 (nmol/L)	2.3 $\pm$ 0.6	1.0 - 4.0	1.1 – 2.9
TTR ( $\mu$ mol/L)	5.5 $\pm$ 1.4	2.6 - 8.9	3.6 – 7.3
TBG ( $\mu$ mol/L)	0.46 $\pm$ 0.13	0.24 - 1.04	0.18 – 0.35

\* As described in Melmed *et al* 2011 [73]

<sup>#</sup> Based on theoretical models [90]

Abbreviations: TSH, thyroid-stimulating hormone; T4, thyroxine; T3 triiodothyronine; TTR, transthyretin; TBG, thyroxine-binding globulin.

**Table 2.3.** Plasma concentrations of organohalogen contaminants (ng/L) in 120 Inuit women of reproductive age.

Analyte	Percent detected	Geometric mean	95% CI	Range
OH-PCBs				
3-OH-PCB 138	81.7 <sup>a</sup>	11.31	8.75 – 14.61	< LOD - 440
3-OH-PCB 153	94.2 <sup>a</sup>	14.29	11.60 – 17.60	< LOD - 440
4-OH-PCB 107	99.2 <sup>b</sup>	109.20	94.08 – 126.75	< LOD - 840
4-OH-PCB 146	100 <sup>a</sup>	69.96	60.40 – 81.04	7.8 - 420
4-OH-PCB 163	83.3 <sup>a</sup>	4.97	4.19 – 5.89	< LOD - 56
4-OH-PCB 172	90.0 <sup>a</sup>	7.91	6.55 – 9.53	< LOD - 67
4-OH-PCB 187	99.2 <sup>a</sup>	75.93	64.34 – 89.62	< LOD - 490
4-OH-PCB 199	87.5 <sup>a</sup>	6.70	5.53 – 8.11	< LOD - 62
4-OH-PCB 202	75.0 <sup>a</sup>	3.48	2.94 – 4.12	< LOD - 33
4-OH-PCB 208	48.3 <sup>a</sup>	2.07	1.76 – 2.43	< LOD - 37
Chlorophenols				
PCP	100 <sup>b</sup>	804.37	707.8 – 914.18	150 - 9300
2,3,4,6-TeCP	83.3 <sup>b</sup>	21.24	17.78 – 25.39	< LOD - 710
4-OH-HpCS	100 <sup>c</sup>	54.83	46.98 – 63.99	2 - 460
PFOS	100 <sup>d</sup>	10924	9842 - 12125	2300 - 97000

Abbreviations: PCB, polychlorinated biphenyls; PCP, pentachlorophenol; TeCP, tetrachlorophenol; HpCS, heptachlorostyrene.

<sup>a</sup> LOD = 2 ng/L

<sup>b</sup> LOD = 10 ng/L

<sup>c</sup> LOD = 1 ng/L

<sup>d</sup> LOD = 100 ng/L

**Table 2.4.** Multiple linear regression model<sup>a</sup> of plasma TTR-bound T4 levels in 120 Inuit women of reproductive age.

Variables	Beta	Standard error	Standardized Beta	<i>p</i> -value
Sum of OH-PCBs (nmol/L) <sup>b,c</sup>	-0.553	0.551	-0.081	0.318
Total T4 (nmoles/L)	0.058	0.010	0.565	< 0.0001
TTR (μmol/L)	8.145	2.572	0.263	0.002
TBG (μmol/L)	-0.179	0.035	-0.525	< 0.0001
Plasma lipids (g/L) <sup>c</sup>	1.568	1.017	0.132	0.126

Abbreviations: OH-PCBs: hydroxylated polychlorinated biphenyls; TBG: thyroxin-binding globulin; TTR: transthyretin.

<sup>a</sup> Multiple R-square: 0.27, *p* < 0.0001, N = 120.

<sup>b</sup> Sum of 3-OH PCB 138, 3-OH PCB 153, 4-OH PCB 107, 4-OH PCB 146, 4-OH PCB 163, 4-OH PCB 172, 4-OH PCB 187, 4-OH PCB 199, 4-OH PCB 202 and 4-OH PCB 208.

<sup>c</sup> Log transformed variables.

## **Author Contributions**

YAD develop analytical methods for TH quantitation (total, free and TTR-bound), performed the statistical analysis, interpreted the data, and drafted the manuscript. PA conceived the study design, participated to the statistical analysis, helped draft the manuscript and revised the manuscript critically. NO participated to the analytical method development and revised the manuscript. RD contributed to the study design, participated to the statistical analysis of the data and revised the manuscript critically. ED contributed to the study design and revised the manuscript critically. All authors have given approval to the final version of the manuscript.

## **Funding Sources**

This project was funded by Aboriginal Affairs and Northern Development Canada (Northern Contaminants Program). The financial support of FRQS Environmental Health Research Network is also acknowledged. The 2004 Nunavik Health Survey - *Qanuippitaa? How are we?* – was funded by the Québec Health and Social Services Ministry, the Nunavik Regional Board of Health and Social Services, the Network of Centers of Excellence of Canada (ArcticNet), the Canadian Foundation for Innovation and the FRQS.

## **Acknowledgment**

We acknowledge the collaboration of Gilles Provencher and Éric Daigle from the Laboratoire de Toxicologie at INSPQ for the development of analytical methods for TH quantitation. The authors declare they have no competing financial interests.

## **Abbreviations**

CV, coefficient of variation; ED, equilibrium dialysis; HSA, human serum albumin; LC-MS/MS, liquid chromatography-tandem mass spectrometry; LOD, limit of detection; MRM, multiple reaction monitoring; PCP, pentachlorophenol; PFOS, perfluorooctane

sulfonate; POP, persistent organic pollutant; SPE, solid phase extraction; T3, triiodothyronine; T4, thyroxine; T4-TTR, transthyretin-bound thyroxine; TH, thyroid hormone; TBG, thyroxine-binding globulin; TTR, transthyretin.

## Supplemental Material

**Table S1.** Multiple linear regression model<sup>a</sup> of plasma TTR-bound T4 levels in 120 Inuit women of reproductive age (sum of chlorophenols as the exposure variable)

Variables	Beta	Standard error	Standardized Beta	<i>p</i> -value
Sum of chlorophenols (nmol/L) <sup>b,c</sup>	0.541	0.676	0.065	0.426
Total T4 (nmoles/L)	0.058	0.010	0.565	< 0.0001
TTR (μmol/L)	8.145	2.572	0.263	0.002
TBG (μmol/L)	-0.179	0.035	-0.525	< 0.0001
Plasma lipids (g/L) <sup>b</sup>	1.568	1.017	0.132	0.126

Abbreviations: TBG: thyroxin-binding globulin; TTR: transthyretin.

<sup>a</sup> Multiple R-square: 0.27, *p* < 0.0001, N = 120.

<sup>b</sup> Sum of pentachlorophenol; 2,3,4,6-tetrachlorophenol and 4-OH-heptachlorostyrene.

<sup>c</sup> Log transformed variables.

**Table S2.** Multiple linear regression model<sup>a</sup> of plasma TTR-bound T4 levels in 120 Inuit women of reproductive age (PFOS as the exposure variable)

Variables	Beta	Standard error	Standardized Beta	<i>p</i> -value
PFOS (nmol/L) <sup>b</sup>	0.506	0.779	0.052	0.518
Total T4 (nmoles/L)	0.058	0.010	0.565	< 0.0001
TTR (μmol/L)	8.145	2.572	0.263	0.002
TBG (μmol/L)	-0.179	0.035	-0.525	< 0.0001
Plasma lipids (g/L) <sup>c</sup>	1.568	1.017	0.132	0.126

Abbreviations: PFOS: perfluorooctane sulfonate; TBG: thyroxin-binding globulin; TTR: transthyretin.

<sup>a</sup> Multiple R-square: 0.27, *p* < 0.0001, N = 120.

<sup>b</sup> Log transformed variables.

## Chapitre 3 : Conclusion

L'objectif principal de cette étude était de vérifier si les contaminants environnementaux trouvés dans le plasma de femmes Inuit en âge de procréer provenant du Nunavik perturbaient l'équilibre des HT liées aux protéines de transport. Pour y arriver, une méthode alliant l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide en phase native et la spectrométrie de masse en tandem a été mise au point. À l'aide de celle-ci, nous avons pu mesurer les concentrations de T4 liée à la TTR, cette protéine de transport pouvant lier une panoplie de composés chimiques, dont les POP. De plus, plusieurs autres paramètres thyroïdiens susceptibles d'influencer les concentrations d'HT liées aux protéines de transport ont été mesurés. De cette façon, ont été quantifiés T3 total, T3 libre, T4 total, T4 libre, TTR et TBG. Finalement, pour tester l'hypothèse de recherche, des modèles de régression linéaire multiple ont été créés, ayant pour but d'expliquer la variance de la concentration de T4 liée à la TTR en relation avec d'autres paramètres thyroïdiens et les niveaux de contaminants environnementaux.

Les analyses de régression linéaire multivariée ont révélé que les concentrations de T4 total, TTR et TBG sont toutes significativement associées à la concentration de T4 liée à la TTR. Ces trois paramètres ensemble permettent d'expliquer 27% de cette variance. Cependant, aucune association n'a été notée entre les concentrations plasmatiques des contaminants environnementaux et la concentration de T4 liée à la TTR. Ces résultats indiquent donc que les concentrations des contaminants environnementaux ne sont pas suffisamment élevées chez les femmes Inuit pour perturber le transport de la T4 par la TTR. Les concentrations de plusieurs contaminants ayant une forte affinité pour TTR ont été mesurées chez nos participantes, mais les concentrations présentes étaient beaucoup plus faibles (facteur de 100) par rapport à celles observées chez des ours polaire provenant de Svalbard, Norvège; chez qui cette exposition aux POP entraînait la saturation des sites de liaison de la TTR [117].

Malgré que nous n'ayons pas détecté d'association entre les contaminants environnementaux et le transport des hormones thyroïdiennes chez ces femmes inuites, il

est important de poursuivre les investigations quant à l'impact possible de ces composés sur leur fonction thyroïdienne. En effet, des études antérieures ayant mis en évidence une altération de la fonction thyroïdienne par les contaminants environnementaux dans cette population, d'autres études doivent être menées afin de déterminer les causes de ces perturbations. Il importe également de faire un suivi temporel de l'exposition de ces populations aux POP classiques et d'être à l'affût de l'apparition de nouveaux composés dans la chaîne alimentaire aquatique, dans le but de diminuer de façon précoce les sources d'émission, par le biais de conventions internationales, et d'éviter des conséquences néfastes sur la santé humaine.

De plus, grâce aux méthodes que nous avons développées durant ce projet, une meilleure connaissance de la fonction thyroïdienne est possible. En effet, aucune étude n'avait réussi à mesurer directement les concentrations d'HT liées aux protéines de transport sans recourir à l'utilisation d'isotopes radioactifs. Utilisant ces méthodes, une actualisation des valeurs de références d'HT liées aux protéines de transport pour les différentes populations serait possible et souhaitable. Ces nouvelles mesures permettraient d'obtenir un portrait plus complet de la fonction thyroïdienne, notamment chez la femme enceinte. Ces informations supplémentaires permettraient à coup sûr de mieux comprendre les mécanismes responsables des perturbations du système thyroïdien, dont les répercussions sur la santé sont potentiellement immenses.

## Bibliographie

1. AMAP, *AMAP Assessment Report: Arctic Pollution Issues* 1998, Oslo, Norway: Arctic Monitoring and Assessment Programme (AMAP). xii+859.
2. Korach, K.S., et al., *Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes*. *Mol Pharmacol*, 1988. **33**(1): p. 120-6.
3. Schwetz, R.E.M.a.B.A., *Reproductive and developmental toxicity in animals*, in *Halogenated biphenyls, terphenyls, naphthalenes, dibenzodioxins and related products*, R.D.K.a.S. Jensen, Editor 1989, Elsevier Science Publishers B.V.: New York. p. 199-225.
4. Smialowicz, R.J., et al., *Evaluation of the immunotoxicity of low level PCB exposure in the rat*. *Toxicology*, 1989. **56**(2): p. 197-211.
5. Tryphonas, H., *Immunotoxicity of PCBs (Aroclors) in relation to Great Lakes*. *Environ Health Perspect*, 1995. **103 Suppl 9**: p. 35-46.
6. Loose, L.D., et al., *Impaired host resistance to endotoxin and malaria in polychlorinated biphenyl- and hexachlorobenzene-treated mice*. *Infect Immun*, 1978. **20**(1): p. 30-5.
7. Thomas, P.T. and R.D. Hinsdill, *Effect of polychlorinated biphenyls on the immune responses of rhesus monkeys and mice*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1978. **44**(1): p. 41-51.
8. Institute, N.C., *Bioassay of aroclor for possible carcinogenicity*. *Natl Cancer Inst Carcinog Tech Rep Ser*, 1978. **38**: p. 1-62.
9. Morgan, R.W., J.M. Ward, and P.E. Hartman, *Aroclor 1254-induced intestinal metaplasia and adenocarcinoma in the glandular stomach of F344 rats*. *Cancer Res*, 1981. **41**(12 Pt 1): p. 5052-9.
10. Ward, J.M., *Proliferative lesions of the glandular stomach and liver in F344 rats fed diets containing Aroclor 1254*. *Environ Health Perspect*, 1985. **60**: p. 89-95.
11. Brunner, M., et al., *An assessment of the chronic toxicity and oncogenicity of Aroclor-1016, Aroclor-1242, Aroclor-1254, and Aroclor-1260 administered in diet to rats: Chronic toxicity and oncogenicity report, Vol 1*, 1997: Columbus, OH.
12. Bertazzi, P.A., et al., *Cancer mortality of capacitor manufacturing workers*. *Am J Ind Med*, 1987. **11**(2): p. 165-76.
13. Brown, D.P., *Mortality of workers exposed to polychlorinated biphenyls--an update*. *Arch Environ Health*, 1987. **42**(6): p. 333-9.
14. Sinks, T., et al., *Mortality among workers exposed to polychlorinated biphenyls*. *Am J Epidemiol*, 1992. **136**(4): p. 389-98.
15. Schecter, A., et al., *Dioxins: an overview*. *Environ Res*, 2006. **101**(3): p. 419-28.
16. Peters, H.A., et al., *Epidemiology of hexachlorobenzene-induced porphyria in Turkey: clinical and laboratory follow-up after 25 years*. *Arch Neurol*, 1982. **39**(12): p. 744-9.
17. Turusov, V., V. Rakitsky, and L. Tomatis, *Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks*. *Environ Health Perspect*, 2002. **110**(2): p. 125-8.
18. Longnecker, M.P., W.J. Rogan, and G. Lucier, *The human health effects of DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane) and PCBs (polychlorinated biphenyls) and an overview of organochlorines in public health*. *Annu Rev Public Health*, 1997. **18**: p. 211-44.

19. Alaei, M., et al., *An overview of commercially used brominated flame retardants, their applications, their use patterns in different countries/regions and possible modes of release*. Environ Int, 2003. **29**(6): p. 683-9.
20. Hooper, K. and T.A. McDonald, *The PBDEs: an emerging environmental challenge and another reason for breast-milk monitoring programs*. Environ Health Perspect, 2000. **108**(5): p. 387-92.
21. Lindstrom, G., et al., *Identification of the flame retardants polybrominated diphenyl ethers in adipose tissue from patients with non-Hodgkin's lymphoma in Sweden*. Oncol Rep, 1997. **4**(5): p. 999-1000.
22. Sjobin, A., et al., *Flame retardant exposure: polybrominated diphenyl ethers in blood from Swedish workers*. Environ Health Perspect, 1999. **107**(8): p. 643-8.
23. Meironyte, D., K. Noren, and A. Bergman, *Analysis of polybrominated diphenyl ethers in Swedish human milk. A time-related trend study, 1972-1997*. J Toxicol Environ Health A, 1999. **58**(6): p. 329-41.
24. Sjobin, A., D.G. Patterson, Jr., and A. Bergman, *Brominated flame retardants in serum from U.S. blood donors*. Environ Sci Technol, 2001. **35**(19): p. 3830-3.
25. Crimmins, B.S., et al., *Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): turning the corner in Great Lakes trout 1980-2009*. Environ Sci Technol, 2012. **46**(18): p. 9890-7.
26. Liu, X., et al., *The PBDE-209 exposure during pregnancy and lactation impairs immune function in rats*. Mediators Inflamm, 2012. **2012**: p. 692467.
27. Ernest, S.R., et al., *Effects of chronic exposure to an environmentally relevant mixture of brominated flame retardants on the reproductive and thyroid system in adult male rats*. Toxicol Sci, 2012. **127**(2): p. 496-507.
28. Talsness, C.E., et al., *In utero and lactational exposures to low doses of polybrominated diphenyl ether-47 alter the reproductive system and thyroid gland of female rat offspring*. Environ Health Perspect, 2008. **116**(3): p. 308-14.
29. Costa, L.G. and G. Giordano, *Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants*. Neurotoxicology, 2007. **28**(6): p. 1047-67.
30. Lindstrom, A.B., M.J. Strynar, and E.L. Libelo, *Polyfluorinated compounds: past, present, and future*. Environ Sci Technol, 2011. **45**(19): p. 7954-61.
31. Weiss, J.M., et al., *Competitive binding of poly- and perfluorinated compounds to the thyroid hormone transport protein transthyretin*. Toxicol Sci, 2009. **109**(2): p. 206-16.
32. Calafat, A.M., et al., *Serum concentrations of 11 polyfluoroalkyl compounds in the u.s. population: data from the national health and nutrition examination survey (NHANES)*. Environ Sci Technol, 2007. **41**(7): p. 2237-42.
33. Kannan, K., et al., *Perfluorooctanesulfonate and related fluorochemicals in human blood from several countries*. Environ Sci Technol, 2004. **38**(17): p. 4489-95.
34. Dallaire, R., et al., *Thyroid function and plasma concentrations of polyhalogenated compounds in Inuit adults*. Environ Health Perspect, 2009. **117**(9): p. 1380-6.
35. Lopez-Espinosa, M.J., et al., *Thyroid function and perfluoroalkyl acids in children living near a chemical plant*. Environ Health Perspect, 2012. **120**(7): p. 1036-41.
36. Li, F., et al., *Hormone activity of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers on human thyroid receptor-beta: in vitro and in silico investigations*. Environ Health Perspect, 2010. **118**(5): p. 602-6.

37. Kato, Y., et al., *Induction of hepatic microsomal drug-metabolizing enzymes by methylsulphonyl metabolites of polychlorinated biphenyl congeners in rats*. Chem Biol Interact, 1995. **95**(3): p. 257-68.
38. Kimura-Kuroda, J., I. Nagata, and Y. Kuroda, *Hydroxylated metabolites of polychlorinated biphenyls inhibit thyroid-hormone-dependent extension of cerebellar Purkinje cell dendrites*. Brain Res Dev Brain Res, 2005. **154**(2): p. 259-63.
39. Meerts, I.A., et al., *Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in vitro*. Toxicol Sci, 2000. **56**(1): p. 95-104.
40. Schuur, A.G., et al., *In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of halogenated aromatic hydrocarbons*. Chem Res Toxicol, 1998. **11**(9): p. 1075-81.
41. van den Berg, K.J., *Interaction of chlorinated phenols with thyroxine binding sites of human transthyretin, albumin and thyroid binding globulin*. Chem Biol Interact, 1990. **76**(1): p. 63-75.
42. You, S.H., et al., *4-Hydroxy-PCB106 acts as a direct thyroid hormone receptor agonist in rat GH3 cells*. Mol Cell Endocrinol, 2006. **257-258**: p. 26-34.
43. Kitamura, S., et al., *Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture*. Toxicology, 2005. **208**(3): p. 377-87.
44. Hamers, T., et al., *Biotransformation of brominated flame retardants into potentially endocrine-disrupting metabolites, with special attention to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47)*. Mol Nutr Food Res, 2008. **52**(2): p. 284-98.
45. Mackay, D. and S. Paterson, *Calculating fugacity*. Environ Sci Technol, 1981. **15**(9): p. 1006-14.
46. Mackay, D. and S. Paterson, *Fugacity revisited*. Environ Sci Technol, 1982. **16**(12): p. 654A-60A.
47. Barrie, L.A., et al., *ARCTIC CONTAMINANTS - SOURCES, OCCURRENCE AND PATHWAYS*. Science of the Total Environment, 1992. **122**(1-2): p. 1-74.
48. Iversen, T., *SOME STATISTICAL PROPERTIES OF GROUND-LEVEL AIR-POLLUTION AT NORWEGIAN ARCTIC STATIONS AND THEIR RELATION TO LARGE-SCALE ATMOSPHERIC FLOW SYSTEMS*. Atmospheric Environment, 1989. **23**(11): p. 2451-2462.
49. Iversen, T., *NUMERICAL MODELING OF THE LONG-RANGE ATMOSPHERIC TRANSPORT OF SULFUR-DIOXIDE AND PARTICULATE SULFATE TO THE ARCTIC*. Atmospheric Environment, 1989. **23**(11): p. 2571-2595.
50. Iversen, T., *Atmospheric transport pathways for the Arctic*, in *Chemical exchange between the atmosphere and polar snow*. Global Environmental Change, E.B. Wolff, R.C., Editor 1996, NATO ASI: Germany. p. 71-92.
51. Roots, E.F., *The changing Arctic marine environment: Some basic considerations*, in *The Arctic Ocean. The hydrographical environment and the fate of pollutants.*, L. Rey, Editor 1982, Comite Arctique International: Macmillan Press, London.
52. Stirling, I. and E.H. McEwan, *CALORIC VALUE OF WHOLE RINGED SEALS (PHOCA-HISPIDA) IN RELATION TO POLAR BEAR (URSUS-MARITIMUS) ECOLOGY AND HUNTING BEHAVIOR*. Canadian Journal of Zoology-Revue Canadienne De Zoologie, 1975. **53**(8): p. 1021-1027.

53. Dallaire, F., et al., *Time trends of persistent organic pollutants and heavy metals in umbilical cord blood of Inuit infants born in Nunavik (Quebec, Canada) between 1994 and 2001*. Environ Health Perspect, 2003. **111**(13): p. 1660-4.
54. Jacobson, J.L., et al., *Determinants of polychlorinated biphenyls (PCBs), polybrominated biphenyls (PBBs), and dichlorodiphenyl trichloroethane (DDT) levels in the sera of young children*. Am J Public Health, 1989. **79**(10): p. 1401-4.
55. Muckle, G., et al., *Prenatal exposure of the northern Quebec Inuit infants to environmental contaminants*. Environ Health Perspect, 2001. **109**(12): p. 1291-9.
56. Wang, S.L., et al., *Infant exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls (PCDD/Fs, PCBs)--correlation between prenatal and postnatal exposure*. Chemosphere, 2004. **54**(10): p. 1459-73.
57. Suzuki, G., M. Nakano, and S. Nakano, *Distribution of PCDDs/PCDFs and Co-PCBs in human maternal blood, cord blood, placenta, milk, and adipose tissue: dioxins showing high toxic equivalency factor accumulate in the placenta*. Biosci Biotechnol Biochem, 2005. **69**(10): p. 1836-47.
58. Lanting, C.I., et al., *Polychlorinated biphenyls in adipose tissue, liver, and brain from nine stillborns of varying gestational ages*. Pediatr Res, 1998. **44**(2): p. 222-5.
59. Frederiksen, M., et al., *Placental transfer of the polybrominated diphenyl ethers BDE-47, BDE-99 and BDE-209 in a human placenta perfusion system: an experimental study*. Environ Health, 2010. **9**: p. 32.
60. Dewailly, E., et al., *High levels of PCBs in breast milk of Inuit women from arctic Quebec*. Bull Environ Contam Toxicol, 1989. **43**(5): p. 641-6.
61. Grandjean, P., et al., *Relation of a seafood diet to mercury, selenium, arsenic, and polychlorinated biphenyl and other organochlorine concentrations in human milk*. Environ Res, 1995. **71**(1): p. 29-38.
62. Rogan, W.J., et al., *Polychlorinated biphenyls (PCBs) and dichlorodiphenyl dichloroethene (DDE) in human milk: effects of maternal factors and previous lactation*. Am J Public Health, 1986. **76**(2): p. 172-7.
63. Espeland, O., et al., *Organochlorines in mother and pup pairs in two Arctic seal species: Harp seal (Phoca groenlandica) and hooded seal (Cystophora cristata)*. Marine Environmental Research, 1997. **44**(3): p. 315-330.
64. Chen, Y.C., et al., *Cognitive development of Yu-Cheng ("oil disease") children prenatally exposed to heat-degraded PCBs*. JAMA, 1992. **268**(22): p. 3213-8.
65. Chen, Y.C., et al., *A 6-year follow-up of behavior and activity disorders in the Taiwan Yu-cheng children*. Am J Public Health, 1994. **84**(3): p. 415-21.
66. Hsu, S.T., et al., *Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four-year followup*. Environ Health Perspect, 1985. **59**: p. 5-10.
67. Guo, Y.L., et al., *Yucheng: health effects of prenatal exposure to polychlorinated biphenyls and dibenzofurans*. Int Arch Occup Environ Health, 2004. **77**(3): p. 153-8.
68. Korrick, S.A. and S.K. Sagiv, *Polychlorinated biphenyls, organochlorine pesticides and neurodevelopment*. Curr Opin Pediatr, 2008. **20**(2): p. 198-204.
69. Park, H.Y., et al., *Exposure to hydroxylated polychlorinated biphenyls (OH-PCBs) in the prenatal period and subsequent neurodevelopment in eastern Slovakia*. Environ Health Perspect, 2009. **117**(10): p. 1600-6.
70. Kodavanti, P.R., *Neurotoxicity of persistent organic pollutants: possible mode(s) of action and further considerations*. Dose Response, 2005. **3**(3): p. 273-305.

71. Abdelouahab, N., et al., *Gender differences in the effects of organochlorines, mercury, and lead on thyroid hormone levels in lakeside communities of Quebec (Canada)*. Environ Res, 2008. **107**(3): p. 380-92.
72. Hagmar, L., *Polychlorinated biphenyls and thyroid status in humans: a review*. Thyroid, 2003. **13**(11): p. 1021-8.
73. Melmed, S., et al., *Williams textbook of endocrinology* 2011, Philadelphia, PA, USA: Saunders Elsevier. 1897.
74. van Deventer, H.E., et al., *Inverse log-linear relationship between thyroid-stimulating hormone and free thyroxine measured by direct analog immunoassay and tandem mass spectrometry*. Clin Chem, 2011. **57**(1): p. 122-7.
75. Mendel, C.M., et al., *Thyroid hormone-binding proteins in plasma facilitate uniform distribution of thyroxine within tissues: a perfused rat liver study*. Endocrinology, 1987. **120**(5): p. 1742-9.
76. Janssen, O.E., et al., *Characterization of T(4)-binding globulin cleaved by human leukocyte elastase*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(3): p. 1217-22.
77. Jirasakuldech, B., et al., *A characteristic serpin cleavage product of thyroxine-binding globulin appears in sepsis sera*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(11): p. 3996-9.
78. Khan, N.S., et al., *Thyroxine-binding globulin cleavage in cord blood*. J Clin Endocrinol Metab, 2002. **87**(7): p. 3321-3.
79. McCammon, M.G., et al., *Screening transthyretin amyloid fibril inhibitors: characterization of novel multiprotein, multiligand complexes by mass spectrometry*. Structure, 2002. **10**(6): p. 851-63.
80. Kolstoe, S.E., et al., *Trapping of palindromic ligands within native transthyretin prevents amyloid formation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(47): p. 20483-8.
81. Marchesini, G.R., et al., *Biosensor discovery of thyroxine transport disrupting chemicals*. Toxicol Appl Pharmacol, 2008. **232**(1): p. 150-60.
82. Fleming, C.E., A.F. Nunes, and M.M. Sousa, *Transthyretin: more than meets the eye*. Prog Neurobiol, 2009. **89**(3): p. 266-76.
83. Palha, J.A., et al., *Transthyretin is not essential for thyroxine to reach the brain and other tissues in transthyretin-null mice*. Am J Physiol, 1997. **272**(3 Pt 1): p. E485-93.
84. Palha, J.A., et al., *Transthyretin regulates thyroid hormone levels in the choroid plexus, but not in the brain parenchyma: study in a transthyretin-null mouse model*. Endocrinology, 2000. **141**(9): p. 3267-72.
85. Patel, J., et al., *Ontogenic changes in placental transthyretin*. Placenta, 2011. **32**(11): p. 817-22.
86. Mortimer, R.H., et al., *Secretion and transfer of the thyroid hormone binding protein transthyretin by human placenta*. Placenta, 2012. **33**(4): p. 252-6.
87. Patel, J., et al., *Expression and uptake of the thyroxine-binding protein transthyretin is regulated by oxygen in primary trophoblast placental cells*. J Endocrinol, 2012. **212**(2): p. 159-67.
88. Patel, J., et al., *Oxygen concentration regulates expression and uptake of transthyretin, a thyroxine binding protein, in JEG-3 choriocarcinoma cells*. Placenta, 2011. **32**(2): p. 128-33.
89. Parkes, I.L., J.G. Schenker, and Y. Shufaro, *Thyroid disorders during pregnancy*. Gynecol Endocrinol, 2012. **28**(12): p. 993-8.

90. Schussler, G.C., *The thyroxine-binding proteins*. *Thyroid*, 2000. **10**(2): p. 141-9.
91. Robbins, J., *Thyroid hormone transport proteins and the physiology of hormone binding*, in *Werner & Ingbar's The Thyroid : a fundamental and clinical text*, L.B.R. Utiger, Editor 1996, Lippincott-Raven: Philadelphia. p. 96-110.
92. Fierro-Benitez, R., et al., *The clinical pattern of cretinism as seen in highland Ecuador*. *Am J Clin Nutr*, 1974. **27**(5): p. 531-43.
93. DeLong, G.R., J.B. Stanbury, and R. Fierro-Benitez, *Neurological signs in congenital iodine-deficiency disorder (endemic cretinism)*. *Dev Med Child Neurol*, 1985. **27**(3): p. 317-24.
94. Koibuchi, N., et al., *Current perspectives on the role of thyroid hormone in growth and development of cerebellum*. *Cerebellum*, 2003. **2**(4): p. 279-89.
95. Lopez-Juarez, A., et al., *Thyroid hormone signaling acts as a neurogenic switch by repressing Sox2 in the adult neural stem cell niche*. *Cell Stem Cell*, 2012. **10**(5): p. 531-43.
96. Bernal, J., *Thyroid hormone receptors in brain development and function*. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab*, 2007. **3**(3): p. 249-59.
97. Leonard, J.L., *Non-genomic actions of thyroid hormone in brain development*. *Steroids*, 2008. **73**(9-10): p. 1008-12.
98. Utiger, R.D., *Maternal hypothyroidism and fetal development*. *N Engl J Med*, 1999. **341**(8): p. 601-2.
99. Langer, P., *The impacts of organochlorines and other persistent pollutants on thyroid and metabolic health*. *Front Neuroendocrinol*, 2010. **31**(4): p. 497-518.
100. Calvert, G.M., et al., *Evaluation of diabetes mellitus, serum glucose, and thyroid function among United States workers exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. *Occup Environ Med*, 1999. **56**(4): p. 270-6.
101. Langer, P., et al., *Increased thyroid volume and prevalence of thyroid disorders in an area heavily polluted by polychlorinated biphenyls*. *Eur J Endocrinol*, 1998. **139**(4): p. 402-9.
102. Mazhitova, Z., et al., *Chlorinated contaminants, growth and thyroid function in schoolchildren from the Aral Sea region in Kazakhstan*. *Acta Paediatr*, 1998. **87**(9): p. 991-5.
103. Todaka, T., et al., *Concentrations of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-ortho and mono-ortho polychlorinated biphenyls in blood of Yusho patients*. *Chemosphere*, 2007. **66**(10): p. 1983-9.
104. Triebig, G., et al., *Effects of dioxins and furans on liver enzymes, lipid parameters, and thyroid hormones in former thermal metal recycling workers*. *Environ Health Perspect*, 1998. **106 Suppl 2**: p. 697-700.
105. Tsuji, H. and Y. Ito, *[Thyroid function in patients with Yusho]*. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 2003. **94**(5): p. 103-7.
106. Baloch, Z., et al., *Laboratory medicine practice guidelines. Laboratory support for the diagnosis and monitoring of thyroid disease*. *Thyroid*, 2003. **13**(1): p. 3-126.
107. DeVito, M., et al., *Screening methods for thyroid hormone disruptors*. *Environ Health Perspect*, 1999. **107**(5): p. 407-15.
108. Turyk, M.E., et al., *Associations of organochlorines with endogenous hormones in male Great Lakes fish consumers and nonconsumers*. *Environ Res*, 2006. **102**(3): p. 299-307.

109. Hagmar, L., et al., *Plasma concentrations of persistent organochlorines in relation to thyrotropin and thyroid hormone levels in women*. *Int Arch Occup Environ Health*, 2001. **74**(3): p. 184-8.
110. Meeker, J.D., L. Altshul, and R. Hauser, *Serum PCBs, p,p'-DDE and HCB predict thyroid hormone levels in men*. *Environ Res*, 2007. **104**(2): p. 296-304.
111. Turyk, M.E., et al., *Hormone disruption by PBDEs in adult male sport fish consumers*. *Environ Health Perspect*, 2008. **116**(12): p. 1635-41.
112. Leijds, M.M., et al., *Thyroid hormone metabolism and environmental chemical exposure*. *Environ Health*, 2012. **11 Suppl 1**: p. S10.
113. Hagmar, L., et al., *Plasma levels of persistent organohalogenes and hormone levels in adult male humans*. *Arch Environ Health*, 2001. **56**(2): p. 138-43.
114. Schell, L.M., et al., *Relationship of thyroid hormone levels to levels of polychlorinated biphenyls, lead, p,p'- DDE, and other toxicants in Akwesasne Mohawk youth*. *Environ Health Perspect*, 2008. **116**(6): p. 806-13.
115. Stapleton, H.M., et al., *Associations between polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants, phenolic metabolites, and thyroid hormones during pregnancy*. *Environ Health Perspect*, 2011. **119**(10): p. 1454-9.
116. Marchesini, G.R., et al., *Biosensor recognition of thyroid-disrupting chemicals using transport proteins*. *Anal Chem*, 2006. **78**(4): p. 1107-14.
117. Gutleb, A.C., et al., *In vitro assay shows that PCB metabolites completely saturate thyroid hormone transport capacity in blood of wild polar bears (Ursus maritimus)*. *Environ Sci Technol*, 2010. **44**(8): p. 3149-54.
118. Hamers, T., et al., *In vitro profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants*. *Toxicol Sci*, 2006. **92**(1): p. 157-73.
119. den Besten, C., et al., *The liver, kidney, and thyroid toxicity of chlorinated benzenes*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1991. **111**(1): p. 69-81.
120. Montano, M., et al., *New approaches assess the TTR binding capacity of bio-activated thyroid hormone disruptors*. *Toxicol Sci*, 2012.
121. Ucan-Marín, F., et al., *Recombinant transthyretin purification and competitive binding with organohalogen compounds in two gull species (Larus argentatus and Larus hyperboreus)*. *Toxicol Sci*, 2009. **107**(2): p. 440-50.
122. Ucan-Marín, F., et al., *Recombinant albumin and transthyretin transport proteins from two gull species and human: chlorinated and brominated contaminant binding and thyroid hormones*. *Environ Sci Technol*, 2010. **44**(1): p. 497-504.
123. Cheek, A.O., et al., *Potential mechanisms of thyroid disruption in humans: interaction of organochlorine compounds with thyroid receptor, transthyretin, and thyroid-binding globulin*. *Environ Health Perspect*, 1999. **107**(4): p. 273-8.
124. Rickenbacher, U., et al., *Structurally specific binding of halogenated biphenyls to thyroxine transport protein*. *J Med Chem*, 1986. **29**(5): p. 641-8.
125. Rochette, L. and C. Blanchet, *Qanuippitaa? How are we? - Methodological report*, 2007: Montreal, Qc, Canada. p. 328.
126. Csako, G., et al., *Direct and indirect techniques for free thyroxine compared in patients with nonthyroidal illness. II. Effect of prealbumin, albumin, and thyroxine-binding globulin*. *Clin Chem*, 1989. **35**(8): p. 1655-62.
127. Bayer, M.F., *Free thyroxine results are affected by albumin concentration and nonthyroidal illness*. *Clin Chim Acta*, 1983. **130**(3): p. 391-6.

128. Soldin, O.P. and S.J. Soldin, *Thyroid hormone testing by tandem mass spectrometry*. Clin Biochem, 2011. **44**(1): p. 89-94.
129. Dewailly, E., et al., *Inuit exposure to organochlorines through the aquatic food chain in arctic quebec*. Environ Health Perspect, 1993. **101**(7): p. 618-20.
130. Meeker, J.D., *Exposure to environmental endocrine disrupting compounds and men's health*. Maturitas, 2010. **66**(3): p. 236-41.
131. White, S.S., S.E. Fenton, and E.P. Hines, *Endocrine disrupting properties of perfluorooctanoic acid*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011. **127**(1-2): p. 16-26.
132. Parent, A.S., et al., *Early developmental actions of endocrine disruptors on the hypothalamus, hippocampus, and cerebral cortex*. J Toxicol Environ Health B Crit Rev, 2011. **14**(5-7): p. 328-45.
133. Boas, M., U. Feldt-Rasmussen, and K.M. Main, *Thyroid effects of endocrine disrupting chemicals*. Mol Cell Endocrinol, 2012. **355**(2): p. 240-8.
134. Kawaguchi, M., et al., *Developmental exposure to pentachlorophenol affects the expression of thyroid hormone receptor beta1 and synapsin I in brain, resulting in thyroid function vulnerability in rats*. Endocrine, 2008. **33**(3): p. 277-84.
135. Meerts, I.A., et al., *Placental transfer of a hydroxylated polychlorinated biphenyl and effects on fetal and maternal thyroid hormone homeostasis in the rat*. Toxicol Sci, 2002. **68**(2): p. 361-71.
136. Warner, A. and J. Mittag, *Thyroid hormone and the central control of homeostasis*. J Mol Endocrinol, 2012. **49**(1): p. R29-35.
137. Hagen, G.A. and W.J. Elliott, *Transport of thyroid hormones in serum and cerebrospinal fluid*. J Clin Endocrinol Metab, 1973. **37**(3): p. 415-22.
138. Park, J.S., et al., *Placental transfer of polychlorinated biphenyls, their hydroxylated metabolites and pentachlorophenol in pregnant women from eastern Slovakia*. Chemosphere, 2008. **70**(9): p. 1676-84.
139. Dallaire, R., et al., *Effects of prenatal exposure to organochlorines on thyroid hormone status in newborns from two remote coastal regions in Quebec, Canada*. Environ Res, 2008. **108**(3): p. 387-92.
140. Darras, V.M., *Endocrine disrupting polyhalogenated organic pollutants interfere with thyroid hormone signalling in the developing brain*. Cerebellum, 2008. **7**(1): p. 26-37.
141. Miyazaki, W., et al., *Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone receptor-mediated transcription through a novel mechanism*. J Biol Chem, 2004. **279**(18): p. 18195-202.
142. Koibuchi, N. and T. Iwasaki, *Regulation of brain development by thyroid hormone and its modulation by environmental chemicals*. Endocr J, 2006. **53**(3): p. 295-303.